

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ДЛЯ ИЗОЛИРОВАНИЯ ДИМЕДРОЛА ИЗ ОБРАЗЦОВ ВОЛОС

Ю.В. Слустовская*, В.С. Кашеутова, О.Ю. Стрелова, кандидат химических наук
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия;
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14

Введение. Традиционные лекарственные препараты могут быть использованы для получения наркотического и одурманивающего эффекта. Так, например, часто стали наблюдаться интоксикации димедролом. Судебно-химические и химико-токсикологические исследования мочи и крови спустя 1–3 сут обычно дают отрицательные результаты. Анализ образцов волос позволяет обнаружить токсиканты в течение значительно более длительного времени.

Цель работы – разработка методики обнаружения веществ основного характера в волосах как объекте химико-токсикологического исследования (на примере димедрола).

Материал и методы. Исследования проводили на беспородных белых и черных морских свинках-самцах с использованием субстанции димедрола (ч.д.а). Количественное определение основания димедрола в извлечениях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Результаты. Для изолирования основания димедрола из волос могут быть использованы щелочной гидролиз и ферментативный гидролиз. Установлена большая эффективность ферментативного гидролиза по сравнению со щелочным. Проведена валидация методики ферментативного гидролиза.

Заключение. Разработана методика ферментативного гидролиза протеолитическими ферментами, которая может быть использована для разрушения связи токсических веществ с белками в волосах для химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: димедрол, волосы, щелочной гидролиз, ферментный гидролиз, химико-токсикологический анализ.

*E-mail: ulia.slustovskaya@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

В конце XX – начале XXI века наблюдался активный рост числа лиц с наркозависимостью в различных возрастных группах населения и стремительным омоложением данного явления. Особая проблема – использование лекарственных препаратов (ЛП) для получения наркотического и одурманивающего эффекта [1].

Дифенгидрамина гидрохлорид (димедрол) является блокатором H_1 -гистаминовых рецепторов I поколения. В настоящее время интоксикации димедролом встречаются достаточно часто. Это может быть связано со случайным употреблением препарата (особенно – детьми), а также с намеренным использованием. Механизм действия димедрола заключается в блокировании H_1 -гистаминовых рецепторов, находящихся в центральной нервной системе (ЦНС), тонкой кишке, бронхах, артериях, сердце, и устранении эффектов гистамина, опосредуемых через данный тип рецепторов. Препарат хорошо распределяется в организме и проходит через гематоэнцефалический барьер, блокируя H_3 -гистаминорецепторы и м-холинорецепторы. За счет блокады м-холинорецепторов вегетативных ганглиев и H_3 -гистаминовых рецепторов мозга димедрол угнетает центральные холинергические структуры. Поступление в организм токсических доз пре-

парата приводит к развитию «антихолинергического синдрома». Классическими побочными эффектами димедрола являются многочисленные проявления со стороны ЦНС: возбуждение, зрительные и слуховые галлюцинации, беспокойство, страх. Делирий, возникающий при «антихолинергическом синдроме», характеризуется беспокойством, раздраженностью, потерей ориентации в пространстве, ажитацией, слуховыми и зрительными галлюцинациями, неясной речью. Описаны специфические галлюцинации в виде «маленьких человечков», стереотипные движения в виде поднимания разнообразных воображаемых предметов. Есть одна характерная черта интоксикаций – дизартрия с отрывистой, сложной для восприятия речью [2,3].

В судебно-химических и химико-токсикологических лабораториях объектами исследования служат: моча, кровь, слюна, потожировые выделения, ногти и волосы. Такие классические и чаще всего используемые биообъекты, как моча и кровь, обычно дают отрицательные результаты спустя 1–3 сут, в отдельных случаях – спустя 1 нед или чуть более. В последнее время специалисты судебной и клинической токсикологии направили свои усилия на обнаружение веществ в образцах волос, так как в них можно установить присутствие токсикантов в течение значительно более длительного времени. Ранее нами были проведены исследования по опре-

делению в волосах фенобарбитала, вещества кислотного характера, с использованием 2 методов изолирования: кислотного и ферментативного гидролизом [4,5].

Цель работы – разработка методики обнаружения веществ основного характера (на примере димедрола) в волосах как объекте химико-токсикологического исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали субстанции димедрола, трилона Б (ч.д.а.), цистеина, ферменты папаин («Вектон»), трипсин («Самсон-Мед»), химотрипсин («Самсон-Мед»). Исследование осуществлялось с применением вибрационной шаровой мельницы Retsch MM-200, настольной центрифуги HETICH Rotanta 460 R, роторной мешалки Intelli-Mixer RM-1L, аналитических весов Sartorius CP224S, хроматографа с масс-селективным детектором Agilent 7890 A/5977 MSD на колонке HP-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), управление выполнялось по программе Mass Hunter GCMS. Полученные данные обрабатывали с помощью программ Mass Hunter Qualitative Analysis и Mass Hunter Quantitative Analysis.

Эксперименты проводили на беспородных белых и черных морских свинок-самцах. Содержание и исследование лабораторных животных осуществляли в соответствии с действующими принципами Хельсинкской декларации по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей [6]. Перед началом и в ходе эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария на сбалансированной диете.

Для моделирования ситуации длительного употребления димедрола были использованы 3 белые морские свинки средней массой 450 г и 2 черные морские свинки средней массой 500 г. Подопытные животные ежедневно перорально получали димедрол в количестве 100 мг/кг массы тела животного в виде водного раствора, что в пересчете соответствует суточной дозе для человека.

Отбор шерсти у подопытных животных производили каждые 28 дней со спины, с правого и левого боков хирургическими ножницами максимально близко в коже. Полученные образцы шерсти промывали от внешних загрязнений водой очищенной, затем однократно 9 мл метилового спирта до покрытия частиц биообъекта. Высушенные при комнатной температуре образцы шерсти сначала измельчали ножницами, затем – в шаровой мельнице до порошкообразной массы.

Щелочной гидролиз выполняли по следующей методике [7]: 0,3500 г (точная навеска) образца шерсти помещали в коническую трубу объемом 15 мл с завинчивающейся крышкой, добавляли 4 мл 2М раствора калия гидроксида, плотно закрывали

крышкой и термостатировали при температуре 37°C в течение 12 ч. Гидролизат охлаждали и извлекали дифенгидрамин методом жидкость-жидкостной экстракции порциями по 3 мл хлороформа 3 раза при рН среды 9–10. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл комплексного растворителя (дихлорметан: дихлорэтан–гептан–изопропиловый спирт – 1:1:1:0,5) и исследовали полученный раствор методом газовой хроматографии.

Условия хроматографирования: газ-носитель гелий, скорость потока через колонку – 0,8 мл/мин, температура испарителя – 280°C, температура интерфейса МС детектора – 290°C, температура колонки – программируемая (начальная – 80°C в течение 0,4 мин, нагревание со скоростью 50°C/мин до 100°C, далее – 30°C/мин до 300°C с выдержкой при конечной температуре 5 мин). Режим сканирования: по полному ионному току (SCAN) в диапазоне масс m/z 40–500 а.е.м. В газовый хроматограф автоматически с помощью автосамплера вводили 1 мкл исследуемого раствора в комплексном растворителе.

Количественное определение основания димедрола в извлечениях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, расчет вели по градуировочному графику, построенному по стандартным растворам субстанции димедрола.

Ферментативный гидролиз химопсином, трипсином и химотрипсином выполняли в следующих условиях: раствор фермента готовили в соотношении фермент – шерсть животного (субстрат) 1:100. Навеску фермента растворяли в фосфатном буфере с рН среды 7,4, затем термостатировали в течение 3 ч при температуре 37°C. Полученные гидролизаты центрифугировали при скорости 4600 об/мин в течение 10 мин. Затем отбирали центрифугат. К осадку добавляли 2-ю порцию раствора фермента в равном объеме, перемешивали и термостатировали следующие 3 ч в аналогичных условиях. Данную операцию повторяли с 3-й порцией фермента. Общее время гидролиза составило 9 ч. К объединенному центрифугату добавляли водный раствор аммиака до рН среды 9–10 и осуществляли извлечение методом жидкость-жидкостной экстракции порциями по 3 мл хлороформа 3 раза. Полученные вытяжки объединяли и выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 500 мкл комплексного растворителя и исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием в условиях, описанных выше.

Ферментативный гидролиз папаином выполняли следующим образом: готовили раствор фермента в соотношении фермент–субстрат 1:100. Навеску фермента растворяли в ацетатном буфере с рН среды 4,7, содержащем 0,1% раствор трилона Б и 0,1% раствор

цистеина. Гидролиз проводили по описанной выше методике и исследовали методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Полученные данные по оценке эффективности применяемых на практике методов изолирования димедрола были статистически обработаны по фармакопейной методике (P–90%) и согласно ОСТ № 220 от 26.05.2003 [8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При подготовке образцов шерсти животных к анализу в метиловом спирте, полученном после промывки образцов, основание димедрола – дифенгидрамин – отсутствовало.

На хроматограммах извлечений из исследуемых образцов шерсти животных после гидролиза 2 М раствором калия гидроксида и после ферментативного

гидролиза наблюдались пики небольшой интенсивности со временем удерживания 8,056 мин, соответствующие основанию димедрола (рис.1, 2). На масс-спектре отмечался пик молекулярного иона 255, базовые и осколочные пики 58, 73, 165, что совпадает с библиотечными спектрами и соответствует основанию димедрола – дифенгидрамину.

Результаты оценки эффективности методов изолирования димедрола (табл. 1, 2) показали, что щелочной гидролиз может быть использован для изолирования веществ из волос. Однако время гидролиза должно составлять не менее 12 ч. На хроматограммах наблюдалось большое количество пиков эндогенных веществ, интенсивность пика анализируемого вещества была небольшой. Количество извлеченного основания димедрола составило $11,65 \pm 0,14$ нг/мг (CV=0,01%).

Использование ферментативного гидролиза протеолитическими ферментами (см. табл. 1, 2) позволило существенно повысить количество извлеченного вещества, например, при использовании папаина было извлечено $34,93 \pm 0,53$ нг/мг (CV=0,94%). На хроматограммах наблюдалось небольшое количество пиков балластных веществ, интенсивность пика анализируемого вещества была существенно выше. Кроме того, ферментативный гидролиз позволил сократить время инкубации до 9 ч. Первые положительные результаты были получены уже после 3 ч гидро-

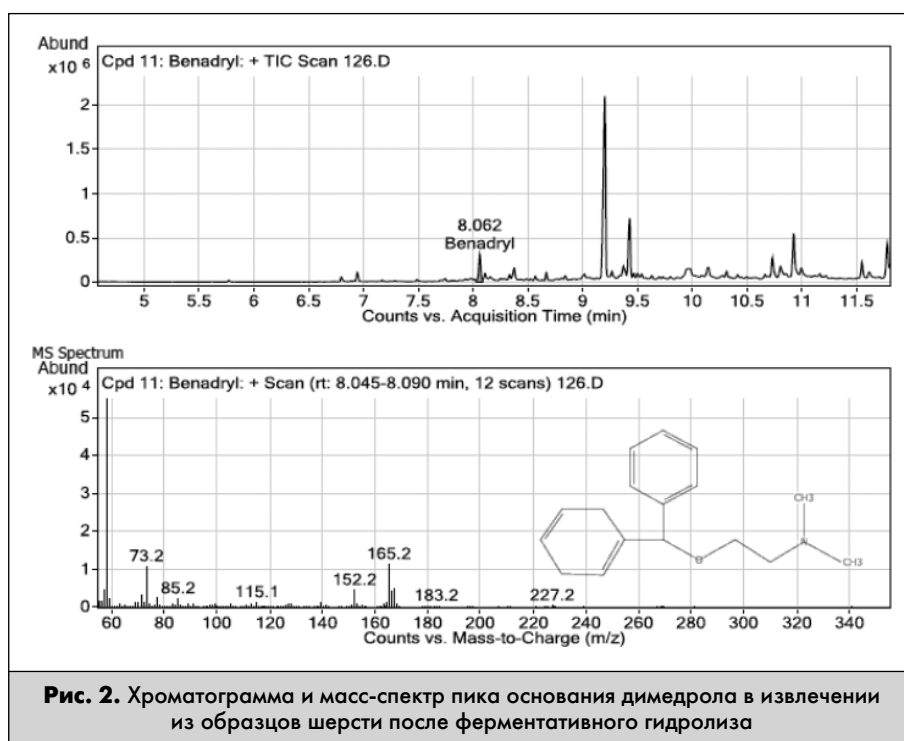
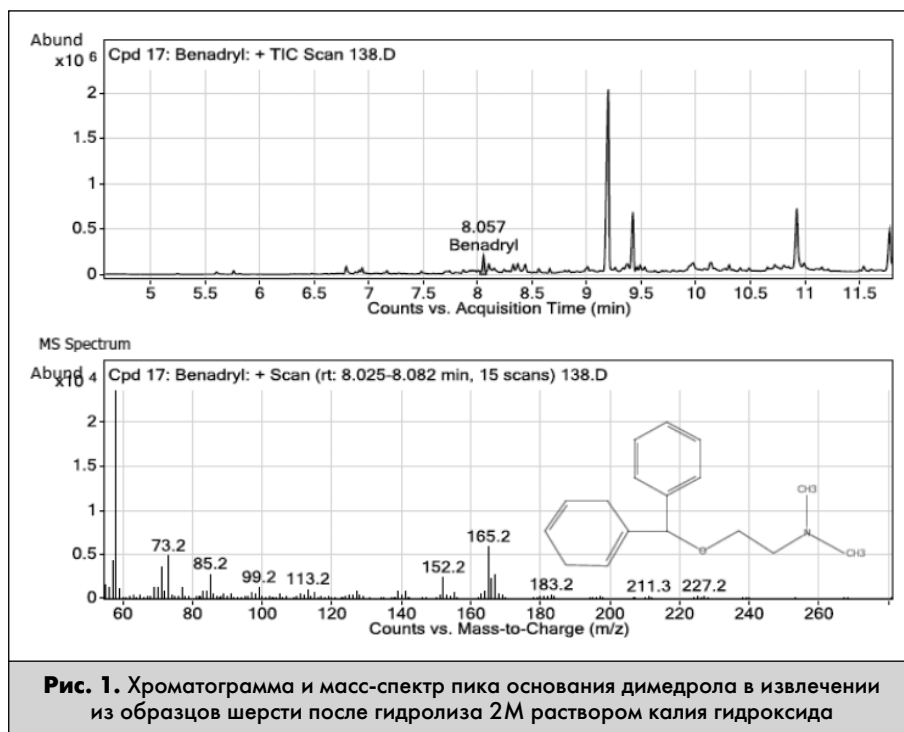


Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПО СТЕПЕНИ ЭКСТРАКЦИИ ДИМЕДРОЛА ИЗ ШЕРСТИ БЕЛЫХ МОРСКИХ СВИНОК МЕТОДОМ ПРЯМОЙ ЭКСТРАКЦИИ ХЛОРОФОРМОМ ПОСЛЕ ЩЕЛОЧНОГО И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

Показатель, нг/мг	n	f	X	S ²	S	Sx _{cp}	Δ X	ε %	Δ Xcp	ε %cp
<i>Гидролиз 2М раствором калия гидроксида</i>										
11,57; 11,60; 11,61; 11,65; 11,71; 11,75	6	5	11,65	0,0001	0,07	0,03	0,14	1,19	0,05	0,45
<i>Гидролиз раствором химопсина</i>										
32,06; 32,25; 32,51; 32,68; 33,52; 34,08	6	5	32,85	1,92	0,79	0,32	1,59	4,83	0,60	1,82
<i>Гидролиз раствором химотрипсина</i>										
31,91; 31,94; 31,03; 32,95; 33,18; 33,44	6	5	32,57	1,13	0,69	0,28	1,39	4,27	0,52	1,61
<i>Гидролиз раствором трипсина</i>										
31,26; 31,35; 31,38; 31,40; 31,58; 31,65	6	5	31,44	0,002	0,15	0,06	0,29	0,94	0,11	0,35
<i>Гидролиз раствором папаина</i>										
34,19; 34,26; 34,59; 35,09; 35,57; 35,88	6	5	34,93	1,20	0,70	0,29	1,41	4,04	0,53	1,52

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ПО СТЕПЕНИ ЭКСТРАКЦИИ ДИМЕДРОЛА ИЗ ШЕРСТИ ЧЕРНЫХ МОРСКИХ СВИНОК МЕТОДОМ ПРЯМОЙ ЭКСТРАКЦИИ ХЛОРОФОРМОМ ПОСЛЕ ЩЕЛОЧНОГО И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

Показатель, нг/мг	n	f	X	S ²	S	Sx _{cp}	Δ X	ε %	Δ Xcp	ε %cp
<i>Гидролиз 2М раствором калия гидроксида</i>										
11,58; 11,66; 12,04; 12,10; 12,56; 12,74	6	5	12,11	0,24	0,42	0,19	0,94	7,74	0,35	0,19
<i>Гидролиз раствором химопсина</i>										
33,68; 34,10; 34,47; 34,90; 35,59; 36,71	6	5	34,91	1,59	0,75	0,31	1,51	4,33	0,57	1,63
<i>Гидролиз раствором химотрипсина</i>										
33,91; 34,61; 34,82; 35,33; 35,67; 35,89	6	5	35,04	1,47	0,74	0,30	1,48	4,23	0,56	1,60
<i>Гидролиз раствором трипсина</i>										
33,45; 33,76; 33,99; 34,27; 35,20; 35,45	6	5	34,35	2,09	0,80	0,33	1,62	4,72	0,61	1,78
<i>Гидролиз раствором папаина</i>										
34,42; 35,13; 35,91; 36,07; 36,36; 36,60	6	5	35,75	2,28	0,82	0,34	1,66	4,63	0,62	1,75

Таблица 3

ВАЛИДАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИМЕДРОЛА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

лиза. Таким образом, можно утверждать: ферментативный гидролиз более эффективен, чем щелочной. Количество димедрола в извлечении после гидролиза химопсином (смесь химопсина и химотрипсина) составляло 32,85 нг/мг, после гидролиза трипсином – 31,4 нг/мг, после гидролиза папаином – 34,93 нг/мг. В извлечении после гидролиза 2М раствора калия гидроксида выявили основание димедрола – 11,65 нг/мг.

Согласно полученным результатам, вещества основной природы (дифенгидрамин) не

Параметры	Результаты эксперимента, мкг/мл				
	r ≥ 0,99				
Линейность	концентрация мкг/мл	I стрижка	II стрижка	III стрижка	IV стрижка
	Сходимость	20	19,81	19,66	19,98
40		39,37	40,55	40,18	39,87
100		98,47	99,69	100,33	100,51
120		120,91	119,50	119,97	121,08
200		200,54	199,67	201,09	199,14
320		319,30	319,70	320,11	319,22
Специфичность	Пик молекулярного иона – 255 m/z, осколочных ионов – 58, 165, 73 m/z, время удерживания – 8,056 мин				

накапливаются в большей степени в природно окрашенных черных волосах [7]. Эффективность использования ферментативного гидролиза сопоставима для природно окрашенных и неокрашенных волос.

Методика количественного определения димедрола с использованием ферментативного гидролиза химопсином, химотрипсином, папаином была валидирована. Установлены валидационные характеристики: сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость и устойчивость (робастность). Результаты исследования позволяют рекомендовать данную методику для практического использования (табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика ферментативного гидролиза протеолитическими ферментами, которая может быть использована для разрушения связи токсических веществ с белками в волосах для химико-токсикологического анализа. Установлено, что ферментативный гидролиз более эффективен, чем щелочной. Условия проведения ферментативного анализа более мягкие и требуют меньше времени. Его можно рекомендовать для изолирования легкогидролизуемых токсических веществ. Полученные данные показывают, что вещества основного характера накапливаются в природно окрашенных черных волосах не более чем в неокрашенных

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Т.А. У вас есть рецепт? Новая аптека. Эффективное управление, 2009; 3:32–33.
2. Дроговоз С.М., Лукьянчук В.Д., Шейман Б.С., Кононенко А.В. Токсические эффекты блокаторов H1-гистаминовых рецепторов и механизмы их формирования. Современные проблемы токсикологии пищевой и химической безопасности, 2012; 3 (4): 44–8.
3. Волков В.П. Антихолинергический синдром (обзор литературы). Психические расстройства в общей медицине, 2012; 3:52–58.
4. Слустовская Ю.В., Стрелова О.Ю., Крысько М.В. Применение метода кислотного гидролиза для изолирования производных барбитуровой кислоты из волос. Сборник тезисов VI Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015». 2015 декабрь 2–4; Санкт-Петербург, Россия. СПб., 2015;493.
5. Слустовская Ю.В., Крысько М.В., Стрелова О.Ю. Определение производных барбитуровой кислоты в волосах с использованием методики кислотного и ферментативного гидролиза. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего». 2016 апрель 24–26; Санкт-Петербург, Россия. СПб., 2016; 450.
6. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ETSN 123, Страсбург (18.03.86).
7. Симонов Е.А., Изотов Б.Н., Фесенко А.В. Наркотики: методы анализа на коже, в ее придатках и выделениях. М.: Анахарсис, 2000; 125.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. М.: ФЭМБ, 2015; 1470.
9. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». Приказ Минздравсоцразвития России № 220н (26.05.03).

Поступила 27 декабря 2016 г.

DEVELOPMENT OF AN ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCEDURE FOR THE ISOLATION OF DIMEDROL FROM HAIR SAMPLES

Yu.V. Slustovskaya, V.S. Kasheutova, O.Yu. Strelova, PhD

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Traditional medicines can be used to produce narcotic and stupefying effects. So, for example, dimedrol intoxication has come to be often observed. Forensic chemical and chemotoxicological studies of urine and blood following 1–3 days usually yield negative results. Analysis of hair samples can detect toxicants over a much longer time period.

Objective: to develop a procedure for detection of ground substances in the hair as an object of chemotoxicological studies (in case of dimedrol).

Material and methods. Investigations were performed on outbred male white and black guinea-pigs, by using the reagent dimedrol substance. The dimedrol base in the extracts was quantified by gas chromatography-mass selective detection.

Results. Alkaline hydrolysis and enzymatic hydrolysis may be used to extract the dimedrol base from hair. Enzymatic hydrolysis versus alkaline hydrolysis was ascertained to be more efficient. The enzymatic hydrolysis procedure was validated.

Conclusion. A procedure for enzymatic hydrolysis by proteolytic enzymes has been developed, which can be used to disrupt the interaction of toxic substances with proteins in the hair chemotoxicological analysis.

Key words: dimedrol, hair, alkaline hydrolysis, chemotoxicological analysis.

REFERENCES

1. Ivanova T.A. Do you have a prescription? New Pharmacy. Effective Management, 2009; 3: 32–3 (in Russian).
2. Drogovoz S.M., Luk'janchuk V.D., Shejman B.S., Kononenko A.V. Toxic effects of blockers of H1-histamine receptors and mechanisms of their formation. Modern Problems of Toxicology of Food and Chemical safety, 2012; 3 (4): 58–9 (in Russian).
3. Volkov V.P. Anticholinergic syndrome (review). Mental disorders in general medicine, 2012; 3: 52–8 (in Russian).
4. Slustovskaja Ju.V., Strelova O.Ju., Krysko M.V. Application of the method the acid hydrolysis to isolate of barbituric acid derivatives from the hair. Abstracts of the VI International Youth Medical Congress «St. Petersburg Scientific Readings – 2015». 2015 December 2–4; Saint-Petersburg, Russia. Saint-Petersburg, 2015; 493 (in Russian).
5. Slustovskaja Ju.V., Krysko M.V., Strelova O.Ju. Determination of barbituric acid derivatives in the hair using the method of acid and enzymatic hydrolysis. The collection of materials of the conference «Young Pharmacy – future potential». 2016 April 24–26; Saint-Petersburg, Russia. Saint-Petersburg, 2016; 450 (in Russian).
6. European convection for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, ETSN 123, Strasbourg (March 18, 1986).
7. Simonov E.A., Izotov B.N., Fesenko A.V. Drugs: the methods of analysis of the skin, its appendages and secretions. Moscow: Anaharsis, 2000; 125 (in Russian).
8. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. Moscow: FEMB, 2015; 1470 (in Russian).
9. On approval of the industry standard «Rules of intralaboratory quality control of quantitative methods of clinical laboratory tests using control materials». Order of the Health Ministry of Russia № 220n (26 May 2003) (in Russian).