

МЕТОДИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ ДЛЯ ПРОБОПІДГОТОВКИ КРОВІ З МЕТОЮ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ПОХІДНИМИ ГАММА-АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ

Вступ. До нових потенційно небезпечних психоактивних речовин, що не входять до переліку наркотичних засобів і психотропних речовин, обіг яких заборонений або обмежений в Україні, належать десять груп речовин різної будови, серед яких виділяють групу агоністів гамма-аміномасляної кислоти та їх похідних. Зловживання новими небезпечними психоактивними речовинами, в тому числі похідними препаратами гамма-аміномасляної кислоти, зафіксовано в 94 країнах світу, зокрема і в Україні. У зв'язку із зростанням останнім часом кількості осіб, залежних від зазначених лікарських препаратів, а також числа гострих і навіть смертельних отруєнь, усе більшої актуальності набуває питання хіміко-токсикологічного дослідження, яке включає кількісне визначення аналізованих речовин у біологічних об'єктах.

Мета дослідження – розробити методики ізолювання та визначення похідних гамма-аміномасляної кислоти (фенібуту і баклофену) в біологічних рідинах (крові).

Методи дослідження. Дослідження проводили з використанням субстанції фенібуту – 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлориду і таблеток баклофену. Для проведення гідролізу застосовували ензими: папаїн, хімотрипсин, хімопсин та гіалуронідазу, субстанцію трилону Б, субстанцію цистеїну.

Результати й обговорення. Значною складністю при дослідженні біологічних об'єктів на похідні гамма-аміномасляної кислоти (фенібут, прегабалін, габапентин, баклофен та ін.) є те, що ці речовини здатні давати в середовищі біологічних рідин внутрішню сіль, що істотно ускладнює проведення лабораторних досліджень на них. У нашій роботі ми використовували методику екстракційного виморожування при температурі -18 ... -20 °С, визначивши селективні умови, рН 2 середовища і розчинник ацетонітрил.

Висновки. У ході дослідження було показано, що методику ферментативного гідролізу протеазами низької специфічності можна рекомендувати для проведення пробопідготовки крові при немедикаментозному застосуванні лікарських засобів із групи похідних гамма-аміномасляної кислоти.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: похідні гамма-аміномасляної кислоти; кров; ферментативний гідроліз; протеази; гіалуронідаза; валідаційні параметри.

ВСТУП. До нових потенційно небезпечних психоактивних речовин, що не входять до переліку наркотичних засобів і психотропних речовин, обіг яких заборонений або обмежений в Україні, належать десять груп речовин різної будови, серед яких виділяють групу агоністів гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК) – ГАМК-А і ГАМК-В рецепторів та їх похідних [1]. Більшість цих сполук відносять до лікарських препаратів, які не підлягають предметно-кількісному обліку, однак вони мають психотропний ефект, подібний до ефекту підконтрольних препаратів і можуть викликати стійке звикання та залежність у короткі терміни. Наприклад, до них належать препарати "Фенібут" – фенольне похідне гамма-аміномасляної кислоти, "Баклосан", що містить баклофен – 4-аміно-3-(4-хлорфеніл)-бутанову

кислоту, "Тебантин", що містить габапентин, та ін. [2, 3].

Зловживання новими небезпечними психоактивними речовинами, в тому числі похідними препаратами ГАМК, зафіксовано в 94 країнах світу, зокрема і в Україні [4, 5]. У зв'язку із зростанням останнім часом кількості осіб, залежних від зазначених лікарських препаратів, а також числа гострих і навіть смертельних отруєнь, усе більшої актуальності набуває питання хіміко-токсикологічного дослідження, яке включає в себе спільне з виявленням кількісне визначення аналізованих речовин у біологічних об'єктах. Застосування методики виділення токсичних речовин, наприклад із крові, дозволяє вилучити тільки вільну фракцію токсиканта, що істотно знижує ефективність лабораторної діагностики гострих і хронічних отруєнь. Крім того, деякі

методи пробопідготовки можуть призводити до повної втрати токсиканта, наприклад фенібуту, який здатний утворювати внутрішню сіль та не вилучатися з біорідин традиційними методами. Тому ізолювання фенібуту і близьких до нього за хімічною будовою речовин, таких, як прегабалін, баклофен, габапентин, з біологічного матеріалу викликає труднощі. Це також суттєво ускладнює лабораторну діагностику отруєнь даними речовинами. Одним із перспективних напрямків у вирішенні цих проблем є розробка методик ферментативного гідролізу, включаючи розширення номенклатури можливих до використання ензимів [6, 7].

Мета дослідження – розробити методики ізолювання та визначення похідних гамма-аміномаєляної кислоти (фенібуту і баклофену) в біологічних рідинах (крові).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконували з використанням таких речовин: субстанції фенібуту – 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлориду і таблеток баклофену (25 мг, виробництво “Polpharma”, Польща). Для проведення гідролізу застосовували ензими: папаїн, хімотрипсин, хімопсин та гіалуронідазу, субстанцію трилону Б, субстанцію цистеїну.

В експерименті було використано таке обладнання: аналітичні ваги Sartorius CP224S; рН-метр FiveEasy; рідинний хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence (Японія) з діодноматричним детектором SPD-M20A, колонку Shim-pack VP-ODS (5 мкм, 15 мм×4,6 мм). Умови хроматографування: температура термостата колонки – 30 °С; об'єм проби – 20 мкл. Поглинання реєстрували при довжині хвилі 210 нм. Швидкість потоку елюентів для аналітичної колонки становила 0,5 мл/хв. Дослідження компонентів біологічної матриці крові, визначення ендогенних речовин проводили методом газової хроматографії з мас-селективним детектуванням на приладі Agilent Technologies 7890 A/5977 MSD (США), управління здійснювали за допомогою програми Mass MS, обробляли отримані дані в програмах Chemstation Data Analysis, AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System), MassHunter Quantitative Analysis (США).

Попередньо було розроблено методики виявлення та кількісного визначення фенібуту і баклофену у витяжках із крові методом високоефективної рідинної хроматографії. Градувальні графіки мають лінійну залежність у діапазоні досліджуваних концентрацій (10–200 мкг/мл), $0,99 \leq R \leq 1,0$. Визначено валідаційні параметри – відносне стандартне відхилення (RSD) не перевищує 2 %, за показником прецизійності не пе-

ревищує 2 %, відкриття (Recovery) перебуває в діапазоні 99,5–100,5 %, що відповідає критерію прийнятності.

У центрифужні пробірки поміщали по 2,5 мл крові та додавали по 2,5 мл розчину з концентрацією 1 мг/мл фенібуту або баклофену у фосфатному буферному розчині при рН 7,4. Проби термостатували при температурі 37 °С протягом 1 год. Гідроліз протеазами зразків крові проводили за такою методикою: до 5 мл модельних сумішей крові з розчинами речовин додавали рівний об'єм (5 мл) 0,2 % розчину ензиму в 0,1 М розчині амонію гідрокарбонату при гідролізі трипсином або папаїном із вмістом у розчині 0,1 г суміші 3 мл розчину ацетату при рН 4,5, 1 мл 0,002 М розчину трилону Б і 1 мл 0,1 % розчину цистеїну (контроль рН 7–9 за допомогою діетиламіну). Суміш витримували при температурі 37 °С протягом 1 год. Витяжку випарювали насухо.

Гідроліз гіалуронідазою проводили за такою методикою: до 5 мл модельних сумішей крові з розчинами речовин додавали рівний об'єм (5 мл) 0,2 % розчину гіалуронідази в ацетатному буфері при рН середовища 4,5. Суміш витримували при температурі 37 °С протягом 3 год. Гідролізат охолоджували і проводили екстракційне виморожування ацетонітрилом при рН 2 середовища і температурі -18 ... -20 °С. Витяжку випарювали насухо. Як метод порівняння використовували твердофазну екстракцію на патронах марки Oasis HLB. Дослідження проводили за схемою: до 1 мл модельного комплексу додавали 20 мкл концентрованої ортофосфорної кислоти, оскільки вибрані речовини, як зазначено вище, зв'язуються з білками плазми крові на 50 % і більше. Патрон марки Oasis HLB промивали 1 мл метанолу й 1 мл води очищеної зі швидкістю 1 мл/хв. Потім через патрон пропускали 1 мл підкисленого зразка модельного комплексу зі швидкістю 0,5 мл/хв. Промивали патрон від білкових молекул і супутніх речовин 1 мл 5 % розчину метанолу. Речовини елюювали із сорбенту патрона 1 мл метанолу, елюат випарювали насухо.

Сухі залишки витяжок розчиняли в ацетонітрилі та проводили кількісне визначення виділених речовин методом високоефективної рідинної хроматографії.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами математичної статистики з використанням пакета прикладних програм STATISTICA.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Значною складністю при дослідженні біологічних об'єктів на похідні ГАМК (фенібут, прегабалін, габапен-

тин, баклофен та ін.) є те, що ці речовини здатні давати в середовищі біологічних рідин внутрішню сіль, що істотно ускладнює проведення лабораторних досліджень [8]. У нашій роботі ми використовували методику екстракційного виморожування, визначивши селективні умови, рН 2 середовища і розчинник ацетонітрил.

Застосування ферментативного гідролізу показало свої переваги на широкому колі лікарських речовин при ізолюванні з крові. На хроматограмах, отриманих методом вискоєфективної рідинної хроматографії екстрактів з крові, спостерігали пік із часом утримування близько 5,4 хв, що відповідає піку субстанції фенібуту, і близько 11 хв, що відповідає піку субстанції баклофену (рис. 1).

Як свідчать дані, наведені в таблиці, ферментативний гідроліз можна використовувати для проведення пробопідготовки похідних ГАМК. Незважаючи на те, що ступінь екстракції після виконання гідролізу протеазами нижчий, ніж після застосування методики твердофазної

екстракції, саме ферментативний гідроліз включає втрату цільового токсиканта в результаті некоректного вибору патрона, особливо при проведенні скринінгового аналізу.

Перевагою методики ферментативного гідролізу є суттєве зниження ефекту біологічної матриці крові. На хроматограмах екстрактів із холостих зразків крові, одержаних за допомогою досліджуваних методик (рис. 2), можна бачити, що після твердофазної екстракції присутній суттєвий матричний фон, зумовлений наявністю ендогенних речовин, перш за все вищих жирних кислот (пальмітинової кислоти з часом утримування близько 9,5 хв та лінолевої кислоти з часом утримування близько 10,2 хв). Проведення ідентифікації цільових токсикантів вимагатиме використання програми AMDIS, що істотно знижує достовірність таких досліджень.

Метод екстракційного виморожування ацетонітрилом автор [9] позиціонує як швидкий, ефективний, він дозволяє отримати чисте вилучення без додаткових етапів очищення. Дані,

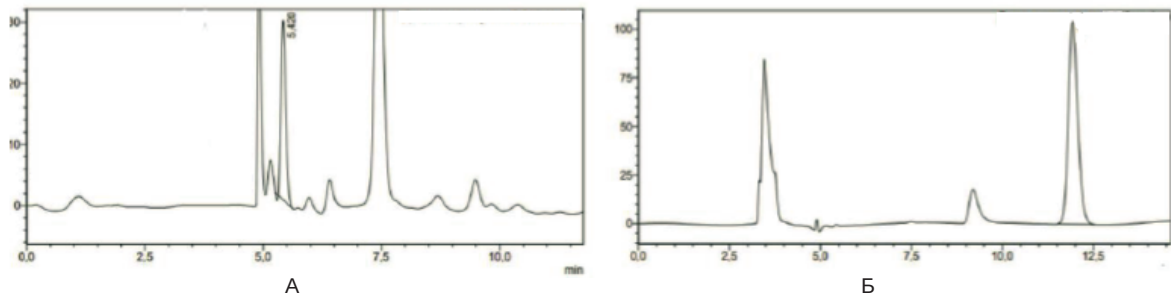


Рис. 1. Хроматограма, одержана методом вискоєфективної рідинної хроматографії з використанням методик екстракційного виморожування, екстрактів фенібуту (А) і баклофену (Б) із крові.

Таблиця – Результати статистичної обробки даних щодо ступеня екстракції фенібуту та баклофену з крові після гідролізу ензимами

Речовина	Виділено X		Метрологічна характеристика ступеня екстракції, %			
	мкг/мл	%	$X \pm \Delta X$	S	ϵ , %	RSD, %
Трипсин						
Баклофен	89,87	35,90	$35,90 \pm 1,16$	0,45	3,22	1,30
Фенібут	35,06	14,10	$14,10 \pm 1,31$	1,31	0,11	9,30
Хімотрипсин						
Баклофен	96,70	38,70	$38,70 \pm 4,40$	5,28	1,79	13,70
Фенібут	34,70	13,90	$13,90 \pm 1,30$	1,59	0,11	11,50
Хімопсин						
Баклофен	132,66	53,07	$53,07 \pm 4,30$	5,23	1,47	9,86
Фенібут	43,10	17,24	$17,24 \pm 0,90$	1,06	1,47	6,14
Папаїн						
Баклофен	131,94	52,78	$52,78 \pm 3,64$	4,41	0,40	8,37
Фенібут	39,90	15,96	$15,96 \pm 0,80$	0,98	0,10	6,13
Гіалуронідаза						
Баклофен	89,87	35,90	$35,90 \pm 1,16$	0,45	3,22	1,30
Фенібут	35,06	14,10	$14,10 \pm 1,31$	1,31	0,11	9,30
Oasis HLB						
Баклофен	233,18	93,27	$93,27 \pm 2,28$	2,83	2,45	2,98
Фенібут	206,32	82,53	$82,53 \pm 5,58$	4,78	4,66	5,67
Екстракційне виморожування						
Баклофен	47,47	18,99	$18,99 \pm 3,19$	3,96	16,82	20,44
Фенібут	15,67	6,27	$6,27 \pm 0,68$	0,71	9,16	11,13

одержані в результаті екстракційного виморожування з холостого зразка крові (рис. 3), показують наявність піків міристинової (близько 8,5 хв) і пальмітинової кислот (близько 9,5 хв), що знову призводить до інтенсивного матричного ефекту. Це явище можна пояснити амфільністю розчинників, які рекомендовано ви-

користувати в методі екстракційного виморожування (ацетонітрил, ацетон). Отже, як і в методі твердофазної екстракції, потрібно додатково застосовувати екстракцію спектра для виявлення токсиканта (див. рис. 3).

Методика ферментативного гідролізу (рис. 4) дозволяє суттєво знизити рівень сигналів

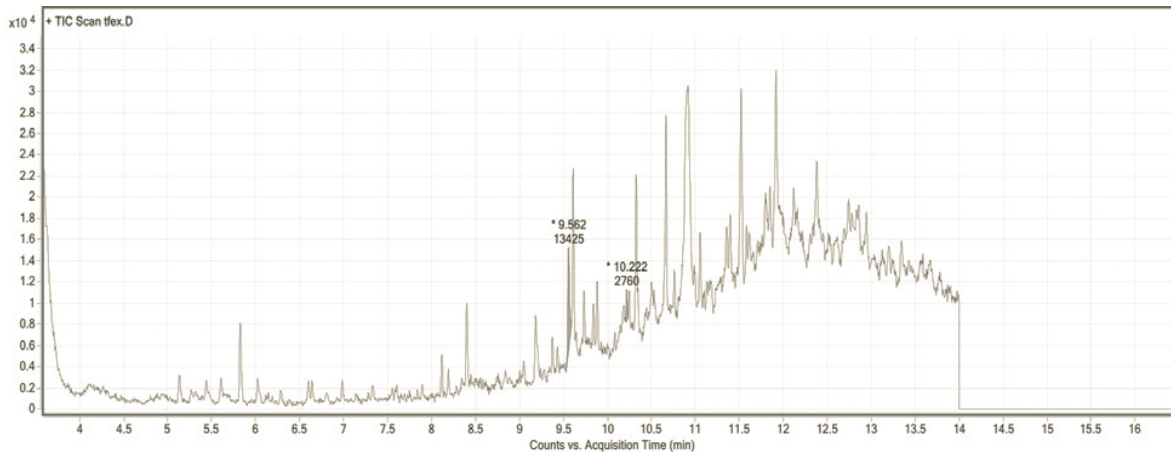


Рис. 2. Хроматограма, одержана методом газової хроматографії з мас-селективним детектуванням, екстракту з холостого зразка крові після твердофазної екстракції.

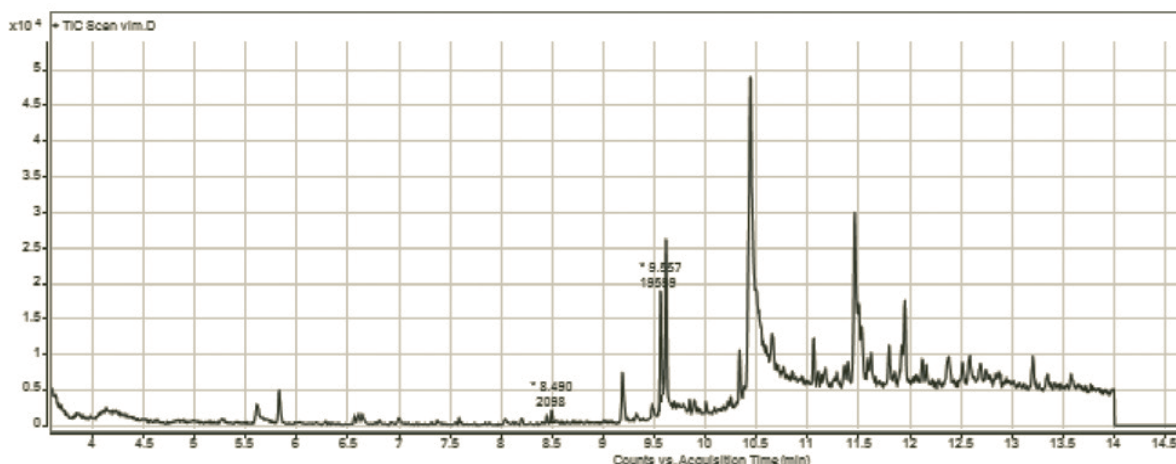


Рис. 3. Хроматограма, одержана методом газової хроматографії з мас-селективним детектуванням, екстракту з холостого зразка крові після екстракційного виморожування.

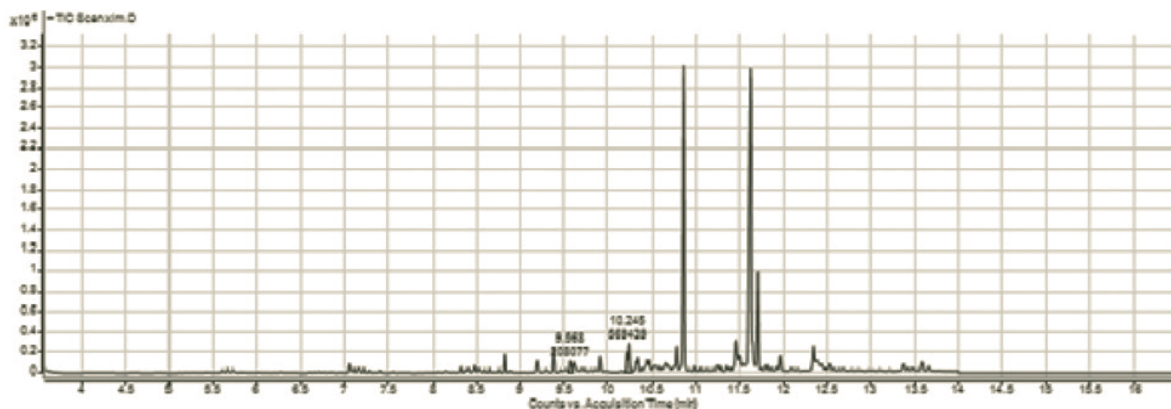


Рис. 4. Хроматограма, одержана методом газової хроматографії з мас-селективним детектуванням, екстракту з холостого зразка крові після гідролізу хімотрипсином.

компонентів біологічної матриці, проводити ідентифікацію цільових токсикантів без використання програми AMDIS та екстракції спектрів. Найбільшу ефективність гідролізу і наступного екстракційного виморожування показали низькоспецифічні протеази: тваринного походження – хімопсин, рослинного походження – папаїн.

Застосування гіалуронідази для проведення пробопідготовки крові показало ефективність, порівнянну з такими протеазами, як трипсин та хімотрипсин.

Встановлено значення валідаційних параметрів збіжності та внутрішньолабораторної відтворюваності для методики ферментативного гідролізу зразків крові. Відносно стандартне відхилення (RSD, %) при оцінці збіжності в межах 0,4–1,5 %, оцінці внутрішньолабораторної відтворюваності (RSD, %) перебувало в діапазоні 0,4–8,1 %, що не перевищувало критерію прий-

нятності для біоаналітичних досліджень. Мінливість варіаційного ряду була незначною.

ВИСНОВКИ. У ході дослідження було показано, що методику ферментативного гідролізу протеазами низької специфічності можна рекомендувати для проведення пробопідготовки крові при немедикаментозному застосуванні лікарських засобів із групи похідних ГАМК. Встановлено, що гідроліз неспецифічними протеазами хімопсином і папаїном слід проводити з подальшим екстракційним виморожуванням ацетонітрилом при рН 2 середовища. Значення валідаційних параметрів збіжності та внутрішньолабораторної відтворюваності відповідають критеріям прийнятності для біоаналітичних методик, що дозволяє рекомендувати запропоновану методику для роботи в практиці судово-хімічних і хіміко-токсикологічних лабораторій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурчинський С. Г. Препарат фенібут та баклосан: властивості, перспективи застосування та місце серед нейротропних засобів / С. Г. Бурчинський // Ліки. – 2012. – № 1. – С. 35–39.

2. Спіріна І. Д. Медико-соціальні аспекти залежності від психоактивних речовин / І. Д. Спіріна, С. Ф. Леонов. – Львів : Кварт, 2020. – 200 с.

3. Вітенко І. С. Психіатричні та психічні аспекти судово-медичної експертизи / І. С. Вітенко. – Дніпро : АРТ-ПРЕС, 2014. – 275 с.

4. Tomassoni A. J. Toxic industrial chemicals and chemical weapons: exposure, identification, and management by syndrome. / A. J. Tomassoni, R. N. French, F. G. Walter // *Emerg. Med. Clin. North Am.* – 2015. – **10**, No. 1. – P. 13–18.

5. Rasimas J. J. Assessment and management of toxidromes in the critical care unit / J. J. Rasimas,

C. M. Sinclair // *Crit. Care Clin.* – 2017. – **33**, No. 3. – P. 33–36.

6. Логойда Л. С. Розробка методик ідентифікації фенібуту в ЛЗ / Л. С. Логойда, Н. О. Зарівна, І. Б. Івануса // *Здобутки клініч. і експерим. медицини.* – 2014. – № 1. – С. 63–66.

7. Hui W. F. An overview of the pediatric toxidromes and poisoning management / W. F. Hui, K. L. Hon, A. K. Leung // *Curr. Clin. Pharmacol.* – 2020. – **30**, No. 3. – P. 456–466.

8. Harbord N. Common toxidromes and the role of extracorporeal detoxification. *Adv. / N. Harbord // Chronic Kidney Dis.* – 2020. – **27**, No. 1. – P. 11–17.

9. Полуян С. М. Порівняльна характеристика методів очистки лікарських речовин / С. М. Полуян, О. Г. Погосян, В. С. Бондар // *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. – Харків, 2019. – Вип. 6. – С. 386–390.

REFERENCES

1. Burchynskiy S.G. (2020). Phenibut and baclozan drugs: properties, application prospects and place among neurotropic agents. *Medicines*, 1, 35-39 [in Ukrainian].

2. Spirina, I.D., Leonov, S.F., & Spirina, I.D. (2020). *Medical and social aspects of addiction to psychoactive substances*. Lviv: Kwart [in Ukrainian].

3. Vitenko, I.S. (2014). *Psychiatric and mental aspects of forensic expertise*. Dnipro: ART-PRESS [in Ukrainian].

4. Tomassoni, A.J., French, R.N., & Walter, F.G. (2015). Toxic industrial chemicals and chemical weapons: exposure, identification, and management by syndrome. *Emerg. Med. Clin. North Am.*, 10 (1), 13-18.

5. Rasimas, J.J., Sinclair C.M. (2017). Assessment and management of toxidromes in the critical care unit. *Crit. Care Clin.*, 33 (3), 33-36.

6. Logoida, L.S., Zarivna, N.O., Ivanusa, I. B. (2014). Development of methods of identification of phenibut in

drugs. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 1, 63-66 [in Ukrainian].

7. Hui, W.F., Hon, K.L., Leung, A.K. (2020). An overview of the pediatric toxidromes and poisoning management. *Clin. Pharmacol.*, 30 (3), 456-466.

8. Harbord, N. (2020). Common toxidromes and the role of extracorporeal detoxification. *adv. Chronic Kidney Dis.*, 27 (1), 11-17.

9. Poluyan, S.M., Pohosyan, O.G., Bondar, V.S. (2019). *Comparative characteristics of methods of purification of medicinal substances*. Modern achievements of pharmaceutical technology and biotechnology: Coll. of Scien. works. Kharkiv [in Ukrainian].

N. V. Horlachuk, N. O. Zarivna

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

METHODS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR BLOOD SAMPLE PREPARATION FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF POISONING WITH GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID DERIVATIVES

Summary

Introduction. New potentially dangerous psychoactive substances, which are not included in the list of narcotic drugs and psychotropic substances, the circulation of which is prohibited or restricted in Ukraine, include ten groups of substances of different structures, among which a group of GABA-A and GABA-B receptor agonists and their derivatives can be distinguished. Abuse of new dangerous psychoactive substances, including GABA derivatives, has been recorded in 94 countries of the world, including Ukraine. In connection with the recent increase in the number of people addicted to these drugs, as well as the number of acute and even fatal poisonings, the issue of chemical and toxicological research, which includes joint detection and quantitative determination of analyzed substances in biological bodies, is becoming more and more relevant projects.

The aim of the study – to develop methods for the isolation and determination of GABA derivatives (phenibut and baclofen) in biological fluids (blood).

Research Methods. The research was conducted using the substance phenibut - (\pm)-4-amino-3-phenylbutanoic acid hydrochloride and baclofen tablets. Enzymes were used for hydrolysis: papain, chymotrypsin, chymopsin and hyaluronidase, trilon B substance, cysteine substance

Results and Discussion. A significant difficulty in conducting research on biological objects for GABA derivatives (phenibut, pregabalin, gabapentin, baclofen, etc.) is that these substances are able to produce internal salt in the environment of biological fluids, which significantly complicates conducting laboratory studies on them. In our work, we used the method of extraction freezing, determining the selective conditions, pH 2 with acetonitrile at a temperature of -18 ... -20 C.

Conclusion. In the course of the conducted research, it was shown that the method of enzymatic hydrolysis by proteases of low specificity can be recommended for blood sample preparation in the diagnosis of non-medicinal use of drugs from the group of GABA derivatives.

KEY WORDS: **gamma-aminobutyric acid derivatives; blood; enzymatic hydrolysis; proteases; hyaluronidase; validation paramete.**

Отримано 14.11.22

Адреса для листування: Н. В. Горлачук, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: horlachuk@tdmu.edu.ua.