

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

22.07.2011 г.

Регистрационный № 049-0511

**КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
СОСТОЯНИЙ ИНТОКСИКАЦИИ, ВЫЗВАННЫХ
НЕМЕДИЦИНСКИМ УПОТРЕБЛЕНИЕМ ТРАМАДОЛА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

АВТОРЫ:

д-р мед. наук, проф. В.С. Камышников, А.М. Чубуков, Т.Ф. Мигаль,
Л.Н. Боровикова, И.Д. Шилейко, Д.А. Статкевич

Темпы и условия развития современного общества требуют прогрессивных подходов в диагностике злоупотреблений психоактивными веществами, которые широко используются в медицинской практике в качестве лекарственных средств. В последние годы приобрела актуальность проблема немедицинского употребления данных веществ для получения состояний одурманивания, что нередко приводит к развитию острых отравлений. В связи с этим задачей наркологической и токсикологической служб является достоверная диагностика немедицинского употребления лекарственных средств, которая может быть решена только с использованием комплекса клинических и современных лабораторных методов исследования.

Важной составляющей лабораторной диагностики состояний интоксикаций, вызванных употреблением психоактивных веществ, является химико-токсикологический анализ (ХТА). Это систематическое высокотехнологичное аналитическое исследование, результаты которого в дальнейшем получают юридическую оценку. Достоверность и надежность ХТА во многом определяются правильностью предпринимаемых организационных мероприятий, знанием клинических и лабораторных проявлений отравлений ксенобиотиками, природы и путей метаболизма токсикантов, а также аналитической чувствительностью и диагностической специфичностью используемых аналитических методов исследования. Выбор конкретного метода химико-токсикологического анализа зависит от задач исследования, экономических возможностей и оснащенности лаборатории.

Разработанная методика предназначена для клинической диагностики состояний опьянения и острого отравления, вызванных употреблением трамадолом, а также для качественной идентификации и количественного определения трамадола в биологических жидкостях организма человека.

Основной целью является диагностика факта употребления трамадола, а также вызванных им состояний опьянения и острой интоксикации с применением клинических и лабораторных методов исследования.

КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Клиническая картина состояний опьянения и острых интоксикаций, вызванных трамадолом, включает комплекс поведенческих и сомато-вегетативных признаков.

Поведенческие (психоэмоциональные) признаки:

- повышенные настроение и активность;
- двигательное возбуждение, сопровождающееся усиленной жестикуляцией;
- речевое возбуждение: при этом речь быстрая, громкая, порой непоследовательная, но внятная;
- синтонность (пациент тонко улавливает настроение собеседника, понимает шутки, реагирует на них), что является наиболее характерным признаком.

Сомато-вегетативные признаки:

- гиперемия лица;
- снижение артериального давления (до 109 ± 5 мм рт. ст.);
- незначительная тахикардия (до 86 ± 8 уд./мин);
- миоз, реакция зрачков на свет снижена.

Прием трамадола в дозах, значительно превышающих терапевтические, может приводить к **острым отравлениям** (передозировкам), для которых характерны потеря сознания, судороги и сердечно-сосудистые нарушения. Риск паралича дыхательного центра при этом практически отсутствует, что отличает клиническую картину острых отравлений трамадалом от таковой при передозировках, вызванных другими опиоидами (героин, метадон).

При наличии двух и более клинических признаков употребления трамадола необходимо произвести отбор проб биологического материала (крови или мочи) для химико-токсикологического исследования.

Окончательная верификация диагноза опьянения проводится только при обнаружении трамадола и его метаболитов в биологических жидкостях при химико-токсикологическом исследовании!

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Анализируемые образцы

Кровь (не менее 10 мл) отбирают в чистый сухой флакон (без добавления консервантов), в который предварительно добавляют 4–5 капель гепарина.

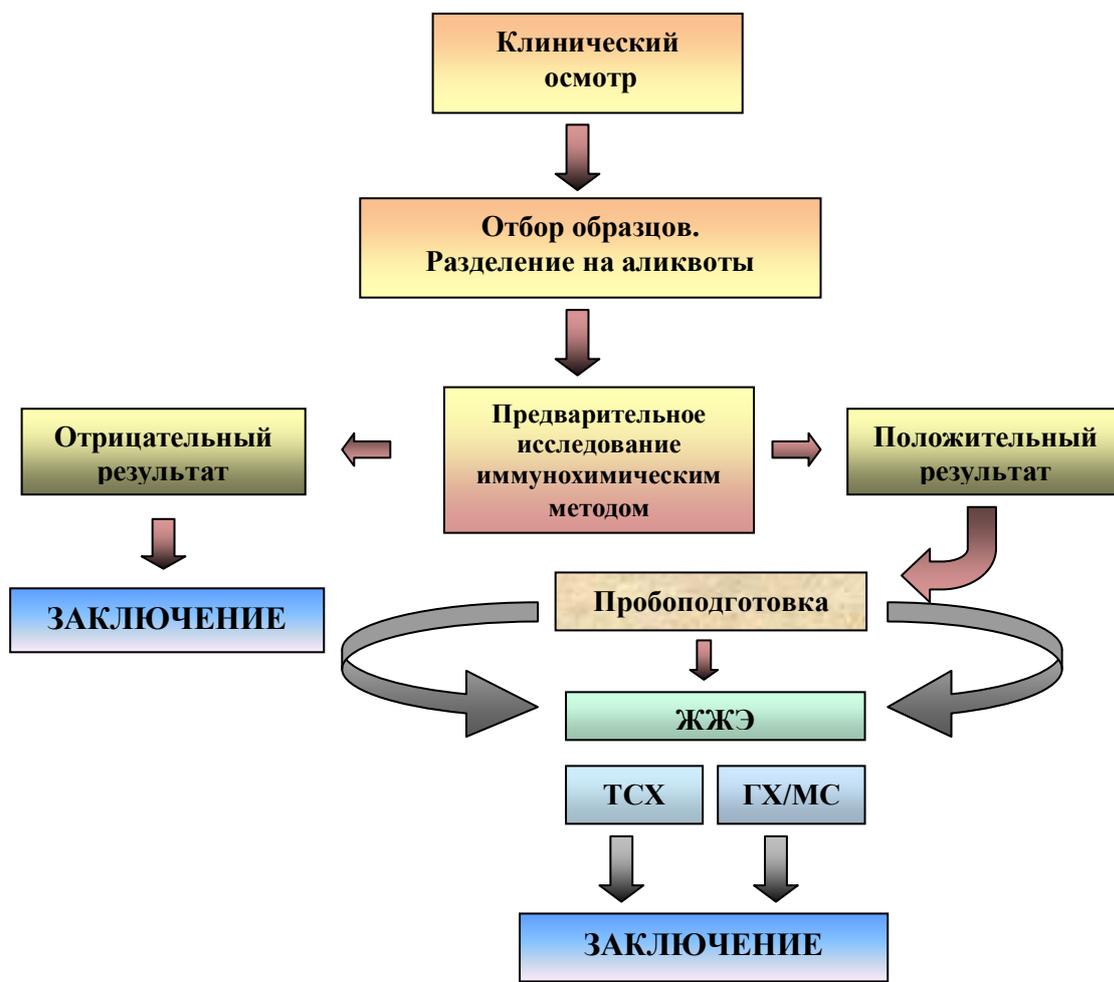
Мочу (не менее 100 мл) собирают в чистую сухую пластиковую или стеклянную посуду без консервантов. Для анализа следует применять только прозрачные образцы, при необходимости мочу следует фильтровать или центрифугировать. Примеси (отбеливатели или другие оксидирующие агенты), попадающие в образцы мочи на преаналитическом этапе, могут давать ошибочные результаты тестирования.

Предварительное исследование

Методом предварительного анализа, позволяющим произвести скрининговый поиск трамадола, является иммунохроматографический – с применением экспресс-тестов. Однако, при использовании тест-полосок имеется вероятность получения ложноположительного результата из-за наличия кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры, поэтому для исключения ошибок при положительном результате в обязательном порядке необходимо проведение подтверждающего химико-токсикологического исследования другим, более специфичным методом.

В случае отрицательного результата при исследовании с помощью экспресс-тестов дальнейший анализ проводить нецелесообразно из-за достаточно высокой чувствительности иммунохимического метода исследования.

На рис. 1 описана последовательность этапов лабораторно-диагностического определения трамадола в биологических жидкостях.



Пробоподготовка

Для выявления трамадола в биологических жидкостях в качестве метода пробоподготовки рекомендуется использовать жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ).

Предварительная очистка пробы

Кровь с антикоагулянтом центрифугируют при 1500 об./мин в течение 5 мин для получения плазмы, которая в дальнейшем подвергается исследованию.

Моча: для исследования следует применять только прозрачные образцы, при необходимости мочу фильтруют через беззольный фильтр (синяя лента) или центрифугируют на общеклинической центрифуге.

Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)

Образец мочи в объеме 20 мл помещают в делительную воронку, подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 11,0–12,0 (по универсальному индикатору). Прибавляют 20 мл смеси органических растворителей в рекомендуемых соотношениях. Можно использовать любую из предлагаемых смесей:

1. Хлороформ – н-бутанол (9 : 1).
2. Хлороформ – изопропиловый спирт (9 : 1).*

* В случае исследования образцов мочи объемом менее 20 мл количество смеси органических растворителей того же объемного состава компонентов пропорционально уменьшают.

Смесь интенсивно встряхивают многократными инверсиями (не менее 30 раз), после разделения фаз отделяют органический слой и пропускают через безводный сульфат натрия в выпарительную чашку*. Для достижения более эффективного концентрирования извлекаемых веществ экстракцию проводят по описанной схеме дважды, а органические извлечения объединяют. Объединенные органические извлечения выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 50 °С. Сухой остаток растворяют в 5 мл хлороформа и аликвоты (точные объемы) полученного извлечения исследуют аналитическими методами, приведенными в инструкции по применению.

* В случае образования стойкой эмульсии при проведении экстракции смесь необходимо центрифугировать при 2500 об./мин в течение 3 мин.

При исследовании крови точно замеренный объем плазмы помещают в экстракционную трубу, подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 11,0–12,0 (по универсальному индикатору), добавляют равный объем смеси органических растворителей, смесь интенсивно встряхивают на планетарном шейкере в течение 10 мин при 120 об./мин, после чего центрифугируют 10 мин при 3000 об./мин, затем фазу органического растворителя отделяют, переносят в выпарительную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 50 °С. Сухой остаток полученного извлечения исследуют методом газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием.

Хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ)

Краткая характеристика метода

Метод хроматографии в тонком слое сорбента основан на принципе сорбции/десорбции веществ в закрепленном слое сорбента при их перемещении подвижной жидкой фазой. В качестве сорбентов используются силикагели, кремниевая кислота, оксид алюминия и др., которые закрепляются на специальных пластинах (подложках), изготавливаемых из стекла, пластифицированной целлюлозы, алюминиевой фольги или политерефталата (ПТФ). В слой сорбента дополнительно может быть введена флюоресцирующая добавка. ТСХ может использоваться как для дополнительной очистки и изолирования определяемых веществ, так и для их идентификации, а в модифицированном виде – в качестве подтверждающего метода исследования (Cut-off 200 мкг/л).

Подготовительные операции

Хроматографическое разделение производят в герметично закрытых стеклянных камерах. Для обеспечения герметичности прилегания крышки шлиф обрабатывают вакуумной силиконовой смазкой или очищенным вазелином.

Приготовление хроматографических систем. Отмеривание компонентов смеси производят с помощью пипеток, мерных пробирок или цилиндров (не менее 2-го класса точности). Смешивание компонентов

осуществляют в мерных цилиндрах или пробирках со шлифом. (*Перемешивание в хроматографической камере недопустимо!*)

Состав рекомендуемых систем:

1. Бензол – этанол – триэтиламин (9 : 1 : 1).
2. Этилацетат – гексан – аммиак (50 : 15 : 2).

Приготовленную систему переносят в хроматографическую камеру, которую закрывают крышкой и не менее 30 мин насыщают парами растворителей. Хроматографические системы могут использоваться не более 4–5 раз.

Для исследования методом ТСХ используются извлечения, полученные жидкость-жидкостной экстракцией.

Нанесение пробы. Две аликвоты извлечения (по 2 мл), полученного из исследуемого образца мочи после проведения пробоподготовки, упаривают в концентрационных чашках до малого объема (приблизительно 200 мкл) и наносят с помощью пастеровской пипетки на стартовую линию двух хроматографических пластин в одну точку несколькими порциями, высушивая каждую порцию в токе воздуха, на расстоянии не менее 10 мм от нижнего края и не менее 15 мм от бокового края. Параллельно в качестве свидетеля на каждую пластину наносят по 20 мкг трамадола в виде хлороформного раствора. Пластины высушивают до удаления запаха растворителей и помещают в подготовленную хроматографическую камеру. Фронт растворителей не должен подниматься выше 5 мм от верхнего края пластины.

После процедуры хроматографического разделения пластины извлекают из камеры и высушивают в токе воздуха до полного удаления запаха растворителей.

Идентификация веществ

После хроматографического разделения одну пластину обрабатывают капельно *1%-м раствором нингидрина в серной кислоте*, нанося реактив от старта до финиша сначала в зону «свидетеля», а затем в исследуемую зону. При этом в зоне трамадола отмечают пятно, окрашенное в розово-малиновый цвет. При последующем добавлении 1–2 капель воды окраска пятна меняется на оранжевую.

Вторую пластину обрабатывают по выбору *реактивом Марки* либо *реактивом Манделина*. При окрашивании пластины реактивом Марки в зоне свидетеля трамадола отмечают оранжево-коричневое пятно, постепенно переходящее в зеленое. При последующем добавлении 1–2 капель воды цвет пятна меняется на изумрудно-зеленый. При обработке пластины реактивом Манделина в зоне трамадола отмечается серо-зеленое окрашивание.

Идентификацию трамадола производят по наличию специфической окраски, а также по соответствию длины пробега вещества (R_f) в сравнении со свидетелем.

Предел обнаружения методом хроматографии в тонком слое составляет 1,0–3,0 мкг в пробе.

Количественное определение

Для количественной оценки содержания трамадола при проведении ТСХ используется денситометрический метод, основанный на регистрации изменения интенсивности светового луча при его отражении от поверхности участка пластины.

Метод предназначен для расчета хроматограммы после окраски хроматографической пластины (размером 100×100 мм) любым неразрушающим реактивом.

Для количественного определения содержания трамадола строят калибровочный график, для чего на хроматографическую пластину в 5 точек наносят 10, 20, 40, 60, 100 мкг трамадола (гидрохлорида) в виде хлороформного раствора. Хроматографическое разделение осуществляют с использованием одной из указанных выше систем растворителей, пластину высушивают до удаления запаха растворителей и обрабатывают реактивом Драгендорфа (в модификации Мунье).

Обработанную пластину помещают в сканер денситометра и подвергают записи в отраженном свете при тех длинах волн, при использовании которых отмечается наибольшее светопоглощение. На основании полученных данных строят калибровочный график зависимости оптической плотности фракций трамадола (А) от содержания стандартного вещества в мкг. Калибровочный график сохраняют в памяти персонального компьютера (ПК) и используют для расчетов содержания трамадола в исследуемых образцах.

Для количественного определения трамадола исследуют 20 мл мочи. Подготовку пробы проводят по схеме, описанной в разделе ЖЖЭ. Полученное органическое извлечение упаривают досуха и растворяют в 5 мл хлороформа. Аликвоту извлечения в количестве 2 мл упаривают до малого объема (200 мкл), наносят в одну точку на пластину и хроматографируют в той же системе растворителей, что и калибровочные растворы трамадола, с последующей обработкой реактивом Мунье. Определение количественного содержания трамадола в соответствующей фракции на хроматографической пластине проводится в автоматическом режиме. Расчет содержания вещества в 1 мл исследуемого образца биологического материала производят по следующей формуле:

$$C = \frac{m \cdot V_2}{V_3 \cdot V_1},$$

где C — содержание вещества (мкг/мл);

m — количество вещества в исследуемой точке на хроматографической пластине, установленное по калибровочному графику (мкг);

V_1 — объем пробы исследуемого образца биологического материала (мл);

V_2 — объем хлороформа, взятого для разведения сухого остатка (мл);

V_3 — объем аликвоты, использованной для количественного определения (мл).

Результаты расчета сводят в протокол, который хранится в памяти ПК, а также распечатывается на принтере.

Газожидкостная хроматография с масс-спектральным детектированием (ГХ/МС)

Краткая характеристика метода

Метод представляет собой сочетание газохроматографического разделения веществ с последующим детектированием их масс-спектральных характеристик.

Газожидкостная хроматография основана на принципе сорбции веществ неподвижной жидкой фазой и дальнейшей их десорбции потоком газа-носителя. Неподвижная жидкая фаза наносится на твердый носитель (набивные колонки) или на стенки тонкого стеклянного капилляра (капиллярные колонки). Способ масс-спектрометрического детектирования основан на регистрации ионизированных молекул веществ. При этом рассчитывают отношение массы заряженных частиц материи к их заряду. Ионизация молекул анализируемого вещества производится в вакууме или в атмосфере газов. Для ионизации применяются различные процессы возбуждения, такие как электронный удар, химическая ионизация, полевая ионизация и др., после чего ионы разделяют и идентифицируют. Разделение ионов основано на их различных траекториях движения в магнитном либо электростатическом полях. Регистрация заряженных частиц производится с помощью фотоумножителей. Обработка сигналов производится с помощью ПК.

Подготовительные операции

Для исследования методом ГХ/МС используются извлечения, полученные с помощью ЖЖЭ. Проба готовится начиная со стадии отбора аликвоты после изолирования. Аликвоту извлечения выпаривают досуха в концентрационной чашке, сухой остаток растворяют в 500 мкл этилацетата и переносят в виалу, которую закрывают крышкой и помещают в автоматический пробоотборник хроматографа, оснащенного масс-спектрометрическим детектором.

Условия разделения

Капиллярная кварцевая колонка DB-5 MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазной пленки 0,25 мкм (5% фенилметилполисилоксана).

Газ-носитель гелий, давление на входе в колонку 3 пси; скорость газа через систему очистки 15 мл/мин в течение 2 мин; скорость в системе регулирующего клапана 19,6 мл/мин; скорость потока газа через колонку 1,0 мл/мин.

Ввод пробы осуществляется в автоматическом режиме; объем пробы 1 мкл, режим ввода с разделением потока 1:4.

Температура инжектора 250 °С, температура колонки изменяется в

программируемом режиме: начальная температура 75 °С поддерживается постоянно в течение 2 мин, далее увеличивается со скоростью 15 град/мин до 280 °С и поддерживается постоянной в течение 15 мин. Длительность исследования составляет 30,67 мин.

Температура интерфейса 280 °С, температура квадруполя 150 °С, температура масс-детектора 230 °С.

Схема анализа:

Перед исследованием пробы анализируемого вещества необходимо:

1. Проверить «остаточную память» колонки: для этого необходим анализ растворителя, используемого для приготовления аналитической пробы.

2. Проверить стабильность параметров хроматографической и детектирующей системы, для этого необходимо произвести анализ реконструирующего раствора, содержащего внутренний стандарт. Повторить исследование 2–3 раза с целью определения воспроизводимости времени удерживания и площади пика внутреннего стандарта.

3. Произвести анализ холостой пробы с целью выявления эндогенных соединений.

Запись хроматограммы начинается с 4-й мин после ввода пробы. Регистрацию производят в режимах Total Ion и Spectrum.

Детектирование ионов проводят при энергии электронной ионизации 70 эВ, режим сканирования ионов от 1,6–800 а.е.м., скорость сканирования 5200 а.е.м./с с шагом 0,1 а.е.м.

Хроматограмму анализируемой пробы обрабатывают с помощью специализированной компьютерной программы, оснащенной библиотеками масс-спектров PMW Tox 3, Wiley C, Wiley 2008, NIST 05, Structures NIST 05, Palisade Complete 600K.

Оценка результатов

Идентификацию всех обнаруженных веществ проводят сравнивая времена удерживания характеристических ионов исследуемых веществ в анализируемой аликвоте извлечения из пробы биологического материала с библиотечными данными. При обнаружении характеристических ионов с достоверностью более 80%, дается заключение о наличии трамадола.

Предел обнаружения опиоидов методом газовой хромато-масс-спектрометрии — 5,0 нг/мл (мкг/л).

Оборудование и материалы

Средства измерения и вспомогательные устройства

- Вакуумный насос.
- Весы лабораторные аналитические с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г.
- Виалы с завинчивающимся колпачком на 2 мл.
- Воронки делительные, стеклянные объемом 250 мл.

- Воронки конические, диаметром 5см.
- Вставки в виалу, стеклянные на 100, 500 мкл.
- Газовая арматура (трубопроводы, редуктор, скобы, штуцера, хомуты и др.).
- Денситометр сканирующий в отраженном свете.
- Дозатор пипеточный с переменным объемом 2–20 мкл.
- Дозатор пипеточный с переменным объемом 20–200 мкл.
- Камеры хроматографические, стеклянные объемом 500 мл.
- Колба мерная 2-5-2 по ГОСТ 1770-74.
- Колба мерная 2а-100-2 по ГОСТ 1770-74.
- Колба мерная 2а-25-2 по ГОСТ 1770-74.
- Патроны с навинчивающейся крышкой.
- Пипетка градуированная 2-1-2-5 по ГОСТ 29227-91.
- Пипетка пастеровская.
- рН-метр лабораторный.
- Секундомер по ГОСТ 5072-79.
- Стаканы по ГОСТ 23932-90.
- Станция управления и сбора хроматографических данных на базе компьютера Pentium 5.
- Флаконы экстракционные БСС-25.
- Флаконы экстракционные объемом 12 мл.
- Форвакуумный насос (в комплекте с хроматомасс-спектрометром).
- Холодильник-морозильник по ГОСТ 16317-95.
- Газовый хроматограф с масс-детектором.
- Лабораторная центрифуга с бакет-ротором.
- Цилиндр 1-100-2 по ГОСТ 1770-74.
- Цилиндр 1-10-2 по ГОСТ 1770-74.
- Цилиндр 1-50-2 по ГОСТ 1770-74.
- Чашка выпарительная, фарфоровая № 3.
- Чашка концентрационная, стеклянная, объемом 10 мл.
- Шейкер планетарный.
- Шпатель по ГОСТ 9147-80.

Реактивы и материалы

- Аммиак, раствор —25%.
- Бензол, х.ч.
- н-бутанол, х.ч.
- Висмута нитрат основной, х.ч.
- Гелий газообразный (сжиженный) очищенный марки «А».
- Гексан, х.ч.
- Дихлорметан (хлороформ), х.ч.
- Изопропиловый спирт, х.ч.

- Калий йодистый, х.ч.
- Кислота азотная концентрированная, х.ч.
- Кислота серная концентрированная, х.ч.
- Кислота уксусная ледяная, х.ч.
- Натрий ванадиевоокислый, х.ч.
- Натрий серноокислый безводный, х.ч.
- Нингидрин, х.ч.
- Пластины хроматографические, ПТСХ-П-В.
- Пластины хроматографические, ПТСХ-П-В-УФ.
- Раствор формальдегида 40%.
- Спирт этиловый зерновой для медицинских целей.
- Триэтиламин, х.ч.
- Уксусно-этиловый эфир (этилацетат), х.ч.

Стандартные вещества сравнения

- Трамадол гидрохлорид, р > 99%.

Приготовление реактивов

Реактив Драгендорфа (в модификации Мунье):

– 8 г основного нитрата висмута растворяют в 20 мл азотной кислоты удельного веса 1,18 и смешивают с раствором йодида калия (содержащим 27,2 г йодида калия в 30 мл воды); полученный раствор переносят в колбу, закрывают пробкой и помещают в темное место на 4–5 сут, после чего фильтруют через бумажный фильтр. Объем фильтрата доводят водой до 100 мл. К 1 мл полученного раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, объем доводят водой до 10 мл.

Реактив Манделина:

– 0,01 г аммония ванадиевоокислого растворяют в 2 мл концентрированной серной кислоты. Используется свежеприготовленный раствор.

Реактив Марки:

– к 10 мл концентрированной серной кислоты прибавляют 0,5 мл формалина, жидкость охлаждают. Реактив хранится в склянке с притертой пробкой.

1%-й раствор нингидрина в серной кислоте:

– на аналитических весах отвешивают 0,05 г нингидрина и растворяют в 5 мл концентрированной серной кислоты. Используют свежеприготовленный раствор после настаивания в течение 20 мин.

* Работа с агрессивными реагентами выполняется в вытяжном шкафу с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями инструкций по охране труда.

Приготовление стандартных растворов:

– на аналитических весах отвешивают 0,0005 г стандартного вещества сравнения (трамадола гидрохлорида) с точностью 0,0001 г, помещают в мерную пробирку со шлифом объемом 5,0 мл, растворяют в хлороформе и объем доводят до метки. Стандартный раствор содержит 500 мкг вещества в 1 мл.