

## АНАЛИЗ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ

Н.М. Солодухина, аспирант, \*М.А. Мягкова, профессор,

\*Т.В. Абраменко, старший научный сотрудник, И.А. Грицкова, профессор

кафедра Химии и технологии высокомолекулярных веществ им. С.С. Медведева,

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

\*Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка

e-mail: naadya@mail.ru

**М**етод латексной агглютинации положен в основу разработки экспресс-определения трех наиболее распространенных наркотических веществ в физиологических жидкостях человека, относящихся к группам опиатов, каннабиноидов, барбитуратов. Созданные тест-системы позволяют надежно, быстро, с высокой достоверностью и минимальными затратами установить факт употребления наркотических субстанций указанных групп.

*The method of latex agglutination was used to develop express diagnostics of the most extended groups of drugs (opiates, cannabinoids and barbiturates). The new reliable, quick and low-cost method of diagnostics confirms the drug abuse intoxication for the groups of the substances mentioned above.*

**Ключевые слова:** латексная агглютинация, полистирольные микросферы, морфин, каннабиноиды, барбитураты, методы диагностики низкомолекулярных соединений.

**Key words:** latex agglutination, polystyrene microspheres, morphine, cannabinoid, barbiturate, diagnostics of low-molecular compounds.

Проблема наркомании в России очень актуальна. Не более двадцати лет назад наркомания была редкой болезнью, но на сегодняшний день она приобрела масштабы катастрофической эпидемии. Число наркоманов в стране, в особенности наркоманов молодого возраста, неуклонно увеличивается. Следствием является рост преступности, связанный с употреблением наркотиков, смертность среди молодежи.

Диагностика была и остается важнейшей частью комплексных мер по предупреждению и борьбе с наркозависимостью в России.

Для определения низкомолекулярных наркотических веществ, в том числе опиатов, каннабиноидов, барбитуратов, используют широкий круг методов. Среди них наиболее важное место занимают методы иммуноанализа, такие как иммунохроматографический (ИХА) [1], иммуноферментный (ИФА) [2, 3], поляризационно-флюоресцентный (ПФИА) [4, 5] методы, иммуноэлектрофорез [6, 7], иммунорадиометрический анализ (ИРМА).

Перспективным направлением для исследователей является поиск новых неизотопных способов иммунохимического анализа, которые не требуют дорогостоящего приборного оснащения и могут использоваться в полевых условиях.

Таким требованиям удовлетворяет метод, основанный на реакции латексной агглютинации, заключающийся в протекании высокоспецифической реакции между антигеном и антителом, один из которых иммобилизован на поверхности полимерных микросфер. В результате агглютинации образуются комплексы, раз-

меры которых во много раз превышают размеры исходных полимерных частиц, что может быть зафиксировано различными методами, в том числе и визуально. Метод используется для скрининг-диагностики, включает выявление различных биомолекул: как белков, так и соединений низкомолекулярного ряда. Данный способ анализа имеет преимущества по сравнению с другими иммунохимическими видами определения. Он отличается простотой исполнения, позволяет одновременно анализировать несколько проб, не включает предварительную обработку анализируемого объекта, исследование не требует высоких материальных затрат. Диагностические тест-системы, полученные на основе полимерных микросфер и работающие по принципу латексной агглютинации, выпускают многие коммерческие зарубежные фирмы. Потребность в создании отечественных диагностикомов подобного типа чрезвычайно велика.

Метаболиты наркотических веществ в моче сохраняются в течение 1-3 суток после последнего употребления. Таким образом, с помощью тест-систем определения наркотических веществ и их метаболитов в моче возможно установить факт приема наркотиков в течение последних нескольких суток.

Цель настоящего исследования состоит в разработке эффективного иммунохимического метода определения наркотических веществ (опиатов, каннабиноидов, барбитуратов) в физиологической жидкости человека (моче) на основе реакции латексной агглютинации с использованием функциональных полистирольных микросфер.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали функциональные полимерные суспензии с узким распределением частиц по размерам со средним диаметром 0.6 мкм. Их получали в присутствии поверхностно активного вещества  $\alpha, \omega$ -бис[10-карбокситедил]-полиметилсилоксана, нерастворимого в водной фазе эмульсии и несовместимого с образующимся раствором, в качестве инициатора использовали персульфат калия. В присутствии такого типа ПАВ образуются полимерные микросферы типа «ядро-оболочка», что позволяет фиксировать в межфазном слое полимерных микросфер определенное количество карбоксильных групп, необходимых для модификации поверхности частицы.

Антитела кроличьи, специфичные к морфину, дельта-9-тетрагидроканнабинолу (ТГК), 5-этил-5-изоамилбарбитурату натрия (барбитамилу) с исходным разведением 1:3000, 1:2000, 1:1000, соответственно, получены ранее [8].

Конъюгированные антигены производных наркотических веществ (морфина, барбитамилу, дельта-9-тетрагидроканнабинола), ковалентно связанных с овальбумином, получены ранее [9, 10].

В работе использовали водорастворимый 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид, неорганические соли и гидроксид натрия квалификации «х.ч.» («Реахим», Россия), фильтр нитроцеллюлозный с диаметром пор 0.2 мкм (Schleicher and Schuell, Германия).

Для оценки диагностической значимости разработанного метода исследования и проверки достоверности результатов анализа, полученных на основе новых иммунохимических латексных тест-систем, были использованы образцы мочи пациентов, предоставленные наркодиспансером № 1, г. Москва.

Сравнительный анализ указанных проб проводили тест-полосками: «Иммунохром-морфин-экспресс», «Иммунохром-марихуанна-экспресс» и «ИХА-барбитураты-фактор» российских производителей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для разработки метода анализа опиатов, барбитуратов, каннабиноидов с помощью метода латексной агглютинации были получены иммунохимические реагенты: конъюгаты полимерных микросфер, модифицированные низкомолекулярными наркотическими веществами, связанными с белковой матрицей (овальбумином). Латексные конъюгаты синтезировали с помощью стандартного карбодиимидного метода с использованием водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида [11].

Был проведен подбор условий для кова-

лентного связывания функциональных групп конъюгированных антигенов и полимерных микросфер. При этом изменяли соотношение компонентов реакции и оценивали эффективность проведения анализа методом латексной агглютинации.

Ниже перечислены параметры, при изменении которых достигалось увеличение эффективности проведения анализа в модельных тест-системах:

- 1) концентрация полимерной суспензии;
- 2) количество моль гаптена, приходящееся на 1 моль белка в белковом конъюгате;
- 3) степень разведения кроличьих антител, специфичных к выбранному наркотическому веществу.

Реализованы оптимальные условия: 4% латексная суспензия, соотношение моль морфина/моль овальбумина = 0.0634, моль барбитамилу/моль овальбумина = 0.0276, моль ТГК/моль овальбумина = 0.021, степень разведения кроличьих антител, специфичных к морфину в концентрации 0.1 % 1/8-1/64, специфичных к ТГК в концентрации 0.1 % 1/16-1/512, специфичных к барбитамилу в концентрации 1 % 1/256-1/512.

Выбор рабочего диапазона разведений для антител кроличьих, специфичных к морфину, барбитуратам и каннабиноидам, проводили с помощью метода прямой латексной агглютинации.

При проведении анализа гаптенных перечисленных выше наркотических веществ определяли эффективность модельных тест-систем по следующим параметрам:

- 1) чувствительность;
- 2) срок сохранения диагностической эффективности тест-системы.

Чувствительность каждого модельного диагностикума проверяли с помощью метода ингибирования латексной агглютинации. Реакцию латексной агглютинации по торможению проводили с пробами, содержащими двукратно снижающиеся концентрации исследуемого вещества. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буферный раствор. Время проведения реакции составляло от 2 до 5 мин.

Результаты прямой и обратной агглютинации определяли визуально по появлению творожистого белого осадка в конечном растворе, что явно отличалось от картины, наблюдаемой в контрольном растворе, где осадка не образовывалось. Фиксировали результат с помощью метода «четырёх плюсов», знак минус ставился в случае полного отсутствия образования осадка.

Результаты по определению чувствительности модельных диагностических систем, созданных на основе полистирольной карбокси-

лированной полимерной суспензии, для определения наркотических веществ (морфина, барбамила, дельта-9-тетрагидроканнабинола) приведены в табл. 1.

Таблица 1. Чувствительность диагностических систем, основанных на реакции латексной агглютинации.

Исследуемое наркотическое вещество	Чувствительность реакции латексной агглютинации для исследуемого вещества, нг/мл
Морфин	300
Барбамил	300
Дельта-9-тетрагидроканнабинол	150

Для оценки диагностической значимости разработанного метода анализа с применением новых тест-систем было выполнено сравнительное определение проб физиологической жидкости человека (мочи) на содержание в них морфина, барбамила, дельта-9-тетрагидроканнабинола. Оценку проводили описанным выше методом латексной агглютинации. Исследовали содержание каждого наркотика в 5 образцах мочи пациентов.

Одновременно образцы биоматериала проверяли на содержание морфина, барбамила, дельта-9-тетрагидроканнабинола двумя независимыми методами: методом иммуноферментного анализа (ИФА) и методом иммунохроматографического анализа (ИХА).

Сравнительные результаты подтверждения диагностической значимости применения в анализе разработанных тест-систем приведены в табл. 2.

Таблица 2. Подтверждение диагностической значимости разработанных тест-систем.

№	Содержание гаптена по данным ИФА, нг/мл	Результат исследования иммунохроматографическим методом	Результат исследования методом латексной агглютинации
1	150	-	-
2	300	+	+
3	70	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	300	+	+
7	100	-	-
8	-	-	-
9	350	+	+
10	-	-	-
11	50	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	150	+	+
15	100	-	-

Данные анализа, представленные в таблице, показывают, что в образцах мочи с отрицательными результатами на наличие наркотических веществ, исследованных методами ИФА и ИХА, не наблюдалось ингибирования реакции латексной агглютинации (РЛА).

В образцах мочи, где методом ИФА определили содержание морфина или барбамила  $\geq 300$  нг/мл, отмечено явное ингибирование РЛА. В остальных случаях ингибирования РЛА не наблюдалось.

В образцах мочи, где методом ИФА определили содержание каннабиноидов  $\geq 150$  нг/мл, также наблюдали ингибирование РЛА. В других случаях ингибирования РЛА не отмечено.

Таким образом, разработанная методика исследования может быть использована на прак-

тике, так как установлено совпадение результатов анализа в 99.5% случаев с подтверждающими независимыми методами определения.

## ВЫВОДЫ

1. В результате работы были получены иммунохимические реагенты для проведения исследования физиологических жидкостей человека на предмет содержания опиатов, барбитуратов и каннабиноидов – конъюгаты полимерных микросфер, модифицированные низкомолекулярными наркотическими веществами, связанными с белковой матрицей.

2. Разработан метод исследования физиологических жидкостей человека на предмет содержания опиатов, барбитуратов и каннабиноидов на основе реакции латексной агглютинации.

3. Созданы и апробированы экспресс-тест-системы на основе метода латексной агглютинации для определения морфина, барбитуратов и каннабиноидов в физиологических жидкостях человека. Чувствительность разработанных тест-систем составила 300 нг/мл для определения морфина и барбитуратов, 150 нг/мл для определения каннабиноидов. Тест-система по моче позволяет выявить факт употребления психотропных веществ в течение 3-х суток с момента последнего употребления.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Воронин А.В., Шаталаев И.Ф., Воеводина Т.В., Пурьгин П.П. Идентификация морфина и кодеина методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях // Вестник СамГУ. 2007. № 6 (56). С. 385–392.
2. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. – М.: Мед. информ. агентство, 2009. 712 с.
3. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
4. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Оборин Д.Б., Малкова Т.Л. Применение метода флуоресцентно-поляризованного иммуноанализа для выявления опиатов в крови // Суд.-мед. экспертиза. 2006. № 1. С. 20–24.
5. Mahler M., Ngo J.T., Schulte-Pelkum J., Luettich T., Fritzler M.J. Limited reliability of the indirect immunofluorescence technique for the detection of anti-Rib-P antibodies // Arthritis Res. & Therapy. 2008. V. 10. № 68. P. 131–136.
6. Bando S., Oishi K. The detection for *Streptococcus pneumoniae* antigen // [Nippon Rinsho](#). 2010. V. 6. P. 169–171.
7. Kelsey M.C., Reed C.S. Countercurrent immunoelectrophoresis: Improved detection of pneumococcal capsular antigens in sputum by incorporation of a carboxylated derivative of phenyl boronic acid // J. Clin. Pathol. 1979. V. 32. № 9. P. 960–962.
8. Мягкова М.А., Морозова В.И., Валуев Д.И. Создание иммунохимических диагностических тест-систем для выявления лиц, злоупотребляющих наркотическими препаратами // Здравоохранение Башкартостана. 2002. № 2. С. 156–158.
9. Демерчян Ш.А., Петроченко С.Н., Копоров Д.С., Мягкова М.А., Абраменко Т.В., Фурсова А.Д., Смирнов А.В., Воложин А.В. Разработка иммуноферментного анализа иммуноглобулинов класса А, связывающих производные опиатов, каннабиноидов, амфетаминов в слюне и сыворотке крови у больных наркоманией // Биотехнология. 2007. № 2. С. 91–96.
10. Даньков Ю.В., Полевая О.Ю., Мягкова М.А. Твердофазный ИФА количественного определения барбитуратов // Суд.-мед. экспертиза. 1993. Т. 36. № 1. С. 39–42.
11. Солодухина Н.М., Абраменко Т.В., Мягкова М.А., Грицкова И.А. Латексные микросферы для определения морфина в физиологических жидкостях человека // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 2. С. 55–59.