

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

EXPRESS METHOD FOR OPIATE DETECTION IN HUMAN PHYSIOLOGICAL LIQUIDS

**Н.М. Солодухина^{1*}, Т.В. Абраменко², В.В. Пушкина², В.С. Морозова²,
М.А. Мягкова², И.А. Грицкова¹**

**N.M. Solodukhina^{1*}, T.V. Abramenko², V.V. Pushkina², V.S. Morozova²,
M.A. Myagkova², I.A. Gritskova¹**

¹ Московская государственная академия тонкой химической технологии

² Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

¹ Moscow State Academy of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russia

² Institute of Physiologically Active Compounds at Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: определение морфина, методы анализа опиатов в моче человека, латексная агглютинация

KEY WORDS: morphine detection, opiates, express test, human urine, latex agglutination

РЕЗЮМЕ: Разработан и апробирован экспресс-метод для определения морфина в биологической жидкости человека с помощью метода латексной агглютинации. Метод позволяет быстро (в течение 3–5 мин), надежно и с минимальными затратами реагентов определить факт приема наркотических средств группы опиатов.

ABSTRACT: A new express method for analysis of opiate in human physiologic liquids by the latex agglutination-inhibition method was developed and approved. The reliable method of analysis enables detecting opiates in human urine within 3–5 minutes with minimum materials used. This work had the purpose of synthesis of the conjugates polystyrene microspheres — morphine — ovalbumin (L1-M-Ov) and polystyrene methacrylate microspheres — morphine — ovalbumin (L2-M-Ov) for development of the diagnostic test-system. During the work the optimal conditions for the agglutination-inhibition test were found. The polystyrene suspension (L1) and polystyrene methacrylate suspension (L2) were used as the carriers of the protein ligand — morphine-ovalbumin. During the work the suitable concentrations of latex suspensions L1 and L2 were found. It was 4% for both L1 and L2 suspensions. The appropriate concentration of morphine-ovalbumin was found (0.1 mg/ml for L1 latex suspensions and 1 mg/ml for L2 latex suspensions). It was found that the conjugate L1-M-Ov, which contains 0.1 mg/ml of morphine-ovalbumin, works within the

1/8–1/512 antibody dilution. The conjugate L2-M-Ov, which contains 1 mg/ml of morphine-ovalbumin works within the 1/64–1/256 antibody dilution. The agglutination-inhibition test, based on the L1 suspension was performed using the conjugate L1-M-Ov, which contains 0.1 mg/ml of morphine-ovalbumin and antibodies, specific to morphine in dilution 1/265. The sensitivity of the test was 500 ng/ml. The agglutination-inhibition test, based on the L2 suspension was performed using the conjugate L1-M-Ov, which contains 1 mg/ml of morphine-ovalbumin and antibodies, specific to morphine in dilution 1/128. The sensitivity of the test was 300 ng/ml.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в нашей стране злоупотребление наркотиками приобретает все более широкие масштабы и негативно влияет на все сферы деятельности человека. Начальным этапом выявления и предупреждения наркомании являются массовые обследования людей с помощью скрининговых методов анализа. К ним в первую очередь относятся способы, включающие различные методы иммуноанализа с инструментальной либо визуальной детекцией. Наибольшее распространение получили иммунофлуоресцентный (Gandh et al., 2008), иммуноферментный (Collison et al., 1998; Бызова и др., 2009), иммунохроматографические (Катаев и др., 2006) методы.

Большое значение имеет разработка методов экспресс-диагностики для быстрого и достоверного

* Адрес для переписки: Солодухина Н.М.; 142432 Московская область, Ногинский р-н, г. Черноголовка, Северный проезд, 1; e-mail: naadya@mail.ru

выявления факта употребления наркотических веществ в «полевых» условиях (в отсутствие приборного оснащения).

В настоящее время для проведения экспресс-анализа на выявление опиатов в биологических жидкостях человека используются иммунодиагностические тест-системы, включающие применение функциональных частиц монодисперсных суспензий. Такие тест-системы позволяют получить достоверный результат, обладают высокой скоростью проведения анализа (10—15 мин), простотой интерпретации полученных результатов, низкой стоимостью исследования. (Bryden, 1995; Camargos et al., 1995; Kimiko, 1996).

Принцип работы указанных диагностических тест-систем основан на высокоспецифичной иммунохимической реакции между антигеном и антителом, которые предварительно иммобилизовали на полимерные носители. При проведении анализа полимерные конъюгаты, содержащие антигены и антитела, взаимодействуют и образуют пространственные сетки — агломераты, наличие которых в растворе может быть зарегистрировано различными методами. Например, методом спектрофотометрии, нефелометрии или простым визуальным наблюдением.

Цель нашего исследования — разработка экспресс-теста для определения опиатов в биологических жидкостях человека на основе использования монодисперсных полимерных частиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные материалы

Полистирольные микросферы с диаметром 0,6 мкм (Л1) и полистиролметакриловые микросферы с диаметром 0,7 мкм (Л2), содержащие на поверхности карбоксильные группы, были синтезированы методом гетерофазной полимеризации. Антитела кроличьи, специфичные к морфину, а также белковый конъюгат морфин-овальбумин предоставлены лабораторией иммунохимии ИФАВ РАН. В работе использовали водорастворимый мета-толуолсульфонат-1-циклогексил-(2-морфолилэтил)карбодиимид («Реахим», Россия), неорганические соли и гидроксид натрия квалификации «х.ч.» («Реахим», Россия), фильтр нитроцеллюлозный с диаметром пор 0,2 мкм (Schleicher and Schuell, Германия).

Синтез конъюгатов морфин-овальбумин и полимерные микросферы — морфин-овальбумин

Конъюгаты морфин-овальбумин (М-Ов), полимерные микросферы Л1 — морфин-овальбумин (Л1-М-Ов) и полимерные микросферы Л2 — морфин-овальбумин (Л2-М-Ов) были синтезированы с помощью стандартного карбодиимидного метода. Раствор водорастворимого метатолуолсульфонат-1-циклогексил-(2-морфолилэтил)карбодиимида выдерживали с раствором полимерной суспензии в течение часа при перемешивании при комнатной температуре. Полученный раствор отфильтровывали с помощью нитроцеллюлозного одноразового фильтра с диаметром пор 0,2 мкм, фильтрат растворяли в дистиллированной воде и выдерживали с раствором М-Ов в течение часа при умеренном

перемешивании. Далее промытый глициновым буфером (рН 5,0), а затем фосфатным (рН 7,5) буфером раствор конъюгата выдерживали в ультразвуковой ванне и хранили при температуре 4 °С с добавлением азида натрия.

Проведение реакции прямой латексной агглютинации

Выбор рабочего диапазона разведений для антител кроличьих, специфичных к морфину (Ат), проводили с помощью прямой латексной агглютинации. Антитела были предварительно раститрованы с шагом 1:2 с помощью фосфатного буфера (рН 7,5).

Для проведения реакции латексной агглютинации на стеклянной пластинке смешивали по 15 мкл раствора Ат с конъюгатом Л-М-Ов. Для проведения контрольного эксперимента на стеклянной пластинке смешивали по 15 мкл дистиллированной воды с конъюгатом Л-М-Ов.

Результаты прямой агглютинации определяли визуально по появлению творожистого белого осадка в каплях. В контрольной капле осадка не образовывалось, раствор оставался прозрачным.

Фиксировали результат с помощью метода «четырёх плюсов», знак минус ставился в случае полного отсутствия образования осадка, т.е. отсутствия реакции латексной агглютинации.

Проведение торможения реакции латексной агглютинации

Антитела с выбранным оптимальным разведением (1/8—1/512 с конъюгатом Л1-М-Ов и 1/64—1/256 с конъюгатом Л2-М-Ов) использовали в проведении реакции латексной агглютинации по торможению. На стеклянной пластинке смешивали при комнатной температуре по 5 мкл раствора морфина, предварительно раститрованного с шагом 1:2, и Ат в выбранном разведении, и по 10 мкл конъюгата Л-М-Ов.

Результаты реакции латексной агглютинации по торможению определяли визуально по появлению или отсутствию творожистого белого осадка в каплях. Фиксировали результат с помощью метода «четырёх плюсов», знак минус ставился в случае полного отсутствия образования осадка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работа была направлена на синтез конъюгатов Л1-М-Ов и Л2-М-Ов для разработки диагностической тест-системы и на поиск оптимальных условий проведения латексной агглютинации по торможению. Частицы полистирольной и полистиролметакриловой суспензий применялись в качестве носителей комплекса морфин-овальбумин (М-Ов).

Был проведен выбор рабочей концентрации полистирольных микросфер с карбоксильными группами на поверхности. Иммобилизацию М-Ов проводили при концентрациях полистирольной суспензии 6, 4 и 2%. Результаты влияния концентрации полистирольной суспензии на эффективность реакции латексной агглютинации представлены в таблицах 1 и 2.

Как видно из представленных значений, оптимальная рабочая концентрация полистирольных частиц составляет 4% для двух типов полимерных

суспензий. Показано, что в случае использования как полистирольных, так и полистиролметакрилатных частиц получен достоверный результат анализа при минимальном расходе вещества.

Следующим этапом работы было проведение серии экспериментов по иммобилизации морфин-овальбумина на полистирольные микросферы обоих типов. При отработке оптимальных условий реакции конъюгации использовали широкий диапазон концентраций М-Ов (0,01—2 мг/мл). Было изучено влияние концентрации биолиганда М-Ов, ковалентно иммобилизованного на поверхность полимерных микросфер, на эффективность реакции латексной агглютинации. Полученные результаты представлены в таблицах 3 и 4.

ковалентно иммобилизованного на полистирольные микросферы, вероятно, заключается в отсутствии возможности кроличьим антителам, специфичным к морфину, приблизиться к иммобилизованному на поверхности полистирольных частиц антигену на расстояние, необходимое для образования ковалентной связи.

Известно, что морфин является низкомолекулярным веществом и его нельзя выявить при проведении прямой реакции латексной агглютинации. Для выявления морфина используют реакцию торможения латексной агглютинации, которая заключается в конкуренции между латексным конъюгатом и раствором морфина за связывание специфичных антител к морфину.

Таблица 1. Влияние концентрации полистирольной суспензии Л1 на эффективность реакции латексной агглютинации

| Рабочая концентрация полистирольной латексной суспензии | 8% | 6% | 4% | 2% |
|---|-----|------|------|----|
| Эффективность реакции латексной агглютинации | +++ | ++++ | ++++ | + |

Таблица 2. Влияние концентрации полистиролметакрильной суспензии Л2 на эффективность реакции латексной агглютинации

| Рабочая концентрация полистиролметакрильной латексной суспензии | 8% | 6% | 4% | 2% |
|---|----|-----|------|----|
| Эффективность реакции латексной агглютинации | ++ | +++ | ++++ | + |

Таблица 3. Подбор оптимальной концентрации морфин-овальбумина, иммобилизованного на полистирольные частицы Л1

| Иммобилизация морфин-овальбумин на полистирольные частицы Л1, мг/мл | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 0,01 |
|---|----|-----|------|------|------|
| Оценка эффективности латексной агглютинации | ++ | ++ | ++++ | ++ | ++ |

Таблица 4. Подбор оптимальной концентрации морфин-овальбумина, иммобилизованного на полистиролметакрилатные частицы Л2

| Иммобилизация морфин-овальбумин на полистиролметакрилатные частицы Л2, мг/мл | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 |
|--|------|-----|-----|------|
| Оценка эффективности латексной агглютинации | ++++ | ++ | ++ | + |

В ходе эксперимента было установлено, что агглютинация протекает наилучшим образом при концентрации морфин-овальбумина, равной 0,1 мг/мл.

Реакция агглютинации наблюдалась при концентрации морфин-овальбумина, равной 1 мг/мл.

Причина более интенсивного слипания частиц в реакции иммунной латексной агглютинации при увеличении концентрации антигена (от 0,01 мг/мл до 0,1 мг/мл), ковалентно иммобилизованного на полистирольные микросферы, может быть связана с прямопропорциональной зависимостью количества антигена и образующихся связей в конечном конъюгате Л1-М-Ов.

Причина менее эффективного процесса слипания частиц в реакции латексной агглютинации при максимальном количестве антигена (1 мг/мл),

При проведении реакции латексной агглютинации по торможению на первом этапе работы выбрали рабочий диапазон разведений для антител кроличьих, специфичных к морфину. Такую работу проводили для каждого конъюгата Л1-М-Ов и Л2-М-Ов, содержащих различное количество морфин-овальбумина, связанного с полистирольными микросферами. Результаты представлены в таблицах 5 и 6.

Проведенный анализ показывает, что конъюгат Л1-М-Ов, полученный при иммобилизации морфин-овальбумина, взятого в концентрации 0,1 мг/мл, работает в наиболее широком диапазоне разведений Ат (1/8-1/512).

Установлено, что конъюгат Л2-М-Ов, полученный при ковалентном связывании морфин-овальбумина в концентрации 1 мг/мл, участвует в реак-

Таблица 5. Подбор рабочего диапазона разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину, при участии конъюгата Л1-М-Ов

| | | | | | |
|---|------------|------------|-----------|------------|------------|
| Концентрация морфин-овальбумина, иммобилизованного на полистирольных частицах Л1, мг/мл | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 0,01 |
| Рабочий диапазон разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину | 1/64—1/256 | 1/64—1/128 | 1/8—1/512 | 1/32—1/128 | 1/16—1/512 |

Таблица 6. Подбор рабочего диапазона разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину, при участии конъюгата Л2-М-Ов

| | | | | | |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Концентрация морфин-овальбумина, иммобилизованного на полистиролметакрильных частицах Л2, мг/мл | 1 | 0,5 | 0,1 | 0,05 | 0,01 |
| Рабочий диапазон разведений для кроличьих антител, специфичных к морфину | 1/64—1/256 | 1/32—1/64 | 1/32—1/64 | 1/32—1/64 | 1/32—1/64 |

ции латексной агглютинации в наиболее широком диапазоне разведений Ат (1/64-1/256).

При проведении реакции латексной агглютинации по торможению на втором этапе работы проводили подбор оптимальной концентрации реагентов. Для получения тест-системы для выявления морфина на основе полистирольной латексной суспензии выбрали следующие реагенты:

- конъюгат Л1-М-Ов, полученный при иммобилизации морфин-овальбумина, взятого в концентрации 0,1 мг/мл;
- специфические антитела к морфину с разведением 1/256.

Чувствительность тест-системы на основе полистирольной латексной суспензии составила 500 нг/мл.

Для получения тест-системы для выявления морфина на основе полистиролметакрилатной латексной суспензии выбрали следующие реагенты:

- конъюгат Л2-М-Ов, полученный при иммобилизации морфин-овальбумина, взятого в концентрации 1 мг/мл;
- специфические антитела к морфину с разведением 1/128.

Чувствительность тест-системы на основе полистиролметакрилатной латексной суспензии составила 300 нг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отработаны оптимальные условия синтеза конъюгатов для определения морфина с использованием частиц полистирольной и полистиролметакрилатной суспензий. При сравнении результатов, полученных при участии двух типов полимерных суспензий, наилучший результат установлен для тест-системы, разработанной на основе полистиролметакрилатной суспензии. Чувствительность в этом случае составила 300 нг/мл. С точки зрения аналитического использования полученного диагностикума в медицинской практике, такой чувствительности достаточно для эффективного

проведения исследований на выявление опиатов в биологических жидкостях человека.

Результаты тест-системы успешно подтверждены независимыми методами с использованием иммуноферментного и иммунохроматографического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

Бызова Н.А., Свиридов В.В., Гаерилова Н.Ф., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., Генералова А.Н., Лукин Ю.В., Черкасова В.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная системы детекции дифтерийного токсина // Биоорганическая химия. 2009. № 4. С. 533—541.

Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Оборин Д.Б., Малкова Т.Л. Применение метода флуоресцентно-поляризованного иммуноанализа для выявления опиатов в крови // Судбно-медицинская экспертиза. 2006. № 1. С. 20—24.

Aoki K., Shikama Y.S., Kokado A., Yoshida T., Kuroiwa Y. Enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination inhibition reaction test for morphine in urine // Forensic Science International. 1996, 81(2-3):125—132.

Bryden A.S. The evaluation of a combined «dry» latex agglutination test for detecting rotaviruses and adenoviruses in faeces // Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease. 1995, 7(3):129—131.

Camargos P.A., Almeida M.S., Cardoso I., Filho G.L., Filho D.M., Martins J.I., Batista K.W., Silva R.C., Antunes C.M. Latex particle agglutination test in the diagnosis of Haemophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae and Neisseria meningitidis A and C meningitis in infants and children // Journal of Clinical Epidemiology. 1995, 48(10):1245—1250.

Collison I.B., Spiehler V.R., Guluzjan S., Sedgwick P.R. Setting cutoff concentrations for immunoassay screening of post-mortem blood // J Forensic Sci. 1998, 43:390—394.

Gandhi S., Sharma P., Capalash N., Verma R.S., Suri R.C. Group-selective antibodies based fluorescence immunoassay for monitoring opiate drugs // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008, 392(1-2):215—222.