ХИМИЯ И ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 543:541

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ ТРАМАДОЛА В ВИДЕ ИХ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТОРОМ

А.Б. Мелентьев (1), Д.Г. Ким (2)
e–mail: melentjev_a@mail.ru (1), kim@csu.ru (2)

(1) Областное бюро судебно–медицинской экспертизы, г. Челябинск, Россия

(2) Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

Статья поступила 10 января 2003 г.

Введение

Трамадол, (±)транс–2–[(диметиламино)метил]–1–(3–метоксифенил)–1–циклогексанол, широко применяется в клинической практике как анальгетик, сочетающий опиоидный и неопиоидный механизмы действия, обусловленные различными оптическими изомерами [1, 2]. В практике судебно–медицинской и наркологической службы встречались случаи применения наркозависимыми лицами трамадола вместо героина или совместно с героином [3], иногда со смертельным исходом от передозировки.

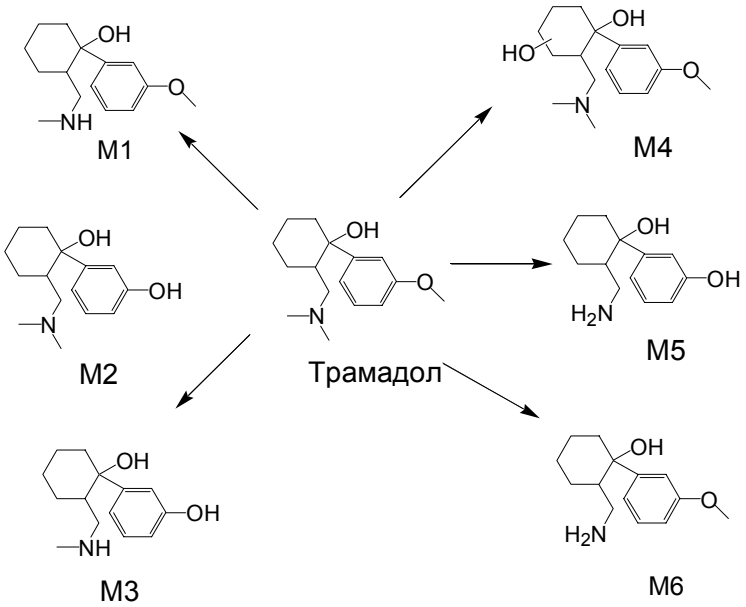

Рис. 1. Схема биотрансформации трамадола

Для обнаружения факта приема сильнодействующих и наркотических веществ (СНВ) в химико–токсикологическом анализе наиболее часто применяется методика скрининга по анализу мочи методом газовой хроматографии с масс селективным детектором (ГХ/МСД) [4—6]. Для

того, чтобы методом газовой хроматографии можно было эффективно анализировать полярные, труднолетучие соединения, перед анализом обычно используют дериватизацию (получение производных). Наиболее популярный дериватизирующий агент — уксусный ангидрид. Известно, что в организме человека трамадол быстро трансформируется с образованием ряда метаболитов. Схема биотрансформации трамадола по данным [8—9] приведена на рис. 1. Идентификации трамадола и его метаболитов методом газовой хроматографии и ГХ/МСД посвящено ряд работ [8—12]. Однако описанные в этих работах пять продуктов реакции метаболитов трамадола с уксусным ангидридом не исчерпывают весь спектр соединений, обнаруженных нами в ходе проведения химико–токсикологических анализов. Данная работа предпринята с целью идентификации и расшифровки структур продуктов реакции метаболитов трамадола с уксусным ангидридом.

1. Методика исследования

1.1. Материалы и методы исследования

Все растворители и реактивы были квалификации не ниже «ч.д.а», пиридин перед использованием был обезвожен и перегнан, уксусный ангидрид также был перегнан перед использованием. Гидрохлориды этилморфина и трамадола были фармацевтического качества. Трамадол получали из гидрохлорида по методу, описанному в [8].

N–оксид трамадола получали добавлением к 20 мг трамадола, растворенным в 1 мл метанола, 30 мкл 33 % раствора пероксида водорода с нагреванием смеси в герметичном флаконе в течение 10 часов при 70 °С. К смеси добавляли 20 мг активированного угля, доводили раствор до кипения и фильтровали.

1.2. Подготовка проб мочи для анализа методом ГХ/МСД

Для идентификации метаболитов трамадола использовали пробы мочи, в которых ранее были обнаружены трамадол и его метаболиты. Для подготовки проб мочи к газохроматографическому анализу использовали стандартную методику пробоподготовки мочи для скрининга СНВ, которая разработана в Челябинском областном бюро судебно–медицинской экспертизы. К 1 мл мочи добавлялись 50 мкл этанольного раствора этилморфина (0,02 г/л), 0,2 мл концентрированной соляной кислоты. Виалу герметично закрывали и раствор нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли 0,20 мл 30 % раствора едкого натра и около 100 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора (pH = 8,4–8,6). Объект экстрагировали 5 мл смеси хлороформ — бутанол–2 (6:1 по объему). Смесь встряхивали 5 мин для перемешивания и центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 5 мин. Органический экстракт пропускали через 0,5 г безводного сульфата натрия и испаряли в токе воздуха досуха при температуре не выше 40 °С. К сухому остатку добавляли 50 мкл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3:2 по объему) и смесь нагревали в герметичной полипропиленовой пробирке 20 минут при 80 °С. Избыток реагентов испаряли в токе воздуха при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл этилацетата и 1 мкл исследовали методом ГХ/МСД.

1.3. Газохроматографический анализ

Газохроматографический анализ образцов проводили на газовом хроматографе фирмы Hewlett Packard HP–5890 серии II с масс селективным детектором HP–5972 при следующих условиях: газохроматографическая колонка HP5 — MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм, начальная температура колонки 80 °С, выдержка 1,0 мин, увеличение температуры со скоростью 40 град/мин до 200 °С, дальнейшее увеличение температуры со скоростью 12,5 град/мин до 300 °С с выдержкой при конечной температуре 5,5 мин. Режим постоянного потока «Constant flow» 1,3 мл/мин. Температура инжектора 250 °С, устройства сопряжения с детектором 285 °С. Ввод пробы без разделения потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:15 (Split/Splitless). Режим сканирования ионов от 50 до 550 атомных единиц массы.

2. Обсуждение результатов

Идентификация и расшифровка структур продуктов ацетилирования трамадола и его метаболитов проведены по следующей схеме:

– На первом этапе выделялись все не идентифицированные пики на хроматограммах образцов, в которых обнаружены трамадол и его метаболиты. Как возможные продукты реакции метаболитов трамадола с уксусным ангидридом принимались только пики, которые повторялись не менее, чем в двух различных образцах с трамадолом, но отсутствовали на хроматограммах «холостых» образцов мочи.
– На втором этапе проанализированы все возможные продукты реакции уксусного ангидрида с трамадолом и известными его метаболитами. Основная проблема на данном этапе работы в том, что под действием уксусного ангидрида параллельно проходят две конкурирующие реакции — ацетилирование OH– и NH–групп и отнятие воды с образованием двойной связи в циклогексановом фрагменте молекулы. Поэтому из одного соединения в результате реакции может получиться несколько производных.
– На третьем этапе была проведена предварительная идентификация предполагаемых продуктов реакции метаболитов трамадола с уксусным ангидридом по их молекулярным ионам.
– На заключительном этапе проведена идентификация продуктов с одинаковым молекулярным ионом и их соотнесение со структурой по характерной дефрагментации молекулярного иона под действием электронного удара.

В таблице приведены газохроматографические (времена удерживания и индексы удерживания по н–алканам) и масс–спектральные (основные характеристические ионы) характеристики идентифицированных соединений.

Проведенная идентификация показала, что в образцах мочи лиц, употреблявших трамадол, идентифицировано двадцать пять продуктов взаимодействия трамадола и его метаболитов с уксусным ангидридом. Кроме известных ранее шести метаболитов трамадола (см. рис. 1), обнаружено еще пять.

Первый неизвестный ранее метаболит 1–(3–метоксифенил)циклогексен (M7) — это продукт одновременного отщепления от молекулы трамадола боковой цепи и молекулы воды. Его структура приведена на рис. 2. Метаболит M7 появляется только в образцах мочи, он не идентифицируются, как и все описанные ниже соединения, при анализе по аналогичной методике самого трамадола, то есть не являются продуктами термического разложения трамадола в инжекторе газового хроматографа. Соединение N–оксид(1–(2–[(диметиламино)метил]–1–(3–метоксифенил))циклогексен (M8) представляет собой N–оксид трамадола с отщепленной молекулой воды. Строение этого соединения доказано нами встречным синтезом по методике, описанной выше. Основной продукт, полученный нами известным способом синтеза N–оксидов при помощи пероксида водорода, имел те же хроматографические и масс–спектральные характеристики, что и обнаруженный на хроматограммах образцов мочи. Метаболит 2–[(метиламино)метил]–1–(3–метоксифенил)–1,*n*–циклогександиол, (где *n* — 3, 4 или 5) — (M9) это продукт дальнейшей биотрансформации уже известных метаболитов (см. рис. 2). Он имеет 2 изомера, которые могут быть связаны либо с различным положением OH– группы в циклогексановом кольце, либо это Z– и E– изомеры с различным положением OH– группы по отношению к поверхности циклогексанового кольца. В литературе описаны попытки определить положение OH– группы в продукте гидроксилирования трамадола [13], однако авторы смогли только определить, что гидроксилирование происходит в одно из трех 3, 4 или 5 положений циклогексанового фрагмента молекулы трамадола.

Кроме того, нами замечено, что в образцах мочи от разных людей, количества изомеров могут значительно варьировать, вплоть до полного отсутствия одного из изомеров на хроматограмме. Соединения 2–[(диметиламино) метил]–1–(3–гидроксифенил)–1,*n*–циклогександиол, (где *n*–3,4 или 5) — (M10) и 2– [(метиламино) метил]–1–(3–гидроксифенил)–1,*n*–циклогександиол, (где *n*–3,4 или 5) — (M11) —это также продукты дальнейшей биотрансформации известных метаболитов. Они также должны иметь по 2 изомера, однако нами не обнаружено заметного количества второго изомера для M10 (см. рис. 2). На основании проведенной идентификации продуктов ацетилирования метаболитов трамадола нами предложена уточненная схема первичной биотрансформации трамадола в организме человека (без учета дальнейшей конъюгации метаболитов с глюкуроновой кислотой), приведенная на рис. 2.

Газохроматографические и масс спектральные характеристики продуктов взаимодействия уксусного ангидрида с трамадолом и его метаболитами

№ п. п.	Соединение	Время удерживания, мин	Индекс удерживания RI(HP–5)	Мол. масса	Характеристические ионы (относительная интенсивность, %)				
2	Tr — H_2O	6,45	1890	245	58(100)	115(6)	128(5)	121(4)	245(3)
3	(M1 —H_2O) Ac	6,72	1945	273	258(100)	186(91)	58(81)	273(54)	187(36)
4	(M2 —H_2O) Ac	7,07	2010	273	58(100)	107(3)	115(3)	128(3)	273(2)
5	M8	7,19	2035	261	189(100)	121(61)	73(50)	202(36)	261(30)
6	Tr Ac	7,32	2060	305	58(100)	188(6)	59(4)	116(1)	305(1)
7	M2 1Ac	7,60	2105	291	58(100)	291(9)	119(4)	121(4)	65(3)
8	M2 2Ac	7,92	2160	333	58(100)	174(7)	59(4)	121(3)	333(1)
9	[M9 (изомер 1) — $2H_2O$] Ac	8,02	2175	271	186(100)	158(56)	271(27)	212(23)	157(22)
10	(M6 —H_2O) Ac	8,16	2195	303	58(100)	137(3)	77(2)	102(2)	303(2)
11	[M9 (изомер 2) — $2H_2O$] Ac	8,35	2230	271	186(100)	158(61)	271(31)	159(29)	145(19)
12	(M6 (изомер 1) 2Ac	8,57	2270	363	58(100)	174(10)	199(5)	146(3)	363(2)
13	(M10 —H_2O) 2Ac	8,75	2300	331	58(100)	200(8)	230(5)	172(4)	331(2)
14	M6 1Ac	8,90	2325	321	58(100)	321(11)	135(4)	59(3)	84(3)
15	[M6 (изомер 2)] 2Ac	9,02	2345	363	58(100)	186(17)	59(4)	363(3)	135(3)
16	M1 1Ac	9,33	2395	291	291(100)	135(90)	114(75)	150(65)	248(42)
17	(M5 —H_2O) 2Ac	9,36	2400	287	186(100)	228(25)	72(17)	158(17)	287(15)
18	[M9 (изомер 1)–H_2O] 2Ac	9,43	2410	331	186(100)	258(34)	157(25)	158(23)	331(16)
19	[M9 (изомер 2)–H_2O] 2Ac	9,58	2440	331	116(100)	331(10)	72(6)	186(5)	228(3)
20	(M3 — H_2O) 2Ac	9,72	2465	301	86(100)	186(70)	301(29)	228(28)	74(24)
21	M4 2Ac	9,94	2500	319	114(100)	319(99)	44(99)	43(98)	121(60)
22	M1 2Ac	9,98	2505	333	200(100)	188(35)	274(23)	86(22)	333(4)
23	M3 3Ac	10,57	2605	361	116(100)	361(8)	72(7)	319(3)	137(2)
24	[M11 (изомер 1) — H_2O] 3Ac	10,66	2620	359	144(100)	57(90)	107(17)	359(17)	186(10)
25	[M11 (изомер 2) — H_2O] 3Ac	10,87	2660	359	144(100)	57(39)	359(11)	107(11)	186(6)

Примечание: (Tr) — трамадол; (M1) — метаболит, номер которого соответствует номеру на рис. 1 и 2; (–H_2O) — продукт с отщепленной молекулой воды; (2Ac) — количество ацетилированных групп в молекуле продукта.

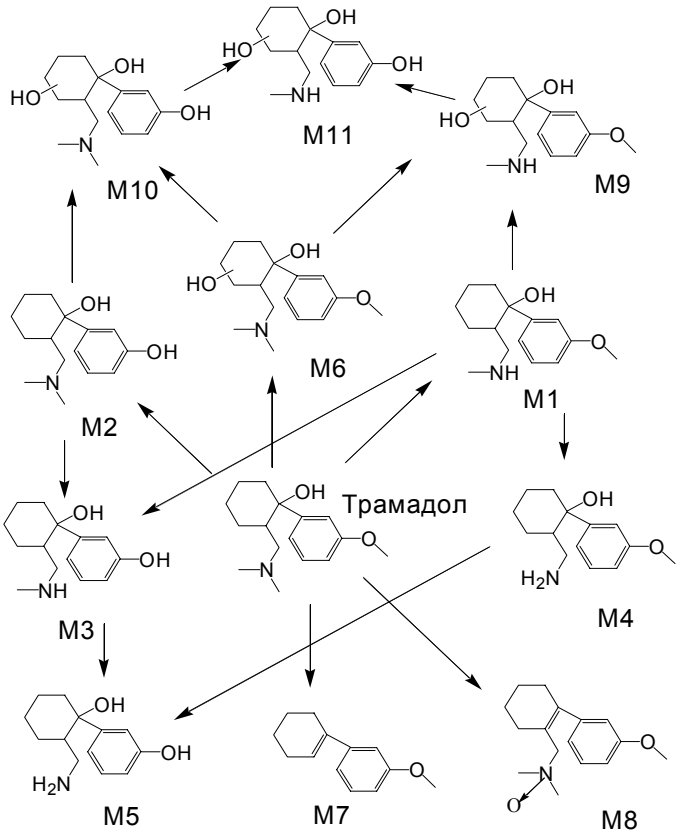

Рис. 2. Уточненная схема биотрансформации трамадола

Заключение

1. Методом газовой хроматографии — масс спектрометрии идентифицированы продукты реакции трамадола и его метаболитов с уксусным ангидридом.
2. Обнаружено пять не описанных ранее в литературе метаболитов трамадола.
3. Расшифрованы структуры и определены газохроматографические характеристики двадцати новых соединений, которые являются метаболитами трамадола или продуктами их ацетилирования для последующей идентификации этих соединений при проведении химико–токсикологического анализа.
4. Предложена уточненная схема биотрансформации трамадола в организме человека.

Список литературы

1. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики. — М.: Триада–Х, 2000. 206 с.
2. Dayer P., Desmeules J., Collart L. Pharmacology of Tramadol // Drugs (New Zealand), 1997. V. 53. Suppl. 2. P. 18—24.
3. Залесова В.А., Катаев С.С., Курдина Л.Н. К обнаружению трамадола в моче методом тонкослойной хроматографии // Вопросы наркологии, 1998. № 2. С. 53—56.
4. Maurer H.H. Systematic Toxicological Analysis of Drugs and their Metabolites by Gas Chromatography–Mass Spectrometry // J. Chromatogr. B., 1992. V. 580. № 1—2. P. 3—41.
5. Brainthnaite R.A., Jarvie P.R., Minty P.S.B., Simpson D., Widdop B. Screenig for Drugs of abuse I. Opiates, Amphetamines and Cocaine // Ann. Clin. Biochem., 1995. V. 32. № 2. P. 123—153.
6. Drummer O.H. Chromatographic Screening Techiques in Systematic Toxicological Analysis // J. Chromatogr. B., 1999. V. 733. № 1. P. 27—45.
7. Moffat A.C. Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post–Morten Material. — London: Pharmaceutical press, 1986. 1173 p.
8. Веселовская Н.В., Кислун Ю.В., Еремин С.К., Изотов Б.Н., Вятчанина А.П. Дорогокупец О.Б., Морозова Е.Б., Коваленко А.Е. Обнаружение трамадола и его метаболитов в моче хроматографическими методами // Судебно–медицинская экспертиза, 1996. № 4. С. 38—42.

9. Paar W.D., Frankus P., Dengler H.J. High–Performance Liquid Chromatographic Assay for the Simultaneous Determination of Tramadol and its Metabolites in Microsomal Fraction of Human Liver // J. Chromatog. B., 1996. V. 686. № 2. P. 221—227.
10. Merslavic M., Zupancic–Kralj L. Determination of Tramadol in Human Plasma by Gas Chromatography–Mass Spectrometry using Solid–Phase Extraction // J. Chromatogr. B., 1997. V. 693. № 1. P. 222—227.
11. Xu Y.X., Xu Y.Q., Zhang C.J., Shen L. Analysis of Tramadol and its Metabolites in Human Urine // Yao Xue Xue Bao (China), 1993. V. 28. № 5. P. 379—383.
12. Goeringer K.E., Logan B.K., Christian G.D. Identification of Tramadol and its Metabolites in Blood from Drug–Related Deaths and Drug–Impaired Drivers // J. Anal. Toxicol., 1997. V. 21. № 7. P. 529—537.
13. Potyka U., Paar W.D., Sauerbruch T., von Unruh G.E. Labelling Studies for Structure of a New Hydroxymetabolite of Tramadol // Isotopes Environ. Health Stud., 1998, V. 34. № 1—2. P. 119—125.