იმნაძე ნ., სივსივაძე კ., ჩაფიძე ნ., მურთაზაშვილი თ.

1,4-ბენზოდიაზეპინის ნაწარმების იმუნოფერმენტული ანალიზის შედეგად მიღებული ცრუდადებითი შედეგების შეფასება

თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი

ბოლო წლების განმავლობაში ჯანდაცვის სისტემაში და სისხლის სამართლის საქმეთა კვლევის დროს, მკვეთრად გაიზარდა წამლის და ტოქსიკური ნივთიერებების ტესტირებათა რაოდენობა. წინასწარ ცდას, ე.წ. სკრინინგს, ატარებენ სამუშაო ადგილებზე: სამხედრო, სპორტულ, იურიდიულ და სასჯელაღსრულებით დაწესებულებებში, ჯანდაცვის სფეროში (მაგ.: მკურნალობის მონიტორინგი, გარდაცვალების მიზეზის დადგენის მიზნით). წამლის და ტოქსიკური ნივთიერე-ბების ტესტის არასწორმა ჩატარებამ შეიძლება გამოიწვიოს მრავალი პრობლემა, ამიტომ ექსპერტიზის უპირველესი მიზანია ანალიზისთვის სწორი მეთოდის შერჩევა. დღეისათვის ტოქსიკური ნივთიერებების ძალიან დიდი რიცხვი არსებობს, შესაბამისად, მათ გამოკვლევაზე იხარჯება ბევრი დრო და ბიოლოგიური მასალა.

ბიოლოგიური მასალის და ანალიზის დროის რაციონალური გამოყენებისთვის საჭიროა თანმიმდევრული გეგმის შედგენა. წინასწარი ცდის შედეგების საფუძველზე, ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის გეგმიდან შესაძლებელია გამოირიცხოს რიგი ნივთიერებები და ვივარაუდოთ, თუ რა ნივთიერებები შეიძლება იყოს ბიოლოგიურ მასალაში. წინასწარი ცდის დადებითი შედეგი იმაზე მეტყველებს, რომ ბიოლოგიური ობიექტი შეიძლება შეიცავდეს ნივთიერებას, რომელზეც დადებითი პასუხი მოგვცა. თუმცა, მხოლოდ სკრინინგის საფუძველზე, შეუძლებელია საბოლოო დასკვნის გამოტანა სავარაუდო ნივთიერების ობიექტში არსებობის შესახებ. ამ მიზნით, ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის დროს აუცილებელია კიდევ დამატებითი კვლევების ჩატარება შესაბამისი დამადასტურებელი მეთოდების გამოყენებით. ამიტომ, გარკვეული ნივთიერებების წინასწარი ტესტირების დადებითი შედეგების მიღებისას, ამ ნივთიერებების შემდგომი შესწავლა შედის ქიმიურ-ტოქსიკო-ლოგიური ანალიზის გეგმაში /1,2,4/.

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური კვლევის დროს, პირველ ეტაპზე ყველაზე ხშირად გამოიყენება იმუნო-ქიმიური ანალიზის მეთოდი. ეს მეთოდები მრავალგვარია და მრავალფეროვნება დამოკიდებულია ანტიგენის ან ანტისხეულის ნიშნულის მრავალფეროვნებაზე. თუმცა აღსანიშნავია, რომ დღეს თანამედროვე ლაბორატორიებში, რომლებიც სპეციალიზებულნი არიან ტოქსიკური და ძლიერმოქმედი ნივთიერების ტესტირებაზე, უპირატესობით სარგებლობს სკრინინგ-ანალიზის იმუნოფერმენტული მეთოდი. მისი უპირატესობა განპირობებულია ფართომაშტაბიანი წინასწარი ცდის ჩატარების ავომატურობით და სისწრაფით. იმუნოფერმენტული ანალიზი გამოიყენება მრავალი ტიპის ტესტების ჩატარებისას და ის დღეს პრაქტიკულად შეუცვლელია წინასწარი კვლევის მეთოდებს შორის /3,5,6/.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ცრუ დადებითი შედეგების რაოდენობრივი შეფასება წინასწარ შერჩეული ე.წ. დამადასტურებელი კვლევის მეთოდებით და ამ მეთოდების სანდოობის დადგენა.

კვლევის ობიექტები იყო 1,4-ბენზოდიაზეპინის წარმოებულები, კერძოდ: დიაზეპამი, ფენაზეპამი და ნიტრაზეპამი, ხოლო შარდი - ბიოლოგიური მასალის სახით.

საანალიზო სინჯების მოსამზადებლად გამოყენებულ იქნა დიაზეპამის, ნიტრაზეპამის, ფენაზეპამის 0.1 მგ/მლ კონცენტრაციის სტანდარტული ხსნარი და განზავების გზით მომზადდა 20-60 ნგ/მლ კონცენტრაციის ხსნარები მეთანოლში. საანალიზოდ გამოიყენებოდა ახლად მომზადებული ხსნარები.

შარდის ნიმუშებიდან ფუძე ქლოროფორმიანი, სითხე-სითხე ექსტრაქციისათვის, საანალიზო ობიექტების სტანდარტული და საკვლევი ხსნარების მოსამზადებლად გამოიყენებოდა როტორული შემრევი Stuart®Rotator SB3 - Bibby Scientific Ltd.

წინასწარი კვლევის მიზნით შერჩეული იქნა ჰეტე-როგენული იმუნოფერმენტული ანალიზის მეთოდი, ხოლო დამადასტულებელი კვლევისთვის - მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია მასსპექტრო-მეტრიით.

ჰეტეროგენული იმუნო-ფერმენტული კვლევა ხორციელდებოდა კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზის (ELISA (HumaLyzer 3000) ექსპრეს მეთოდით.

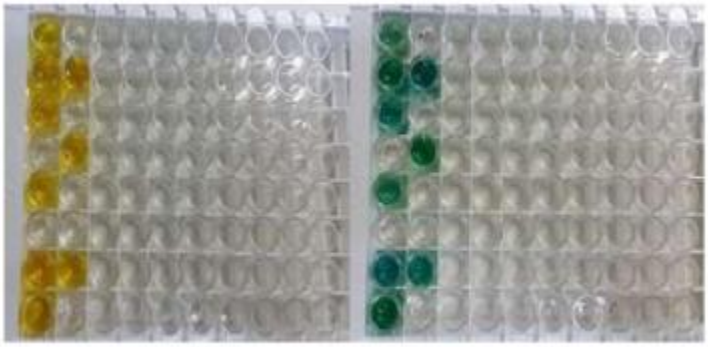
სითხური ქრომატოგრაფია მასსპექრომეტრიით (LC/MS/MS) კვლევა მიმდინარეობდა ქრომატოგ-რაფზე AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS, რომე-ლიც აღჭურვილია სვეტით - სტაციონარული ფაზა - C18 (100´2.1mm, 1.8µm) და წინასვეტით - UHPLC GUARD Zorbax Eclipse, სტაციონარული ფაზა - C18 (5´2.1 mm, 1.8µm). იონიზაცია მიიღწევა დადებითი ელექტროგაფრქვევით (ESI+). სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM).

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფირე-ბისთვის შერჩეულ იქნა მოძრავი ფაზა: 0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი წყალში: 0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი აცეტონიტრილში, თანაფარდობით 15:85 (მოც/მოც), სიჩქარე _ 0.8 მლ/წთ, სვეტის ტემპერატურა: 30°C. ქრომატოგრაფირების დრო: 6 წთ. ქრომატოგრამები წარმოდგენილია №2 სურათზე.

შედეგები. იმუნოფერმენტული ანალიზის დროს დადებითი შედეგია, თუ ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობა ნაკლებია ან ტოლია დადებითი კონტროლის ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობაზე.

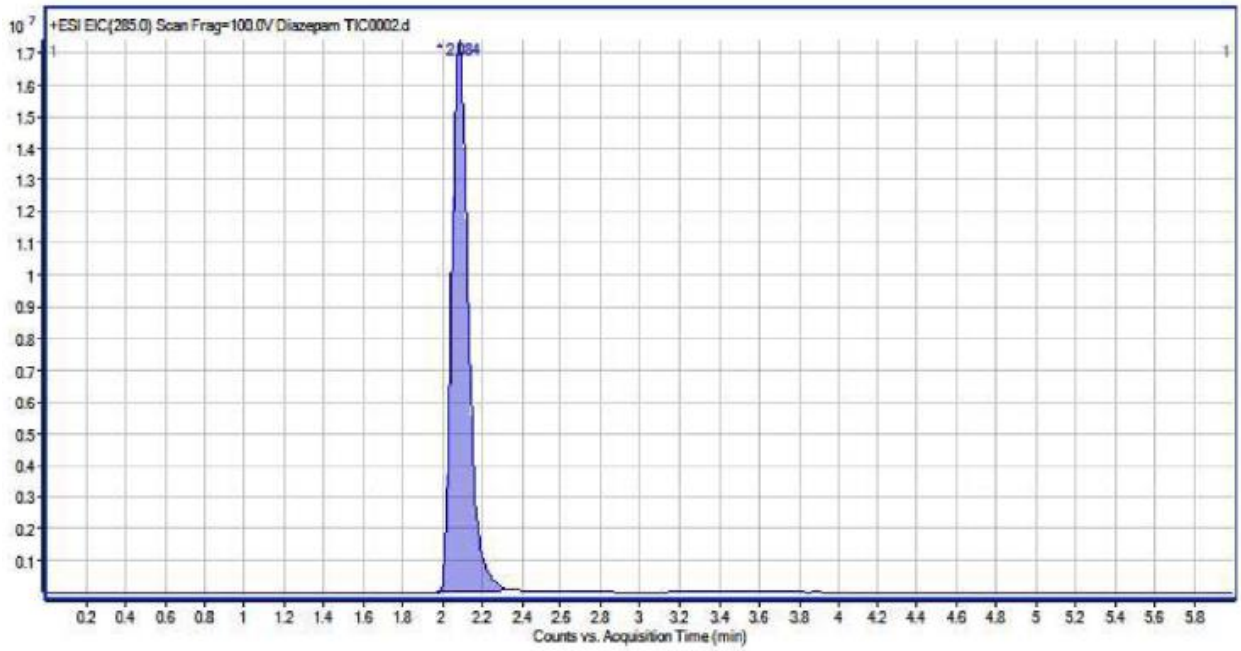
უარყოფითია შედეგი, როცა ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობა მეტია დადებითი კონტროლის ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობაზე. კონკურენტული, ჰეტეროგენული იმუნოფერმენტული ანალიზის დროს, შეფერილობის წარმოქმნა მიუთითებს, რომ საანალიზო ობიექტში არ არის საკვლევი ნივთიერება.

1.4-ბენზოდიაზეპინის წარმოებულების იმუნოფერმენტული კვლევის შედეგები მოცემულია №1 სურათზე.

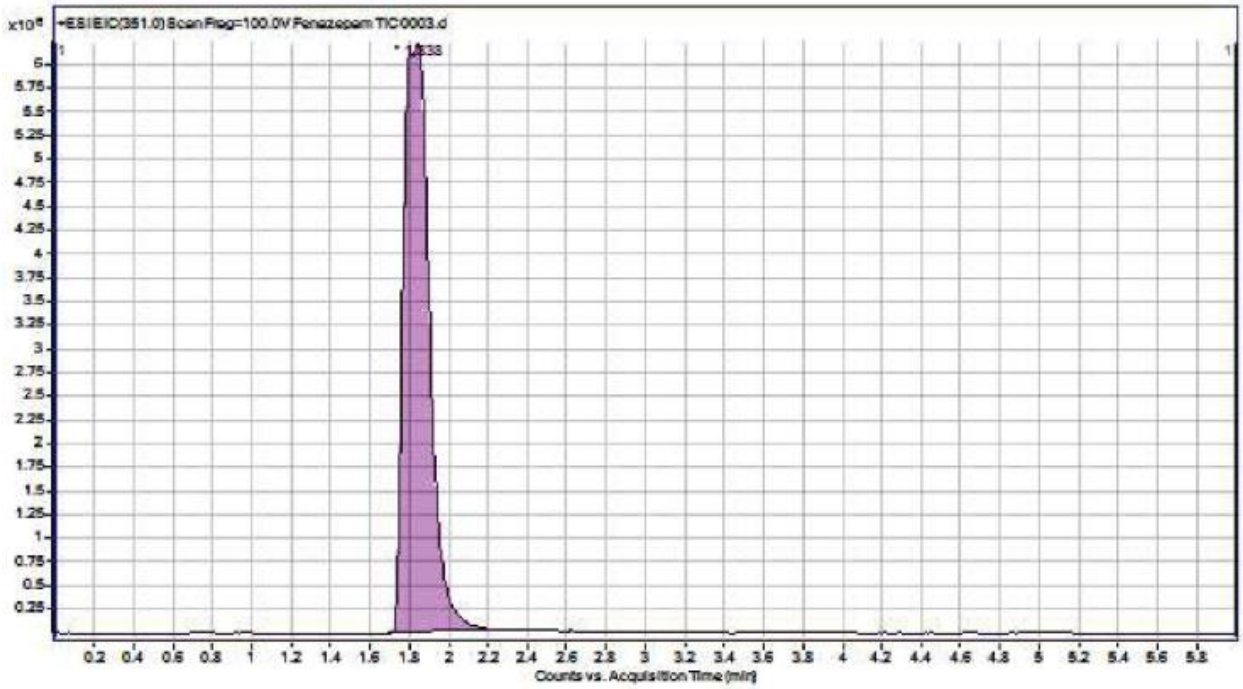


ა ბ

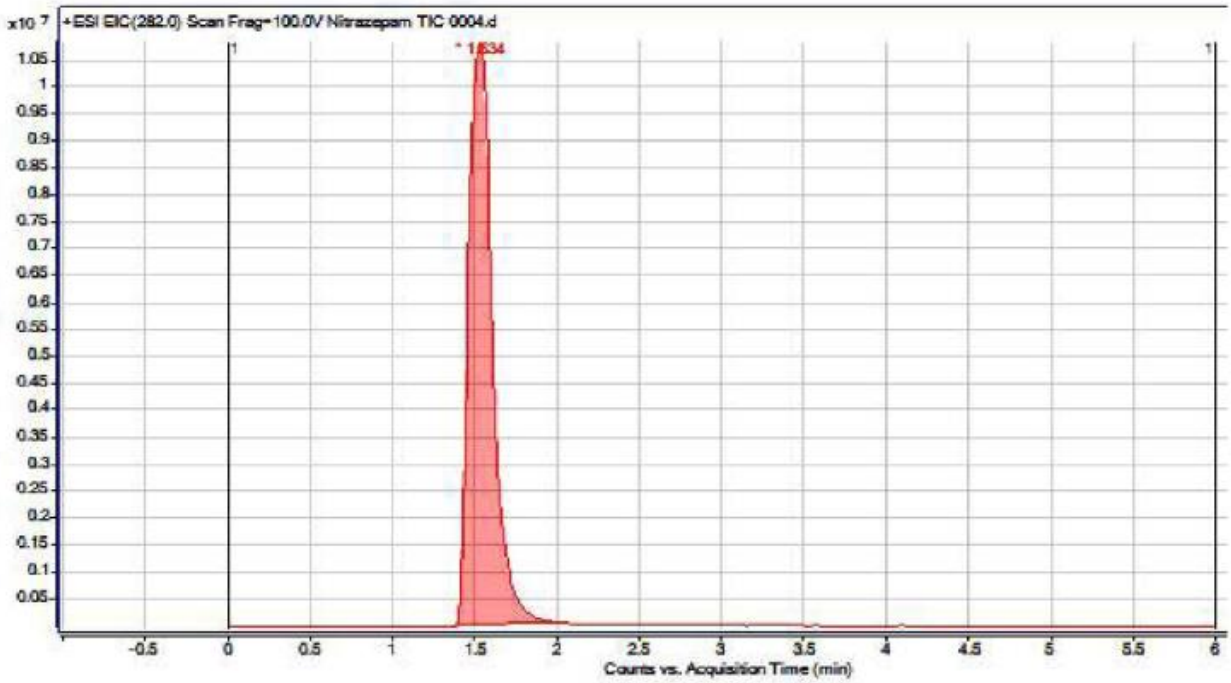
როგორც №1 სურათზე (ა და ბ) ჩანს, ამ შემთხვევაში მიღებულია 7 ცრუ დადებითი შედეგი. საანალიზო ობიექტში 1,4-ბენზოდიაზეპინების წარმოებულების შემდგომი დადასტურება ხდებოდა სითხური ქრომატოგრაფია- მასსპექტრომეტრიის მეთოდის გამოყენებით (სურ. №2)



(a)


+ESI EIC(351.0) Scan Frag=100.0V Fenazepam TIC 0003.d
Counts vs. Acquisition Time (min)

(b)


+ESI EIC(282.0) Scan Frag=100.0V Nitrazepam TIC 0004.d
Counts vs. Acquisition Time (min)

(c)

სურ. №2 (a) დიაზეპამის (t_R=2.084 წთ), (b) fenazepamis (t_R=1.638 წ თ) და (c) ნიტრაზეპამის (t_R=1.634წთ) ქრომატოგრამა

შემოთავაზებული მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული ანალიზის პირობები საშუალებას იძლევა ერთმანეთისგან დავყოთ დიაზეპამი და ფენაზეპამი (ცხრილი № 1). ეს მნიშვნელოვანია, ვინაიდან მონაცემთა ანალიზმა აჩვენა, რომ როგორც სამედიცინო, ისე არასამედიცინო მიზნით მოსახლეობა ძირითადად იყენებს 1,4-ბენზოდიაზეპინის ამ ორ წარმოებულს.

ცხრილი №1. დიაზეპამის, ნიტრაზეპამის და ფენაზეპამის შეკავების დრო

ნივთიერება	*შეკავების დრო (წთ)*
დიაზეპამი	*2.084*
ფენაზეპამი	*1.638*
ნიტრაზეპამი	*1.634*

მოწოდებული მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული ანალიზი გამოიყენებოდა, წინასწარი კვლევის შედეგად მიღებული, ცრუ დადებითი შედეგების დასადასტურებლად.

გარდაცვლილი და ცოცხალი პირების საანალიზო ობიექტში (შარდის 211 ნიმუში), წინასწარი კვლევის შედეგად, აღმოჩენილი 1,4 ბენზოდიაზეპინის წარმოებულიების და შემდეგ დამადასტურებელი კვლევის შედეგები მოცემულია №2 ცხრილში.

დასკვნა:

- დადგინდა *ანალიზის ოპტიმალური პირობები*, 1,4-ბენზოდიაზეპინის წარმოებულების აღმოსაჩენად საანალიზო ობიექტებში, სითხურ-ქრომატოგრაფიული მეთოდის გამოყენებით;

- ჰეტეროგენული იმუნოფერმენტული ანალიზის მეთოდის (0.47%) გამოყენებისას ცრუ დადებითი შედეგების ალბათობა საანალიზო ობიექტებში არის მინიმალური, ხოლო ცრუ უაყოფითი შედეგების - პრაქტიკულად ნულის ტოლი და, როგორც წესი, ეს დასტურდება ე.წ. დამადასტურებელი კვლევის მეთოდით.

ლიტერატურა:

1. *"Diazepam - Drug Usage Statistics". ClinCalc*. Retrieved 11 April 2020.

2. *Mandy Alhajj, Aisha Farhana. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.*

3. D. Shweta, L. Kesharvani, A. K. Gupta, and M. K. Mishra, "Analysis of suspected seized sample of NDPS drugs (benzodiazepines) through GLC and TLC using different solvent system," Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology, vol. 9, no. 1, p. 151, 2015.

4. 17. Thomas O Kohl, Carl A Ascoli. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Cold Spring Harb Protoc. 2017 Jul 5;

5. J. Wang, Y. Wang, Y. Pan et al., "Preparation of a broadly specific monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for the detection of benzodiazepines in edible animal

ცხრილი №2. გვამურ მასალაში და ცოცხალი პირების შარდში 1.4 - ბენზოდიაზეპინის წარმოებულების წინასწარი და დამადასტურებელი კვლევის შედეგები

მეთოდი	*შედეგი*		*შედეგების შეფასება*
	დადებითი	*უარყოფითი*	
<u>წინასწარი:</u> იმუნოფერმენტული ანალიზი	211	0	ცრუდადებითი შემთხვევები $A = \frac{1}{211} \times 100\% = 0.47\,\%$
<u>დამადასტურებელი:</u> სითხური ქრომატოგრაფია – მასსპექტრომეტრია	210	1	ცრუუარყოფითი შემთხვევები $A = \frac{0}{211} \times 100\% = 0\,\%$

tissues and feed," Food Analytical Methods, vol. 9, no. 12, pp. 34073419, 2016.

6. *Marieke De Boeck, Giacomo Damilano, Wim Dehaen, Jan Tytgat, Eva Cuypers. Evaluation of 11 ionic liquids as potential extraction solvents for benzodiazepines from whole blood using liquid-liquid microextraction combined with LC-MS/MS. Talant. 2018 Jul 1; 184:369-374.*

SUMMARY

Imnadze N., Sivsivadze K., Chapidze N., Murtazashvili T.

The Evaluation of False Positive Test Results Possibility of the Derivatives of 1.4 - Benzodiazepines by Immunoassay

TSMU, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry

Not properly done tests of drugs and toxic agents can cause different problems, and because of that, the main aim of expertize is to select the correct method of analysis. Also, important to create the appropriate flow chart of the analytical stems to use the biological material and time in rational way. Based on, preliminary chemical-toxicological test results of the biological materials the presence of some toxic compounds can be excluded and can be supposed the presence of others. During the planning of our study, the main aim of our work was quantitative evaluation, how many false positive results are confirmed with confirmatory test methods and how reliable it is. Subjects of our study were the derivatives of 1,4-benzodiazepines: Diazepam, Phenazepam and Nitrazepam. During the study was done the extraction of the urine samples by liquid-liquid extraction (alkaline extract) and later for selective separation was used solid phase extraction method. It is notable that solid phase LC18 is very selective and the extraction rate usually is very high. Because of preliminary screening, were used heterogeneous competitive immunoassay test method and as confirmatory test method was used the LC/MS/MS, with mobile phase: 0.1 % formic acid water solution: 0.1% formic acid acetonitrile solution (15:85) (v/v), and stationary phase C18 (1002.1mm, 1.8 cm).

The proposed LC/MS/MS method gives the opportunity for sensitive determination of Diazepam, Nitrazepma and Phenazepam presence in biological material.

After evaluation of received data of taken samples by LC/MS/MS, we can conclude that preliminary immunoassay test method gives a minimal quantity of false positive results (0.47%) and false negative results probability practically equals null.