

Применение методики измерений массовой доли токсичных элементов в биологических образцах атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией и прямым вводом проб в токсикологической экспертизе

Тюрников А.П.

сотрудник отдела исследований и разработок ООО "Интерлаб"

Саломатин В.Е.

судебно-медицинский эксперт ФГБУ "Российский центр судебно-медицинской экспертизы " Минздрава РФ

Введение:

Определение содержания тяжелых металлов и токсичных элементов в биологических образцах является одной из основных задач токсикологической экспертизы, так как одним из сильнейших по действию и наиболее распространенным химическим загрязнением внешней среды является загрязнение тяжелыми металлами. Существующие методы исследования:

Одним из доступных и наиболее часто используемых методов определение содержания тяжелых металлов и токсичных элементов в биологических образцах является атомно-абсорбционная спектроскопия. Однако в традиционном исполнении данный метод включает в себя трудоемкую многостадийную подготовку образца для перевода аналита в раствор. Кроме того, пробоподготовка обычно сопряжена с возможностью потерь аналита и загрязнением образца.

Сотрудниками отдела исследований и разработок ООО "Интерлаб" совместно с сотрудниками Российского центра судебно-медицинской экспертизы разработана новая методика анализа твердых проб методом атомно-абсорбционной спектроскопии применительно к биологическим образцам, поскольку именно для этой области исследования качество пробоподготовки играет критическую роль, а к правильности измерений предъявляются повышенные требования.

Суть предложенной методики состоит в том, что образец после высушивания измельчается, взвешивается и вводится непосредственно в графитовый атомизатор. Преимущества: скорость, точность, малый расход пробы, низкая себестоимость 1 анализа.

Валидация методики проводилась путем сравнения результатов с традиционными методиками анализа растворов. Высокая согласованность между значениями, полученными при анализе веществ в твердых пробах и в растворах позволяет заявлять о пригодности новой методики для рутинного анализа.

Полученные метрологические характеристики (точность, повторяемость, воспроизводимость) отличные, что подтверждает надежность данной методики.

Дополнительные сведения: Методика аттестована в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии и зарегистрирована в Реестре методик под номером 01.00225/205-30-15.

Оборудование: ААС спектрометр contrAA 700 с пламенным и электротермическим режимом атомизации и приставкой для ввода твердых проб solidAA.

Tandem Mass Spectrometry Applications for Local Forensic and Toxicological Investigations in Cape Town, South Africa

Alicia Evans

Principal Technical Officer Division of Clinical Pharmacology,
University of Cape Town

South Africa has a unique set of toxicological challenges which has seen extended delays in delivery of results. However, some creative approaches to rapidly deliver preliminary toxicology results to Forensic Pathologists at the University of Cape Town using Sciex equipment and library software, has been developed in the Division of Pharmacology.

Local clinical toxicology requests have increased dramatically and the drug screen approach has ensured an efficient service for confirmation of drugs.

The use of more sensitive instruments enable detection of compounds in hair, such as ARV's and dialkylphosphates.

This talk will give a brief overview of these applications.

Oral fluid as an alternative matrix for drugs of abuse testing

Michael Böttcher

MVZ Labor Dessau GmbH, Dessau, Germany

Introduction: Screening for drugs of abuse with immunoassay and/or chromatographic methods in urine samples can be regarded as standard practice. Oral fluid (OF) is increasingly accepted as a suitable alternative matrix to test for drugs of abuse in clinical, drug treatment, workplace and other settings. This is mostly because of ease of collection and less risk for adulteration. However, little is known about the required sensitivity of the possible screening methods to reach comparable positive rates or so to speak similar detection times. This is especially important for 6-Acetylmorphine (6-AM) whose detection in body fluids is regarded as a forensic proof for recent heroin abuse. We therefore developed and applied a sensitive UPLC-MS/MS method for routine OF drug screening and compared the positive rates to standard immuno-chemical urine testing of substituted opiates addicts from the Berlin area (study 1). In a 2nd study a homogenous immunoassay for the detection of 6-AM in OF was validated.

Methods: OF was collected using the liquid based Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria) SCS pH 4.2 device according to the manufacturer. OF concentration of the OF/buffer mixture was quantified spectrophotometrically on an Olympus AU680 (BeckmanCoulter, Krefeld, Germany). Study 1: urine screening was conducted on an Olympus AU680 with immunoassays (Microgenics, Passau, Germany) at the following cutoffs: amphetamines 500 ng/mL, benzodiazepines (with enzymatic hydrolysis) 100 ng/mL, cocaine 50 ng/mL, opiates 100 ng/mL, EDDP 100 ng/mL, buprenorphine 2 ng/mL, THC-COOH 25 ng/mL. SRM multi-target drug screening in OF was performed after protein precipitation and salting out assisted liquid extraction of an 0.1 mL OF aliquot on an UPLC/MS-MS (Waters Acquity connected to a Waters Xevo TQ-S, Eschborn, Germany) with a BEH Phenyl 1.7 μ m, 2.1 mm x 100 mm column (Waters) within 6 minutes. OF/buffer was spiked to 0.5 ng/mL with the corresponding deuterated standards. Two transitions were monitored for the following 47 analytes: amphetamines (10), benzodiazepines (16), cocaine, benzoylecgonine, opiates including 6-AM (6), opioids (5), THC, methadone, buprenorphine, others (5). The cutoff in neat saliva was set at 0.1 ng/mL for buprenorphine and at 1 ng/mL for all other analytes. Study 2: three transitions were monitored for 57 analytes including the opiates 6-AM, morphine, codeine, 6-acetylcodeine, norcodeine and dihydrocodeine. OF/buffer was spiked at 0.5

ng/mL with the corresponding deuterated standards. The opiates cutoff was set at 1.0 ng/mL neat OF. Calibration range was from 0.025 to 20 ng/mL (16 point) for each analyte. The opiates intra- and inter-assay CV was below 15% for a 0.6 ng/mL OF control sample with recoveries ranging from 87% to 112% (n = 30). 6-AM OF immunoassay (CEDIA, Microgenics) was performed on an Olympus AU680 with matrix calibrators at 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 4.0 ng/mL. The cutoff was set to 1.0 ng/mL OF.

Patients. Study 1: during a three month period OF and urine drug testing positive rates were compared from 1. an outpatient clinic (OPC) where the drug testing was stepwise moved from urine to OF and from 2. other outpatient clinics (ALL) with more random selection between the two matrices. Patient data: OPC: 194 patients (26 buprenorphine, 67 D-/L-methadone, 101 L-methadone), 902 OF samples and 182 patients (25 buprenorphine, 66 D-/L-methadone, 91 L-methadone), 1119 urine samples. ALL: 612 patients from 23 clinics (116 buprenorphine, 265 D-/L-methadone, 231 L-methadone), 1072 OF samples and 1463 patients from 40 clinics (285 buprenorphine, 673 D-/L-methadone, 505 L-methadone), 9008 urine samples. Study 2: 4039 routine OF samples from ~900 different patients from 6 consecutive weeks were analysed. About 90% of the patients were substituted either with L-methadone, D-/L-methadone or buprenorphine.

Results. Study 1: the positive rates for OF/urine samples from OPC were: amphetamines: 9.3%/3.3%, benzodiazepines: 11.0%/14.4%, cocaine: 5.2%/3.9%, opiates: 13.5% (76% positive for 6-AM)/13.5%, opioids + others: 2.0%/not tested and THC: 26.9%/THC-COOH: not tested. Methadone/EDDP was positive in both matrices where expected. However, buprenorphine was negative in 8 OF samples from 2 patients in low dose therapy (0.4 and 1.0 mg/d). The positive rates for OF/urine samples from ALL were: amphetamines: 10.3%/4.1%, benzodiazepines: 25.7%/22.4%, cocaine: 9.8%/7.2%, opiates: 17.6% (76% positive for 6-AM)/21.7%, opioids + others: 3.5%/not tested and THC: 30.5%/THC-COOH: 31.3%. Methadone/EDDP and buprenorphine was positive in both matrices where expected. Study 2: from the 4039 analysed samples 481 (11.9%) were positive for at least one opiate with LC/MS-MS. 6-AM could be detected in 80% of these samples (n = 385). When the opiate positive samples were analysed with the 6-AM immunoassay 75.9% of the samples were positive (cutoff 1.0 ng/mL ; n = 365). Correlation of measuring values of both methods resulted in a slope of 0.99 (r^2 : 0.980). Only 2 samples were false positive and 18 samples were false negative with the 6-AM immunoassay. Morphine cross-reactivity in the 6-AM test was determined to be 0.1% which could be of importance in case of morphine oral contamination.

Conclusions. The drugs of abuse positive rates for OF and urine were comparable at the selected cutoffs suggesting that OF is of equal value if sensitive methods are applied. The high prevalence of 6-AM in opiate positive OF samples indicates that OF may offer advantages over urine in testing for

recent heroin use. The good agreement of both methods allows easy and cheap screening with immunoassay for this purpose.

Биомониторинг экспозиции человека летучими промышленными токсикантами

Савельева Е.И.

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека»
Федерального медико-биологического агентства

До настоящего времени не создана методология совокупного и обоснованного учета воздействия вредных химических факторов, поступающих человеку из производственной и бытовой среды, с продуктами питания, водой и из других источников. При проведении скрининга биожидкостей на присутствие в них биомаркеров токсичных и опасных соединений мы уже привыкли к тому, что в качестве «фоновых» рассматриваем не только биогенные вещества, но и различные ксенобиотики. Источники их поступления в организм столь многочисленны, что произвести их инвентаризацию невозможно. Автомобильный транспорт, промышленные выбросы, строительные и отделочные материалы помещений, бытовая химия и многое другое являются источниками летучих органических соединений (ЛОС), от хронического воздействия которых защититься невозможно. В 2014 г ФМБА России были утверждены Методические рекомендации «Процедура проведения количественного хроматомасс-спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах», предусматривающие двухстадийное исследование проб цельной крови и мочи на присутствие в них ксенобиотиков. Первый этап является скрининговым и имеет целью обнаружение и инвентаризацию всех ксенобиотиков, предположительно идентифицированных в биожидкостях. На втором этапе проводится количественное определение по аттестованным методикам. В качестве приложения в Методические рекомендации включены аттестованные методики для измерения концентраций широких групп летучих экотоксикантов и фосфорорганических пестицидов в биопробах. Разумеется, на подтверждающем (втором) этапе исследований для количественных определений могут быть привлечены любые доступные методики. С точки зрения традиционной токсикологической химии бытовые и промышленные токсиканты, присутствующие в биожидкостях на уровне нг/мл, несут незначительную опасность, поскольку не вызывают острых отравлений, но учет общей ксенобиотической нагрузки на организм как на индивидуальном, так и на популяционном уровне крайне важен для оценки качества среды обитания человека и обоснованных мер для снижения экологически обусловленных рисков.

Идентификация препаратов рекомбинантного химерного ЕРО-Fc белка в антидопинговом контроле методом IEF-PAGE.

П.В. Постников, Г.И. Кротов, Ю.А. Ефимова, Г.М. Родченков

Федеральное Государственное Унитарное Предприятие

«Антидопинговый Центр» Министерства спорта РФ,

Москва

ЕРО-Fc - это химерный белок, состоящий из человеческого эритропоэтина (ЕРО) и Fc-фрагмента IgG человека. Данные соединения представляют коммерческий интерес для фармацевтических компаний в качестве средства для лечения анемии и почечной недостаточности. С 2012 года применение препаратов на основе химерных ЕРО-Fc белков в спорте запрещено Всемирным Антидопинговым Агентством [1]. В настоящее время их идентификация возможна только методом SAR/SDS-PAGE - электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии N-лауроил-саркозината или додецилсульфата натрия) с последующим Вестерн блоттингом. Однако данный метод недостаточно селективный и специфичный за счет присутствия в пробах биологических жидкостей интерферирующих белков. В практике антидопинговых лабораторий мира для определения рекомбинантного ЕРО методом изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле с последующим двойным иммуноблоттингом и хемилюминесцентной детекцией (IEF-PAGE) используют градиент pH от 2 до 6, в котором можно детектировать большинство известных препаратов рекомбинантного ЕРО. Известно, что N- и O-гликаны вносят основной вклад в отрицательный заряд молекулы ЕРО. Присутствие дополнительного сайта гликозилирования в положении Asn 297 в Fc-фрагменте молекулы (в соответствии со структурой IgG) увеличивает значение изоэлектрической точки химерного белка, выходя за пределы заданного градиента. ЕРО-Fc имеет изоэлектрическую точку в диапазоне pH от 6 до 8 [2].

В данной работе предложено использовать специфическую протеазу IdeS (immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) [3] для расщепления химерного белка на ЕРО-шарнир и Fc-фрагмент. Было показано, что вследствие потери части суммарного заряда ЕРО-Fc может быть селективно детектирован данным методом, так как изоэлектрическая точка фрагмента ЕРО-шарнир попадает в рабочий диапазон pH от 2 до 6. Получаемый изоэлектрический профиль уникален по сравнению с известными на сегодняшний день эритропоэзстимулирующими агентами.

После протеолиза образцы сыворотки с различными концентрациями ЕРО-Fc подвергали иммуноаффинной очистке на колонках с анти-ЕРО антителами МАПА Diagnostics, предел обнаружения методом IEF-PAGE составил 75 пг на трек.

Представленным нами метод, сочетающий в себе воздействие IdeS протеазы и последующее разделение методом IEF-PAGE, позволяет надежно идентифицировать препараты ЕРО-Fc в образцах крови (плазма или сыворотка).

Литература

1. Запрещенный список ВАДА 2015 год.
<http://www.rusada.ru/sites/default/files/content/files/Запрещенный%20список%202015.docx>
2. Reichel, C. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: screening and confirmation protocols for sports drug testing. / C. Reichel, M. Thevis. // Drug. Test. Anal. 2012. Vol. 4(11), p. 818 - 829.
3. Von Pawel-Rammingen, U. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. / U. von Pawel-Rammingen, Björn P. Johansson, Lars Björck. // The EMBO Journal. 2002. Vol. 21, p. 1607-1615.

Дифференциация поверхностных загрязнений и объемных содержаний психоактивных веществ в волосах и срезах краев ногтевых пластин

**¹Савчук С.А., ²Скребкова К.А., ³Никитина Н.М., ⁴Тумурова Л.В.,
⁵Самышкина Н.В., ¹Надеждин А.В., ¹Тетенюва Е.Ю.**

¹ ФГБУ «ФМИЦПН» Минздрава России, Москва.

²ГБУ «Курганский областной наркологический диспансер», г.Курган.

³ГБУЗ «Наркологический диспансер Псковской области», г.Псков

⁴³ГАУЗ «Республиканский наркологический диспансер» г. Улан-Удэ.

⁵ ГБУЗ ЯНАО «Новоуренгойский психоневрологический диспансер»

Рост потребления курительных смесей в последнее время становится одной из серьезных социальных проблем. Увеличивающийся спрос потребителей на психоактивные вещества формирует предпосылки для постоянного расширения ассортимента синтетических каннабимиметиков. Несовершенство законодательства в вопросах контроля новых субстанций дает латентный период для временного оборота веществ, не подпадающих под запрет. Вещества, внесенные в списки наркотических средств и психотропных веществ, уходят с рынка, а на их место поступают новые, не контролируемые законодательством.

С середины 2012 года массовое распространение на территории России и за рубежом получили синтетические каннабимиметики, представляющие собой сложные эфиры *N*-алкильных производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина (PB-22, PB-22F), а также производные индазол-3-карбоксамидов, содержащие карбамоилпропильную группировку (AB-PINACA, AB-FUBINACA). Постановлениями Правительства РФ №580 от 10.07.2013 и №788 от 09.09.2013 данные соединения отнесены к списку I Перечня наркотических средств, оборот которых запрещен в РФ.

В связи с быстрым изменением ассортимента так называемых дизайнерских наркотиков, обнаружение и идентификация метаболитов и маркеров синтетических каннабимиметиков в биоматериале представляет собой сложную аналитическую задачу. Использование волос в качестве объекта анализа на наркотические вещества имеет ряд преимуществ перед

исследованием традиционных объектов анализа, таких как наиболее долгое удерживание попавших в организм человека токсикантов, доступность для корректного отбора и исследования, стабильность образцов.

Цель работы – для дифференциации поверхностных загрязнений и объемных содержаний сопоставить интенсивности аналитических сигналов психоактивных и наркотических веществ, определяемых в пяти метанольных смывах, УЗ-экстрактах (в метаноле) и гидролизатах волос и ногтевых срезах с пальцев рук и ног, отобранных у лица, подозреваемого в употреблении психоактивных веществ. Полученные результаты сравнить с результатами исследования проб мочи и крови, отобранных у того же лица.

Материалы и методы. Исследования биологических образцов было выполняли на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором Маэстро МСД (Интерлаб, Россия).

Результаты и обсуждение

Основной проблемой при определении психоактивных веществ в волосах является дифференциация поверхностных загрязнений и объемных содержаний целевых веществ, особенно в случаях определения компонентов каннабиса или курительных смесей. Эти вещества могут попадать на поверхность волос в виде аэрозолей при курении. При этом возможно загрязнение волос у лиц, не употребляющих психоактивные вещества, но присутствующих при их употреблении.

Получить более специфичные данные по дифференциации психоактивных веществ на поверхности и в объеме придатков кожи можно при комплексном исследовании волос и срезов краев ногтевых пластин, отобранных как с пальцев рук, так и с пальцев ног испытуемых. Особенный интерес представляют ногтевые срезы, отобранные с пальцев ног, поскольку они в наименьшей степени загрязнены целевыми компонентами.

Для надежного удаления поверхностных загрязнений мы предлагаем отмывать измельченные образцы 5-ю аликвотами (по 1.5 мл) метанола с последующим анализом полученных метанольных смывов.

После этого измельченные образцы заливают 6-ой аликвотой метанола и выдерживают на ультразвуковой бане 7.5-8 часов. Полученный метанольный экстракт также анализируют.

Измельченные образцы волос и ногтевых пластин после метанольных извлечений сохраняют свою первоначальную структуру, что позволяет предположить неполное извлечение определяемых веществ из наиболее труднодоступных для экстрагента структур образца. Для полного извлечения целевых веществ мы предлагаем провести щелочной гидролиз образцов с практически полным их растворением в 2.5 М щелочи с последующим кислым (рН 2-3) извлечением смесью растворителей

гексан:этилацетат = 7:1, упариванием, дериваизацией с BSTFA и анализом. Процент извлечения при этом повышается, но есть опасность гидролиза лабильных каннабимиметиков с образованием структур полностью сходных с метаболитами этих веществ.

Дополнительную информацию о испытуемом можно получить при анализе проб крови и мочи по методикам, представленным в.

Ниже, на диаграммах 1-3, представлены результаты экспертизы волос, ногтевых срезов с пальцев рук и ног пациента наркологической клиники Б-ва.

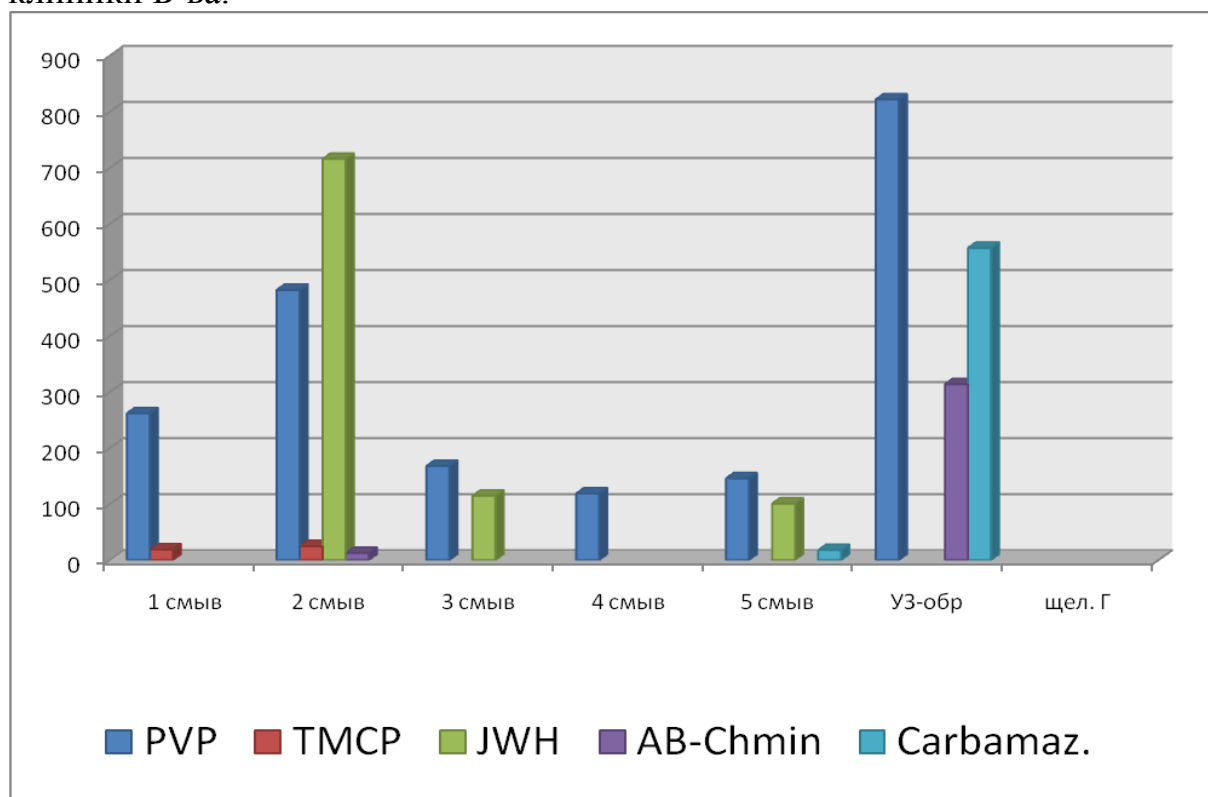


Диаграмма 1. Профиль веществ, обнаруженных в смывах волос пациента Б-ва. По оси Y даны интенсивности хроматографического пика по базовому иону.

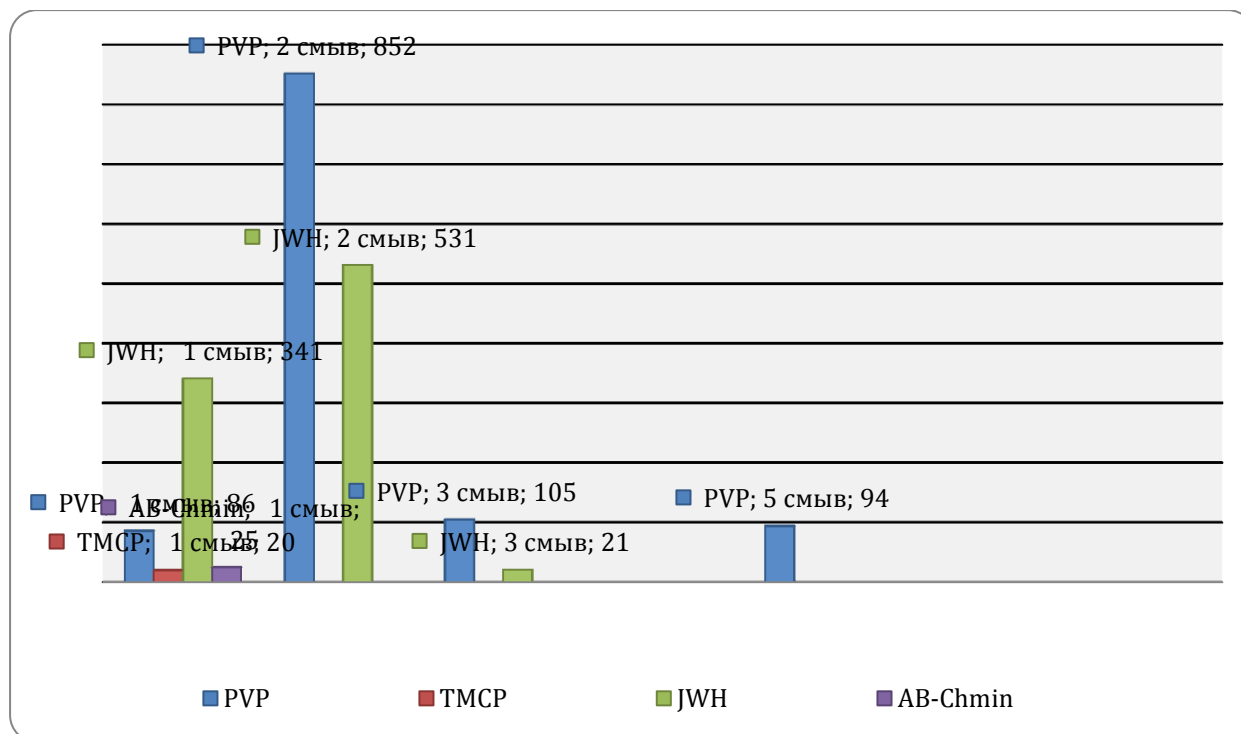


Диаграмма 2. Профиль веществ, обнаруженных в смывах срезов ногтевых пластин с пальцев рук пациента Б-ва. По оси Y даны интенсивности хроматографического пика по базовому иону.

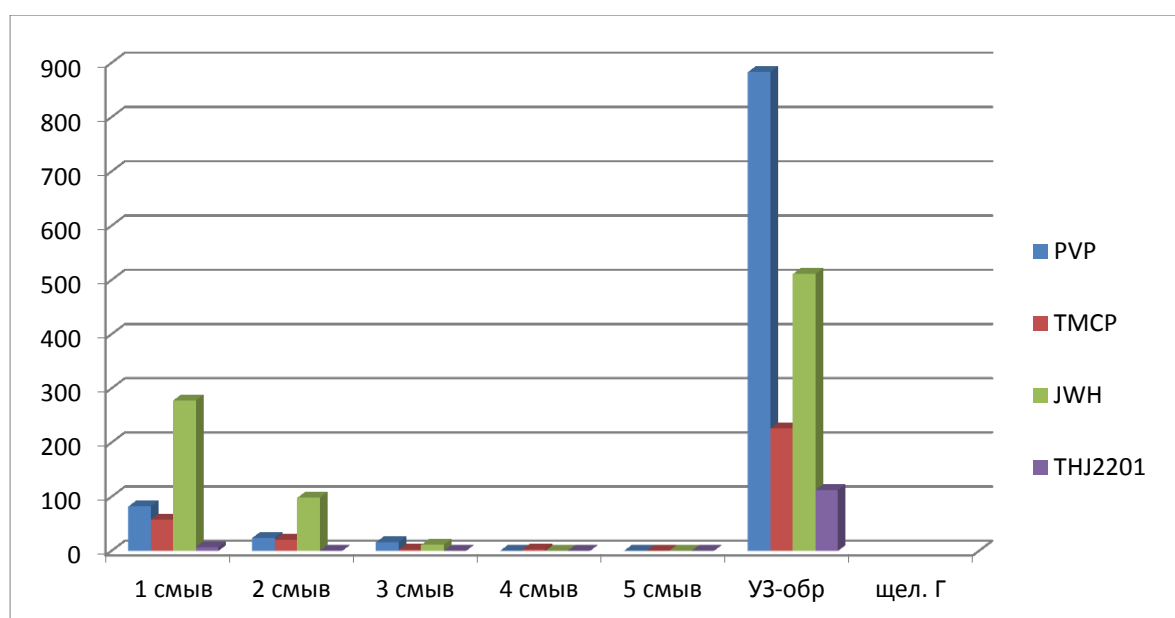


Диаграмма 3. Профиль веществ, обнаруженных в смывах срезов ногтевых пластин с пальцев ног пациента Б-ва. По оси Y даны интенсивности хроматографического пика по базовому иону.

При проведенном хромато-масс-спектрометрическом исследовании был обнаружен однотипный набор веществ (см. табл.1-3), как в смывах и экстрактах волос, так и в смывах и экстрактах краев ногтевых пластин, отобранных у пациента Б-ва. В щелочных гидролизатах целевых веществ обнаружено не было. В крови Б-ва был обнаружен диазепам, в моче

альфа-PVP и аминоклорбензофенон. Показана возможность идентификации каннабимиметиков и других психоактивных веществ в полном сканировании. В отдельных случаях чувствительность прибора позволяла регистрировать только наиболее интенсивные фрагменты спектра, что ухудшало процент совпадения исследуемого и библиотечного спектра, который в таких случаях не превышал 75%, однако хорошее совпадение времен удерживания определяемых соединений с библиотечными значениями позволило надежно идентифицировать эти соединения. В подобных случаях важную роль играет анализ волос и краев ногтевых пластин заведомо не содержащих целевых соединений.

Одним из достоинств методики является возможность определения не дериватизированных каннабимиметиков и продуктов их термической дегградации, образующихся при курении.

Наибольший интерес представляют профили целевых веществ в смывах и метанольных УЗ-экстрактах ногтевых срезов пальцев ног испытуемого. Наблюдали два максимума. Один в первых смывах, другой при озвучивании. Представленная картина является типичной и мы неоднократно наблюдали подобные профили при исследовании срезов ногтевых пластин пальцев ног, отобранных у пациентов наркологических клиник или поступающих из кабинетов экспертизы опьянения.

Выводы

Полученные результаты показали возможность определения профилей психоактивных веществ в волосах и ногтевых срезах методом газовой хроматографии с детектированием сигнала в режиме полного сканирования без дериватизации.

Мы полагаем, что ногтевые срезы с пальцев ног наиболее защищены от внешних загрязнений целевыми веществами и являются наиболее информационно значимыми объектами химико-токсикологического исследования. В настоящее время мы продолжаем набор статистически значимых данных для подтверждения факта быстрой экстракции психоактивных веществ из объектов, являющихся придатками кожи.

ЖХ-МС(n) глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков

¹А.М. Григорьев, ²О.Л. Заикина, ³А.Б. Симонов

¹Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области», Москва.

²Государственное казенное учреждение здравоохранения «Ленинградский областной наркологический диспансер», Санкт-Петербург.

³Клиническая наркологическая больница, химико-токсикологическая лаборатория, Киров

Быстрота выполнения – одно из главных требований, предъявляемых к обзорному химико-токсикологическому анализу. В частности, это требование может быть удовлетворено при упрощении подготовки проб, и – в том числе – при нивелировании стадии деконъюгирования. В настоящее время библиотеки МС(n) спектров для метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) пополняются глюкуронидированными формами [1, 2], относительное содержание которых в моче нередко превышает содержание соответствующих метаболитов фазы I. Целью нашей работы является обнаружение глюкуронидированных метаболитов обширной группы психоактивных соединений – синтетических каннабимиметиков (СК, «спайсов») для последующего включения их характеристик в поисковые хромато-масс-спектрометрические библиотеки

Эксперимент. Поиск метаболитов в моче выполняли методом ЖХ-МС (режим электрораспылительной ионизации, ESI) и ЖХ-ДМД с применением следующего оборудования: ЖХ UltiMate 3000, МС AmaZon Speed (ионная ловушка); ЖХ Nexera XR, МС LCMS-8040 (три-Q); ЖХ 1200 с диодно-матричным детектором G1315. Метаболиты фаз I и II извлекали ацетонитрилом либо экстрагировали; также применяли ввод образцов без пробоподготовки.

Результаты:

Первоначально конъюгированные метаболиты обнаруживали при анализе исходных и гидролизированных (NaOH) образцов мочи методом ЖХ-ДМД и – впоследствии – ЖХ-МС(n); этот подход позволял фокусироваться на преобладающих метаболитах. Отмечено, что степень конъюгирования метаболитов фазы I в основном, определяется их гидрофильностью (Рис. 1А), хотя отклонения от этого правила встречаются также (Рис. 1Б). Для ионизации (ESI) подавляющего числа глюкуронидов предпочтителен положительный режим; это наблюдение справедливо при использовании как кислых (pH<3), так и – в значительной степени – более основных элюентов. Почти все обнаруженные

глюкурониды подвержены частичной фрагментации при положительной ESI, хотя в условиях отрицательной ESI эти соединения проявляют большую стабильность, Рис. 2. Выбор иона-прекурсора определяется относительной интенсивностью фрагментного иона (МС) и матричными влияниями. Ионы, соответствующие фрагментации остатка глюкуроновой кислоты в МС(n) спектрах обычно малоинтенсивны или отсутствуют.

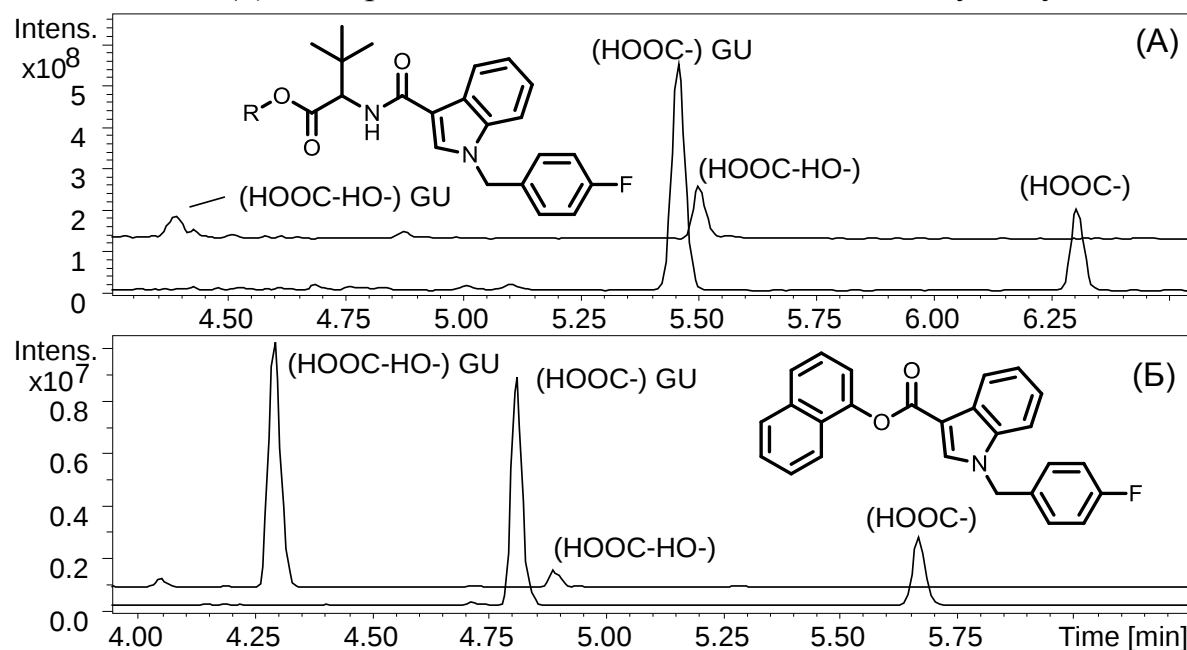


Рис. 1. Метаболиты СК ADB-FUBINACA (А) и FDU-PB22 (Б) в моче (GU – глюкуронид)

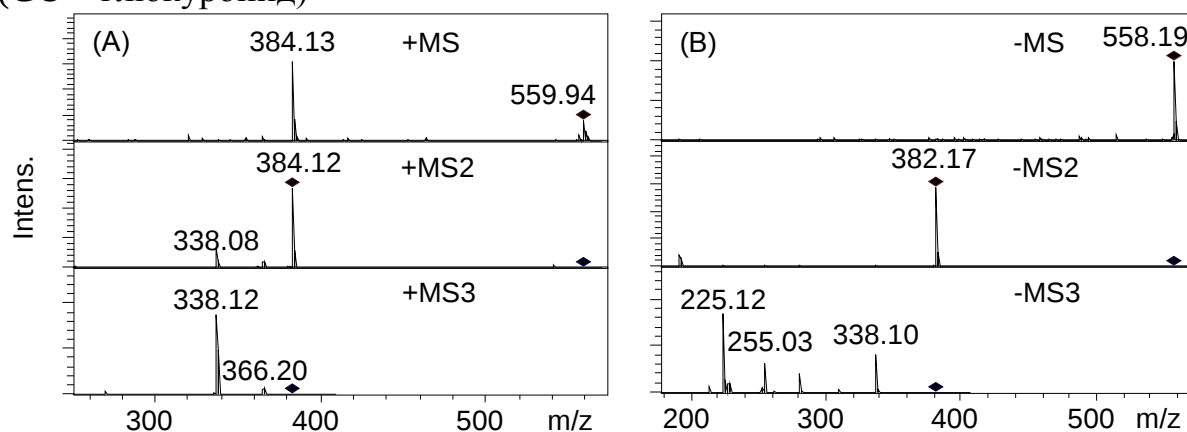


Рис. 2. Масс-спектры глюкуронида карбоксилированного метаболита СК FDU-PB22. ESI+ (А). ESI- (Б)

Литература.

1. Bolze S., et al. Standardization of a LC/MS/MS Method for the Determination of Acyl Glucuronides and Their Isomers // Curr. Sep. – 2002. – Vol. 20. – P. 55–59.
2. Maurer H., Wissenbach D.K., Weber A.A. LC-MCn Library of Drugs, Poisons, and Their Metabolites. Wiley-VCH KgGA. 2014.

Применение методов газовой и жидкостной масс-спектрометрии в ХТЛ гбуз «наркологический диспансер» министерства здравоохранения краснодарского края

Д.А.Любченко, Е.В.Светличная

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Наркологический диспансер» министерства здравоохранения
Краснодарского края, г. Краснодар

Химико-токсикологическая лаборатория (далее – ХТЛ) ГБУЗ «Наркологический диспансер» министерства здравоохранения Краснодарского края является одной из крупнейших лабораторий в Южном федеральном округе. ХТЛ проводит исследование биологического материала (кровь, моча) на наличие этилового алкоголя и его суррогатов, наркотических средств и психотропных веществ (далее - НС и ПВ), включая новые «дизайнерские» наркотические средства.

Техническая база ХТЛ представлена линейкой высокотехнологичного оборудования в разделе проведения исследований биологического материала на наличие НС и ПВ: 5 газовых хроматографов Маэстро 7820, один из которых укомплектован станцией для пробоотбора на 150 образцов и анализатор НС и ПВ Toxtyper на базе жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 RS Pump с масс-спектрометрическим детектором Bruker Amazon Speed.

В ХТЛ проводятся следующие виды исследований: количественное исследование биоматериала на наличие этилового алкоголя и его суррогатов, исследование на наличие НС и ПВ, включая группы психостимуляторов, синтетических каннабимиметиков и др. токсических веществ.

В биоматериале потребителей НС и ПВ наиболее часто идентифицируются каннабиноиды (в 64 % случаев положительных результатов исследования), далее – группа психостимуляторов (в 23 % случаев), различные комбинации лекарственных веществ – в 10 % случаев, в 5 % случаев – другие группы НС и ПВ.

Следует отметить, что анализ результатов химико-токсикологических исследований (далее - ХТИ) биоматериала, поступившего из ЛПУ Краснодарского края и г. Краснодара в 2014 году – 1 полугодии 2015 года, показал наличие процесса «взаимозамещения» среди синтетических психостимуляторов: метилендиоксипиравалерон (MDPV) активно вытесняется из нелегального оборота α -пирролидинвалерофеноном (α -PVP).

Идентификация в биоматериале при исследовании психостимуляторов не вызывает затруднений, они легко

идентифицируются в биоматериале в виде нативных веществ и метаболитов. Время обнаружения зависит от дозы, частоты приема и составляет, в среднем, до 5 суток.

Определение синтетических каннабимиметиков в биоматериале сопряжено с определенными трудностями ввиду особенностей их физико-химических свойств, стремительному метаболизму, а также проблем, возникающих на преаналитическом этапе (несвоевременный отбор образцов биоматериала и т.д.). В ХТЛ, методом газовой масс-спектрометрии и tandemной жидкостной масс-спектрометрии, идентифицируются следующие синтетические каннабимиметики: RB-22 и RB-22F, AB-PINACA, AB-CMINACA и MDMB-FUBINACA. [1,2,3]

Внедрение в работу ХТЛ метода жидкостной tandemной масс-спектрометрии значительно расширило возможности лаборатории при определении НС и ПВ. Впервые была реализована методика определения искомых аналитов в нетрадиционных биологических объектах: волосы и срезы ногтевых пластин. [4]

Наиболее показательным примером совместного применения в практике ХТЛ является исследование биологических объектов пациента К., 20 лет, поступившего в РО БСМП с диагнозом «Отравление неизвестным веществом». Результаты исследования биоматериала (кровь) методом газовой масс-спектрометрии (далее – ГХ/МС) отрицательные. Позже, К., был доставлен в приемное отделение ГБУЗ НД в психомоторном возбуждении, галлюцинациями, бредом и т.д. Отобранные образцы биоматериала (моча) исследованы методом ГХ/МС, установлено наличие карбамазепина и пираретама – лекарственных веществ, примененных в РО БСМП. Пациент анамнез не раскрывает, употребление НС и ПВ отрицает.

С целью уточнения диагноза, произведен отбор волос с теменной части головы и срезов ногтевых пластин с рук и ног. После проведения процедур пробоподготовки, методом tandemной жидкостной масс-спектрометрии, в исследуемых образцах установлено наличие α -PVP, RB-22F и метадона.

Таким образом, совместное использование в практической работе ХТЛ методов ГХ/МС и жидкостной tandemной масс-спектрометрии позволяет в значительной мере совершенствовать процессы идентификации НС и ПВ в биологических объектах, значительно расширить перечень исследуемых биологических матриц человека с целью получения достоверного результата исследования.

Список литературы:

1. Гизетдинова Л.А., Мингазов А.А., Нугманова Р.Р., Дернова О.А., Пиляева А.Р., Савчук С.А., Хромато-масс-спектрометрическое определение нового наркотического средства метоксетамина и синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, FUB- PB-22F в биологических жидкостях и образцах волос в Набережночелнинском наркологическом диспансере // Наркология. - 2014. - № 3 .- С. 66-73.
2. Информационное письмо «Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в моче, волосах и сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием» (Авт. Савчук С.А. и др.): утв. Директором ФГБУ ННЦ Наркологии Минздрава России.
3. Информационное письмо «Обнаружение синтетических каннабимиметиков, наркотических, психотропных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием» (Авт. Савчук С.А. и др.): утв. Директором ФГБУ ННЦ Наркологии Минздрава России.
4. Савчук С.А., Никитина Н.М., Бондарь И.В., Надеждин А.В., Тетенова Е.Ю., Ковинька М.А., Богинская Д.Д. Оптимизация методов пробоподготовки волос для анализа наркотических веществ методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием // Наркология. – 2014. - № 8. – С.35-41.

Попытка создания унифицированного метода количественного определения ряда лекарственных средств в трупной крови с внутренним стандартом на основе ЖЖЭ и ВЭЖХ-УФ

П.В.Никитин

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Кемеровской области особого типа «Кемеровское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы», г. Кемерово

Для достоверного определения концентрации большого числа лекарственных средств (ЛС) в трупной крови, как в объекте, имеющем наибольшее значение для судебно-медицинской оценки факта обнаружения того или иного токсиканта в биоматериале, наиболее оптимальным (если не единственно возможным) является использование внутреннего стандарта (ВС). Именно применение ВС позволяет не только учесть все особенности изолирования конкретного ЛС из крови (скомпенсировать погрешность систематическую), но и свести к минимуму возможности разнообразных потерь в каждом конкретном определении (заметить и устранить погрешность случайную). Минимизировать временные и материальные затраты на проведение подобного определения возможно только при использовании некоего единого (и, желательно, максимально простого) способа изолирования и единого ВС. Использование для градуировки стандартных растворов ЛС, приготовленных не из чистых фармацевтических субстанций или их ГСО, а из доступных коммерческих форм с уже «заложеными» в них погрешностями дозирования [2], как показывает наш опыт, требует обязательного дополнительного подтверждения рассчитанной концентрации неким «независимым» методом.

Само хроматографическое определение было реализовано с помощью хроматографа Милихром А-02, базы данным БД-2003 (и ее стандартизованных условий хроматографирования) [4]. В качестве единого ВС был выбран метронидазол; стандартный раствор был приготовлен из таблеток 250 мг (возможно использование готовой коммерческой формы - 0,5% раствора для инъекций и для инфузий) [3], [5], [6]. Концентрацию рабочих стандартных растворов ЛС и их концентрации в крови для градуировки подбирали исходя из наиболее интересующего нас диапазона (...максимальный терапевтический – минимальный токсический...), их поглощающей способности, предполагаемого выхода при изолировании и оптимальной для регистрации прибором площади пика на хроматограмме. За основу методики изолирования была принята описанная ранее [1], с минимальными дополнениями; реконструкция сухого остатка извлечения проводилась одновременно с экстракционной очисткой его.

Помимо построения градуировочных графиков – как важную «побочную» информацию - определяли и выход ЛС при их изолировании; он составлял от 0,8% (теофиллин) до 92% (трамадол). Графики обсчитывали стандартными средствами Excel, по линейному уравнению со свободным членом; коэффициенты детерминации регрессий, как правило, составляли 0,99-0,999.

Было построено 18 градуировочных графиков на ЛС самой разной химической природы, включая вещества кислого (фенобарбитал), амфотерного (парацетамол, кофеин, теофиллин, пентоксифиллин) и основного (аминазин, амитриптилин, анаприлин, дибазол, димедрол, дипразин, дротаверин, карбамазепин, кетамин, кордиамин, метоклопрамид, папаверин, трамадол) характера; за 4 месяца с их помощью в отделении было проведено около 40 количественных определений. Для пополнения базы графиков была предложена и отработана единая унифицированная последовательность действий.

В планах на будущее – обязательная полноценная валидация этого метода с определением необходимых метрологических характеристик его и ограничений; пока же это – некая схема-модель, более-менее успешно опробованная на достаточно широком круге веществ, но уже позволившая получить конкретные экспертные результаты.

Список литературы

1. Барсегян С.С., Николаева Н.О., Онищенко М.М., Саломатин Е.М., Сальникова Е.А. Определение клозапина при судебно-химическом исследовании трупной крови, мочи и печени с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии. – Суд.-мед.эксперт.-2012.-№ 4.-С.43-47.
2. Государственная фармакопея СССР IX издания: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье /МЗ СССР.-11-е изд., доп.-М.: Медицина, 1989-400 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В двух частях. 12-е изд., перераб. и доп. - М.:Медицина, 1993.
4. Хроматограф «Милихром А-02». Определение веществ с применением баз данных «ВЭЖХ-УФ». Сборник /сост. Г.И.Барам). – Новосибирск, 2005.-64 с.
5. Clarke`s isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. - London, 1986.-1224 p.
6. Toxicological Analysis /ed. by R.K.Mueller. - Leizig: Edition MOLINApress, 1995.-846 p.

Обнаружение метаболитов нового синтетического каннабимиметика индольной природы MDMB-CHM

¹А.Л. Печников, ²А.Б. Васильев, ³А.М. Григорьев

¹ГКУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Ямало-Ненецкого автономного округа», г. Салехард.

²БУ Чувашской Республики "Республиканский наркологический диспансер" Минздравсоцразвития Чувашии, г. Чебоксары

³ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области», г. Москва.

Важнейшей особенностью группы синтетических каннабимиметиков является высокая структурная вариабельность: около 30 новых соединений включаются в ежегодные отчеты Европейского мониторингового центра по наркотикам и наркотической зависимости [1]. Почти полный метаболизм, связанный с высокой гидрофобностью нативных веществ, приводит к необходимости обнаружения в биологических объектах метаболитов для использования их в качестве биомаркеров употребления. В данном докладе обсуждаются хромато-масс-спектрометрические характеристики предполагаемых метаболитов нового каннабимиметика, имеющие практическое значение для их обнаружения методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии в биологических объектах.

Эксперимент. Поиск метаболитов выполняли следующими хромато-масс-спектрометрическими методами:

- газовым: хроматограф 7890, колонка HP-5MS, масс-спектрометр 5975 (моно-Q), Agilent Technologies, режим электронной ионизации (EI);
- жидкостным: хроматограф UltiMate 3000 (Thermo Scientific), колонка Acclaim RSLC 120 C18, масс-спектрометр AmaZon Speed (ионная ловушка, Bruker Daltonics), режим электрораспылительной ионизации (ESI).

Для ГХ-МС метаболиты фазы II деконъюгировали в присутствии HCl и NaOH с последующей жидкостной экстракцией из объединенных гидролизатов, и дериватизацией триметилсилилированием и метилированием. Для ЖХ-МС\МС метаболиты обеих фаз извлекали ацетонитрилом.

Результаты. Определение структуры исходного соединения затруднительно ввиду легкой гидролизуемости сложных эфиров в организме. Однако можно предположить, что оно является индольным аналогом MDMB-CHMINACA [2]. В двух исследованных образцах мочи обнаружили карбоксилированный метаболит (I) и метаболиты, образованные в результате дополнительных процессов:

моногидроксилирования по алифатическим остаткам (II), дигидроксилирования по алифатическим остаткам (III), образования кетогруппы на циклогексановом остатке (IV), образования лактона после моно- и полигидроксилирования (V), (Рис. 1). Для метаболитов I и II обнаружили глюкуронидированные формы.

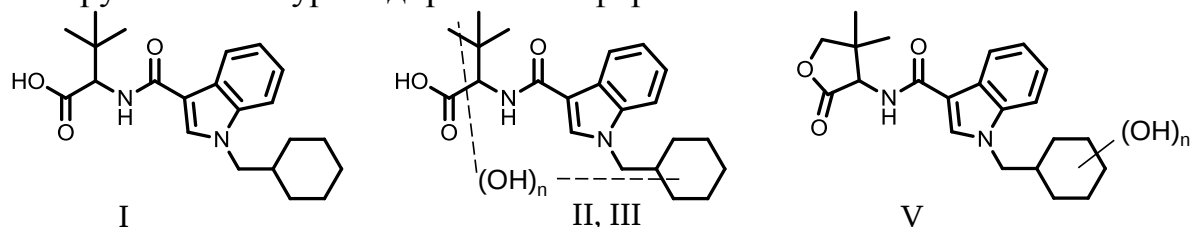


Рис. 1. Предполагаемые структурные формулы метаболитов.

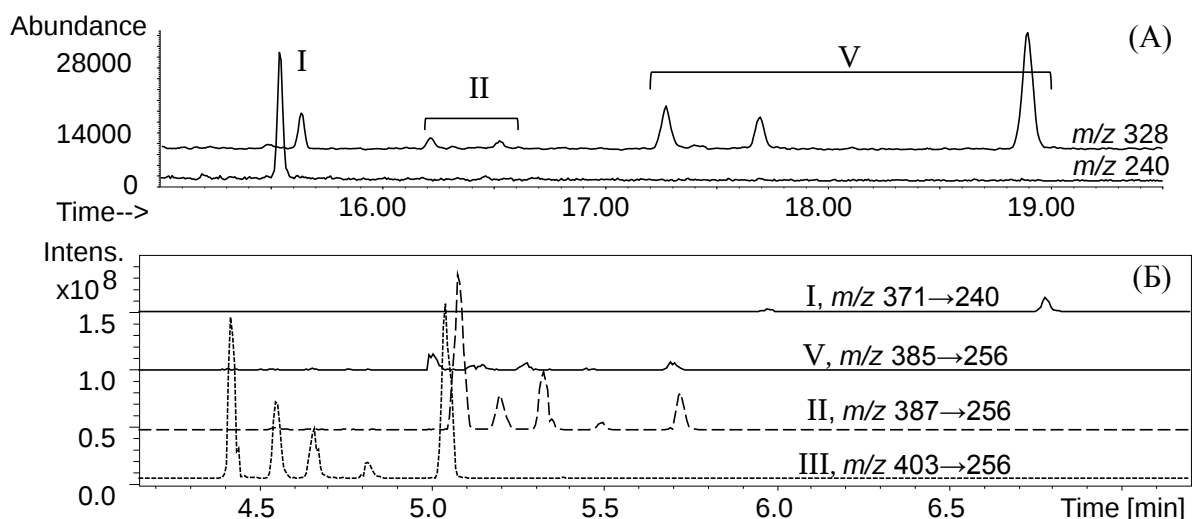


Рис. 2. Хроматограммы мочи. ГХ-МС, EI, TMS (А). ЖХ-МС\МС, ESI, (В)

Найдено, что лактоны (V) легко образуются при кислотном деконъюгировании, грубом закислении образца, или при перегревании в процессе пробоподготовки. В таких случаях соединения (V) являются специфичными артефактами пробоподготовки – вторичными биомаркерами употребления. Для диагностики факта употребления наиболее удобными специфичными биомаркерами употребления нового каннабимиметика MDMB-CHM найдены метаболиты I и II.

Литература.

1. European Monitoring Centre for Drug and Drug Addiction. European Drug Report 2015. Trends and Developments.
2. Печников А.Л., Катаев С.С., Лабутин А.В. с соавт. Идентификация синтетических каннабимиметиков MDMB-CHMINACA, MDMB-FUBINACA и их метаболитов. Наркология. 2015. №2. С. 29-49.

Применение нового реагента для обнаружения синтетических катинонов в моче.

Е.В. Москалева

Центральная химико-токсикологическая лаборатория Первого
Московского государственного медицинского университета имени И.М.
Сеченова, г. Москва

Катиноны – обширная группа синтетических дизайнерских наркотиков, появившаяся в США с 2004 г., в Европе с 2008 г., на территории Российской Федерации - с 2010г.

Основу катинонов представляет фенилэтиламин с кето-группой в β -положении.

В настоящее время известно более 50 различных производных катинона, обладающих стимулирующим действием за счет ингибирования обратного захвата и стимулирования выработки дофамина, норадреналина или серотонина в нервных окончаниях.[5] Механизм действия и клиническая картина отравления аналогичны группе амфетаминов.

Мефедрон (4-метилметкатинон, 4-ММС), метилон (MDMC, 3,4-метилендиоксиметкатинон) и 3,4-метилендиоксипировалерон (MDPV) входят в состав порошка, продаваемого под названием “Соль для ванн”.

При проведении судебно-наркологических экспертиз (СНЭК) по уголовным делам, связанным с незаконным оборотом наркотиков фигурировали наркотические «соли», содержащие мефедрон в 11,1 % случаев, метилендиоксипировалерон — 33,3 % и альфа-PVP — 55,6 % соответственно. Возрастной состав потребителей «солей» (от 19 до 44 лет) не выявил заметного преобладания какой-либо возрастной группы.[1]

Согласно исследованиям, MDPV - самый распространенный синтетический катинон, поднимает уровень дофамина так же, как и кокаин, но в 10 раз сильнее. В тоже время, α -PVP (α -пирролидиновалерофенон) достаточно быстро попал в поле зрения правоохранительных органов. Вызываемые эффекты сравнимы с MDPV, что делает вещество крайне опасным.[2-4]

В центральную химико-токсикологическую лабораторию поступило обращение о проведении судебно-химического исследования биологического материала трупа 32-летнего мужчины на наличие наркотических и психоактивных веществ.

В отделе судебно-медицинской экспертизы трупов было проведено судебно-медицинское исследование, при котором никаких повреждений и заболеваний, способных вызвать наступление смерти, установлено не было. При изучении обстоятельств дела смерти установлено, что смерть

наступила скоропостижно. При судебно-гистологическом исследовании кусочков внутренних органов выявлены микроскопические признаки острой интоксикации, однако при проведенном судебно-химическом исследовании никаких токсических веществ, установлено не было.

В лабораторию были доставлены следующие образцы трупного материала: кровь, моча, печень, легкие, головной мозг. В ходе предварительного ХТИ с помощью иммунного анализатора ИК 200609T&D Innovationen GmbH (Германия) в образце мочи обнаружены вещества группы синтетических катинонов (MDPV, α -PVP, α -PHP) в концентрации 376,64 нг/мл. По итогам подтверждающих ХТИ методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС было обнаружено вещество α -PVP (1-phenyl-2-(1-pyrrolidinyl)-1-pentanone) и его метаболиты - Hydroxy- α -PVP, 2-Oxo- α -PVP и Hydroxy- α -PVPglucuronide.

В связи с тем, что в нашей стране участились случаи злоупотребления и проявления тяжелых интоксикаций синтетическими катинонами, перед нами была поставлена задача разработать быстрый, чувствительный и доступный метод для обнаружения в моче веществ из этой группы.

В качестве предварительного иммунохроматографического метода анализа нами впервые предложен диагностический реагент, на который нанесены неспецифические антитела («сухая иммунохимия»), что позволяет за несколько минут обнаружить в моче вещества, относящиеся к группе синтетических катинонов.

По результатам проведенных нами исследований с положительными образцами можно сделать вывод о том, что при совместном использовании реагента и химико-токсикологического анализатора ИК 200609 при соблюдении правил анализа мы получаем содержание (концентрацию, нг/мл) катинонов в моче, наличие которых далее подтверждается методами ГХ-МС и (или) ВЭЖХ-МС/МС. Данный реагент может значительно сэкономить время при проведении ХТИ в клинико-диагностической и судебно-химической практике.

Список литературы:

1. Соснина В. С. и др. Диагностика потребителей новых групп психоактивных веществ в практике работы отделения наркологических экспертиз //Медицина и образование в Сибири. – 2012. – Т. 2012. – №. 2.
2. Bonano J. S. et al. Abuse-related and abuse-limiting effects of methcathinone and the synthetic “bath salts” cathinone analogs

methylenedioxypyrovalerone (MDPV), methylone and mephedrone on intracranial self-stimulation in rats //Psychopharmacology. – 2014. – T. 231. – №. 1. – C. 199-207.

3. Casale J. F., Hays P. A. The characterization of α -pyrrolidinopentiophenone //Microgram J. – 2012.– T. 9. – C. 33-38.
4. Kolanos et al. Structural modification of the designer stimulant α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) influences potency at dopamine transporters //ACS chemical neuroscience. – 2015.
5. Rosenbaum, Ch.D.,Carreiro, S.P., Babu, K.M. Here today gone tomorrow...and back again? A review of herbal marijuana alternatives (K2, spice), synthetic cathinones (bath salts), Kratom, *Salvia divinorum*, methoxetamine, and piperazines. *J. Med. Toxicol.* 2012;8:15–32.

**Поисковая ЖХ-МС\МС библиотека для обзорного анализа мочи
(синтетические каннабимиметики и
иные дизайнерские наркотики)**

¹О.Л. Заикина, ²А.М. Григорьев

¹Государственное казенное учреждение здравоохранения «Ленинградский областной наркологический диспансер», Ленинградская область.

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области», Москва.

Возможности обзорного (скринингового) хромато-масс-спектрометрического анализа определяются полнотой поисковых библиотек и качеством содержащейся в них информации. Учитывая сравнительную информационную обедненность масс-спектров, получаемых в режимах электрораспылительной ионизации и последующей столкновительной диссоциации, такие библиотеки обязательно должны содержать характеристики удерживания аналитов. В настоящее время поисковые библиотеки, предназначенные для химико-токсикологического анализа биологических объектов выпускаются рядом фирм-производителей масс-спектрометров (Bruker Daltonics, Agilent Technologies; Shimadzu, Sciex и пр.), а также отдельными исследовательскими группами (<http://www.chemicalsoft.de>). Можно выделить, по крайней мере, два существенных недостатка этих библиотек, ограничивающих их ценность для аналитика:

1. Ориентация на определение исходных веществ, попадающих в организм и, таким образом, фокусирование на анализ слюны или препаратов крови.

2. Медленная обновляемость, что совершенно недопустимо в условиях непрерывного появления новых соединений.

Ввиду того, что бедность матрицы (упрощающая пробоподготовку) и неинвазивный характер отбора делают мочу наиболее пригодным объектом для химико-токсикологического анализа, поисковая библиотека должна включать характеристики как можно большего числа метаболитов. Это характерно для библиотеки MWW [1], однако, периодичность ее обновления пока неизвестна.

В данной работе мы представляем новую обновляемую ЖХ-МС\МС библиотеку, предназначенную для использования в скрининговом методе анализа мочи. Для ее формирования использовали систему, состоящую из ВЭЖХ/МС с тройным квадруполом, японского производства. Подготовку проб, ориентированную на возможность обнаружения глюкуронидов, проводили с помощью жидкостной и твердофазной экстракции, а также извлечения ацетонитрилом [2]. При поиске соединений, предназначенных

для включения в библиотеку, использовали результаты анализа мочевых образцов методом ГХ-МС. В настоящее время библиотека содержит около 200 спектров МС\МС, представляющих метаболиты синтетических каннабимиметиков и ряд дизайнерских наркотиков и организована в форматах NIST.

Литература.

1. Maurer H., Wissenbach D.K., Weber A.A. LC-MCn Library of Drugs, Poisons, and Their Metabolites. Wiley-VCH KgGA. 2014.

2. Заикина О.Л., Григорьев А.М. Метаболиты фазы II синтетических каннабимиметиков в моче: нужна ли пробоподготовка? Судебная медицина. 2015. Т.1. №2. С. 66-67.

Разработка методик идентификации и количественного определения некоторых атипичных нейрорептиков в биологических объектах

**И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, А.В. Воронков, М.В. Сварыч,
А.С. Рыбасова, Д.Ю. Санжиева**

Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ГБОУ ВПО

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Пятигорск

На сегодняшний день отсутствуют данные литературы об эффективности и безопасности длительного приема препаратов нового поколения атипичных нейрорептиков, к которым относятся сертиндол, оланзапин, арипипразол и другие [1]. Сведения, касающиеся непосредственного сравнения эффективности и безопасности атипичных нейрорептиков, немногочисленны. Эти препараты, в связи с широким применением в психиатрии в комбинации с другими препаратами, представляют интерес в области изучения не только лечебных свойств в терапевтических дозах, но и токсических эффектов при передозировках и отравлениях. Поэтому необходима разработка схем химико-токсикологического анализа сертиндола, оланзапина и арипипразола при комбинированных отравлениях.

Предварительно нами изучено влияние некоторых факторов экстракции (природа органического растворителя, рН среды, наличие электролита, время и кратность экстракции), так как условия изолирования одного и того же токсического вещества из разных объектов могут различаться.

Для разработки эффективной методики изолирования сертиндола, оланзапина и арипипразола вводили вещества в виде суспензии в желудок в концентрации, являющейся токсической. По истечении 24 часов животных вводили в наркоз, декапитировали и отбирали внутренние органы и кровь. Мочу собирали в течение суток. Сертиндол, оланзапин и арипипразол из желудка с содержимым, кишечника с содержимым, печени, почек, головного мозга, сердца изолировали по методу Васильевой А.А. и разработанной модифицированной методикой.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в течение 24 часов после острого отравления, в максимальном количестве сертиндол накапливался в печени ($9,99 \pm 1,29$ %) и в мозге ($11,97 \pm 2,59$ %). В почках, желудке и кишечнике с содержимым сертиндол обнаруживался в меньших количествах. В извлечениях из сердца сертиндол не обнаруживался. На основании полученных результатов нами рекомендуется в качестве

оптимального биологического объекта при исследовании внутренних органов на сертиндол использовать печень и мозг. В течение 24 часов после острого отравления оланзапин в максимальном количестве накапливается в мозге ($11,83 \pm 0,98$ %), в печени и почках он обнаруживался в меньших количествах. В извлечениях из желудка с содержимым, кишечника с содержимым и сердца оланзапин не обнаруживался. Поэтому нами в качестве оптимального биологического объекта при исследовании внутренних органов на оланзапин при остром отравлении рекомендуется использовать мозг. Арипипразол после острого отравления, в максимальном количестве накапливался в почках ($17,23 \pm 0,88$ %) и в мозге ($15,38 \pm 5,72$ %). В печени содержание исследуемого вещества было значительно ниже ($5,15 \pm 0,73$ %). В извлечениях из сердца арипипразол не обнаруживался. Поэтому нами в качестве оптимального биологического объекта при исследовании внутренних органов на арипипразол при остром отравлении рекомендуется использовать мозг.

Предварительное исследование сертиндола, оланзапина и арипипразола нами предлагается проводить по разработанным нами методикам с помощью ТСХ [2,3]. Для обнаружения изучаемых веществ в извлечениях из внутренних органов использовали физико-химические методы: ТСХ и ВЭЖХ. Для количественного определения сертиндола, оланзапина и арипипразола использовали метод ВЭЖХ.

Таким образом, нами предложены методики изолирования сертиндола, оланзапина и арипипразола из внутренних органов лабораторных животных, а также методики их обнаружения и количественного определения.

Список литературы:

1. Данилов, Д.С. Влияние побочных эффектов и осложнений, вызываемых атипичными нейролептиками на эффективность терапии у больных шизофренией/ Д.С. Данилов// Журнал неврологии и психиатрии.- 2010.-№3.- С. 48-55.
2. Обнаружение клозапина, рисперидона, сертиндола, оланзапина, арипипразола с помощью метода тонкослойной хроматографии/ И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, Т.И. Максименко и др.// Научное обозрение.- 2014.-№12, Ч.1.- С. 207-210.
3. Разработка методик обнаружения некоторых атипичных нейролептиков для целей химико-токсикологического анализа/ И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, Т.И. Максименко и др.// Фармация и фармакология.-2014.-№6 (7).-С.54-59.

Идентификация метаболитов новых психоактивных веществ методом жидкостной tandemной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии.

А.В.Лабутин

ОГБУЗ «Томский Областной наркологический диспансер», г. Томск
ООО "Компания Лабтех", Москва

В последние годы широкое распространение получили новые синтетические наркотические средства, в частности, курительные смеси «Спайс», действующими веществами которых являются синтетические каннабиноиды. Несмотря на то, что неклассические синтетические каннабиноиды (вещества, являющиеся аффинными лигандами по отношению к СВ₁ и СВ₂ рецепторам, но не являющиеся каннабиноидами по своей сути) известны с конца 60-х годов [1], в качестве наркотических средств они стали активно применяться лишь в начале 2000-х. Это привело к внесению данных соединений в список запрещенных к обороту веществ, однако на смену запрещенным постоянно приходят новые, не уступающие, а порой и превосходящие по своему воздействию вещества.

Известно [2, 3], что основным путем выведения каннабимиметиков из организма является их окисление, которое может выражаться в образовании метаболитов I и II фазы. В ходе протекания I фазы метаболизма может происходить как упрощение исходной структуры (например, деалкилирование, гидролиз), так и её усложнение (моно- или поли-гидроксилирование, карбоксилирование, карбонилирование). В результате этих процессов, как правило, образуются более гидрофильные соединения, которые могут выводиться из организма с мочой. В ходе протекания II фазы метаболизма происходит образование конъюгатов исходных соединений или метаболитов I фазы с мочевыми кислотами [4].

В случае гидролиза сложноэфирной связи и гидролиза терминальных амидных групп молекулярная масса метаболита устанавливается исходя из структуры определяемого соединения. Возможно также появление метаболитов, структура которых может обуславливаться комбинированием нескольких описанных выше процессов превращения в ходе протекания обмена веществ.

Для проведения нецелевого скрининга синтетических каннабимиметиков и других психоактивных веществ в биологических жидкостях нами предложен подход, основанный на том, что в ходе обмена веществ образуются метаболиты, имеющие в своей основе ту же базовую структуру, что и исходное вещество. Зная точную мол. массу последнего, а также основные возможные пути метаболизма (табл. 1), можно предположить набор молекулярных и псевдомолекулярных ионов

метаболитов, а, исходя из исходной, базовой структуры анализата, можно предположить некоторые общие ионы-продукты и рассчитать их точную массу.

Таблица 1. Основные наблюдаемые сдвиги масс при протекании некоторых метаболических процессов I фазы [5]

Процесс	Изменение номинальной массы, Да
Гидроксилирование	+15.9949
Дигидроксилирование	+31.9898
Дефторирование с последующим гидроксилированием	–1.9957
Окисление пентильной группы до 4-карбоксибутильной	+29.9741
Дефторирование 5-фторпентильной группы с последующим с окислением до 4-карбоксибутильной	+11.9835
Дезметилирование	–14.0156
Окисление с деградацией пентильной (5-фторпентильной) цепочки до 2-карбоксиэтильной группы	–1.9429 (–16.0477 для фторалкилированных психоактивных веществ)

Для уменьшения количества вероятных кандидатов предлагается использовать также и точность определяемых масс: для протонированных молекул удовлетворительным является расхождение в массах не более 10 ppm, а для ионов-продуктов – не более 20 ppm.

Особо следует отметить, что обязательным условием рассматриваемого варианта скрининга является наличие общих ионов, характеризующих базовую структуру нативного соединения или ионов, связанных с ними структурно с учетом возможных протекающих процессов.

1. Weissman A., Milne M. G., Melvin S. L. Cannabimimetic activity from CP-47.497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol // *J. Pharm. Exp. Therap.* 1982. Vol. 233, N 2. P. 516–523.
2. Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids // *Drug Test. Anal.* 2012. Vol. 4, N 10. P. 745–753.
3. Peters F.T., Meyer M.R. *In vitro* approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds // *Drug Test. Anal.* 2011. Vol. 3, N 7–8. P. 483–496.
4. Temerdashev A.Z., Grigor'ev A.M., Rybal'chenko I.V. Evolution of new narcotic substances and methods of their determination // *J. Anal. Chem.* 2014. Vol. 69, N 9. P. 899–926
5. Strano-Rossi S., Anzillotti L., Castrignano E., Romolo F.S., Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1258. P. 37–42.

Проблемы немедицинского применения производных гамк в республике северная осетия-алания

М.Ф. Правдюк

ГБУЗ «Республиканский наркологический диспансер», г. Владикавказ

Актуальной проблемой современного общества является употребление наркотических и психоактивных веществ, особенно в молодежной среде [1].

За последние годы в РСО-Алания отмечается повышенный спрос на так называемые «аптечные наркотики», в частности на лекарственные препараты производных γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Наиболее популярен из них лекарственный препарат (ЛП) прегабалин (торговое название «Лирика»).

Отмечен так же повышенный интерес к другим производным ГАМК - фенибуту, баклофену, тебантину.

Несмотря на структурное сходство, данные препараты обладают разными фармакологическими эффектами.

Рецептурный отпуск на эти ЛП малоэффективен: аптеки продолжают продавать их всем желающим, контроль отпуска затруднен. В результате, вышеназванные препараты, при их бесконтрольном применении сами вызывают зависимость [2, 3].

По информации Министерства здравоохранения, препарат «Лирика» назначается пациентам в крайне незначительном объеме, который в несколько сот раз меньше объема, ввозимого и реализуемого на территории республики.

В связи с участвовавшими случаями немедицинского применения препарата «Лирика» с целью получения одурманивающего эффекта Приказом №542 от 02.08.2013 года «О порядке учета, выписки и отпуска по рецептам лекарственного препарата «Лирика» (Прегабалин) по Министерству Здравоохранения РСО-Алания введен предметно-количественный учет ЛП «Лирика» в аптечных и лечебно-профилактических учреждениях с 1 августа 2013 года. Однако, уже 03.07.2014 года в силу вступает Приказ МЗ РСО-Алания № 428, в котором говорится об утрате силы Приказа №542 от 02.08.2013 года «О порядке учета, выписки и отпуска по рецептам лекарственного препарата «Лирика».

Данные по количеству выявленных производных γ -аминомасляной кислоты среди всех анализов, поступивших за период 2012-2015 (первое

полугодие) гг. в химико-токсикологическую лабораторию ГБУЗ «Республиканский наркологический диспансер» приведены в таблице № 1.

Таблица № 1 - Динамика обнаружения производных ГАМК

Наименование ЛП	Период исследования, г.			
	2012	2013	2014	2015 (6 мес.)
	Количество, шт.			
Лирика	17	265	329	274
Баклофен	10	48	14	8
Тебантин	0	0	4	2

Как видно из таблицы 1, в настоящее время отмечаются многочисленные факты массового немедицинского употребления лекарственного препарата «Лирика».

По информации наркологического диспансера, более 50% лиц, страдающих опиумной наркоманией, принимают ЛП «Лирика» не только для купирования проявлений абстинентного синдрома, но и для получения эйфорического эффекта, отмечается стойкая тенденция к сочетанному употреблению каннабиса с препаратами ГАМК (84 случая за 6мес 2015г). Особую озабоченность вызывает тот факт, что указанный ЛП приобретает популярность среди молодежной среды.

Список литературы:

1. Злоупотребление производными лекарственных препаратов / М.Л. Рохлина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.- 2013.- № 7, Т. 113.- С.55-59.
2. Пискунов, М.В. Зависимость от прегабалина («Лирика») / М.В. Пискунов, А.Н. Кривенков, Н.В. Рейхель // Наркология.- 2013.-№4.- С. 52-56.
3. Применение прегабалина без назначения врача / В.А. Солдаткин [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.- 2014. № 11, Т. 114.- С.37-39.

Определение летучих органических соединений в крови

Л.В.Тумурова, А.А. Максимов, Т.В.Доржиева

ГАУЗ «Республиканский наркологический диспансер», Улан-Удэ.

Диагностика алкогольного опьянения, отравления суррогатами алкоголя и другими летучими токсичными веществами является актуальной задачей химико-токсикологических исследований. Используемые, в большинстве лабораторий, методы определения летучих токсических веществ являются групповыми и не дают достоверной информации о наличии и количественном содержании суррогатов алкоголя[1,2]. В то же время разработаны селективные и высокочувствительные методы с использованием равновесной паровой фазы, без предварительного получения алкилнитритных производных, что делает определение более воспроизводимым. Теоретические основы метода изложены в классических монографиях [5,6] и обзоре [7].

Целью настоящей работы явилось внедрение статического парофазного газохроматографического метода в практику химико-токсикологической лаборатории республиканского диспансера для исследования биожидкостей на содержание алкоголя и его суррогатов, аттестация методики количественного определения этанола в крови. В работе использованы газовый хроматограф со статическим парофазным пробоотборником. Хроматограф снабжен пламенно-ионизационным детектором и колонкой HP-FFAP (50м;0,32 мм;0,5 мкм).

Подбор оптимальных условий хроматографирования осуществляли изменением скорости и времени инъектирования пробы, температуры термостата хроматографической колонки, изменением скорости газ-носителя.

В установленных оптимальных условиях хроматографирования были сняты хроматограммы индивидуальных растворов некоторых летучих органических соединений. Хроматограмма смеси соединений представлена на рис. 1.

Определены градуировочные характеристики: для этанола в диапазоне концентраций $0.03-6.0 \text{ г/дм}^3$, для метанола, ацетона и изопропанола $10-500 \text{ мкг/мл}$. Количественный расчет результатов определения проводили по методу внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали н-пропанол.

Выполнен значительный объем исследований с целью проведения аттестации методики. Методика аттестована (Свидетельство об аттестации №01.00225/205-34-14), зарегистрирована и внесена в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений под номером ФР.1.31.2.14.19160.

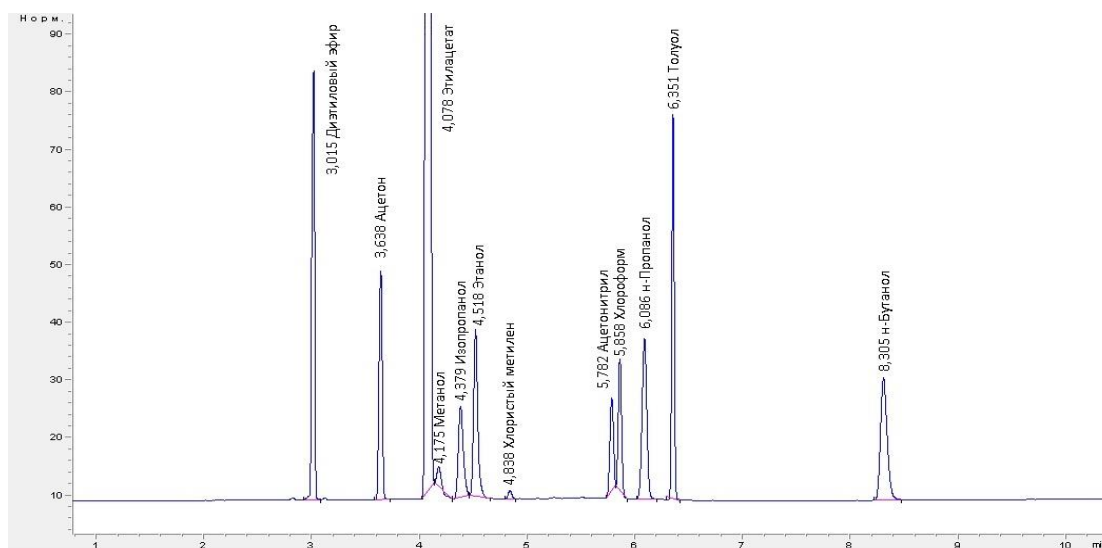


Рис. 1. Хроматограмма смеси летучих органических соединений

Таким образом, разработанная методика используется в лаборатории для исследования крови на содержание алкоголя и его суррогатов, в самых различных целях., в частности, во исполнение приказа Министерства здравоохранения Республики Бурятия от 18.11.2011 № 1217-ОД «Об организации мониторинга зарегистрированных отравлений и случаев летальных исходов, причиной которых явилось употребление алкоголя и его суррогатов в разрезе районов Республики Бурятия»

1. Пономарев В.Ф. Определение этилового спирта в крови методом газо-жидкостной хроматографии. В кн. Сб. трудов Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы и кафедры судебной медицины Таджикского ГМИ им. Абу али Ибн-Сино. Вып. 9. Душанбе, 1967, с.57-59.

2. Карандаев И.С., Колосова В.М. Фотометрический метод определения алкоголя в крови. Методика определения описана в кн. Швайковой М.Д. Токсикологическая химия.. Изд 3. М.: Медицина, 1975 г.

3. Савчук С.А., Веденин А.Н. Обнаружение и количественное определение летучих токсичных веществ и гликолей в биологических объектах методами газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. М.: Пособие для врачей. 2003, 33 с.

4. Ramsey J.D. Detection and identification of volatile organic compounds in blood by head space gas chromatography as an aid to diagnosis of solvent abuse. J. of Chromatography. 1982, V.240, p.423-444.

5. Витенберг А.Г., Иоффе Б.В. Газовая экстракция в хроматографическом анализе. Ленинград, Химия, 1982, 278 с.

6. Хахенберг Х., Шидт А. Газохроматографический анализ равновесной паровой фазы. М., Мир, 1979, 160 с.

7. Витенберг А.Г. Статический паровфазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения. Рос.хим.ж.(Ж. хим. общества им. Д.И.Менделеева), 2003, т.XLYII, №1, с. 7-22.

**Интерлаб - разработчик и производитель аналитического
оборудования для химико-токсикологических исследований**

Иванов К.В.

Директор по продажам и маркетингу
ООО «Интерлаб»

Отечественный разработчик и производитель аналитического оборудования и расходных материалов для хроматографии и пробоподготовки, которые используются для анализа наркотических и психотропных веществ при проведении ХТИ или СХ и КЭ.

Среди последних разработок следует отметить:

1. Маэстро ВЭЖХ - высокоэффективный жидкостный хроматограф с широким набором детекторов, включая уникальные, флуориметрический и спектрофотометрический, в которых используются практически вечные светодиоды в качестве источника излучения в широком диапазоне (от УФ до ближнего ИК) и современным программным обеспечением. МАЭСТРО ВЭЖХ имеет отличные эксплуатационные характеристики и отношение цена – качество.
2. Маэстро ГХ - газовый хроматограф нового поколения на платформе МАЭСТРО, имеющий Российское происхождение, качественные проверенные компоненты и элементную базу, современное программное обеспечение, новейшие технологии. На базе МАЭСТРО ГХ создан каталог готовых решений под ключ. МАЭСТРО ГХ может оснащаться масс-селективным детектором с улучшенными характеристиками и пробоотборником повышенной емкости и производительности.
3. TOXI-PROBES А и В - Жидкостно-жидкостные экстракционные трубки для очистки широкого спектра наркотиков из биологических(моча, кровь) и не биологических проб в одну стадию.

ООО Интерлаб оказывает методические консультации, проводит регулярные практические курсы операторов ГХ-МСД.

В 2015 году компания ООО «Интерлаб» получила аттестат аккредитации на право проведения государственной поверки средств измерения и стала оказывать услуги по поверке лабораторного оборудования от своего имени.

Прогнозирование появления новых видов синтетических каннабиноидов на нелегальном рынке наркотических средств

Веселов В.В.

Центральная химико-токсикологическая лаборатория Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, г. Москва

Период времени, начиная с 2008 года, охарактеризовался появлением на рынке наркотиков новых наркотических средств – синтетических каннабиноидов. На сегодня синтетические каннабиноиды занимают лидирующие позиции в обороте наркотиков, и уже насчитывается десяток различных структур. Поэтому очень важным является прогнозирование структур синтетических каннабиноидов, которые могут появиться на рынке наркотиков.

Создание новых синтетических каннабиноидов можно объяснить, в первую очередь, поиском веществ перспективных с точки зрения лечения онкологических, иммунологических и других заболеваний [1,2]. Интересными мишенями для разработки новых лекарственных средств являются CB_2 рецепторы. Исследования [3] показали, что умеренно избирательный агонист CB_2 рецептора активен в модели воспалительной боли, и что его антигипералгезирующие свойства в этой модели были заблокированы избирательным CB_2 антагонистом [4]. Впоследствии было показано, что этот агонист CB_2 рецепторов лишен типичных для CB_1 агонистов побочных эффектов, таких как седативный эффект и катаlepsия при дозах, которые показывают антигипералгезирующий эффект. В процессе исследования потенциальных селективных CB_2 агонистов не произвольно будут появляться и не селективные агонисты, которые в свою очередь могут попасть на незаконный рынок наркотиков.

В работе были проанализированы исследования по разработке CB_2 агонистов с целью выявления потенциальных наркотических средств, которые могут попасть на нелегальный рынок наркотиков. В первую очередь оценивались следующие параметры: селективность агониста, сродство к CB_1 рецепторам, токсичность, воспроизводимость и сложность синтеза, доступность веществ и оборудования необходимых для синтеза.

Были вывалены следующие группы веществ:

- Пиримидиновые каннабиноиды, один из представителей N-бензил-2[(3-хлорфенил)амино]-4-(трифторметил)пиримидин-5-карбоксамида (CB_1 $EC_{50} = 30$ nM, CB_2 $EC_{50} = 245$ nM)[5]

- Изатиновые каннабиноиды, один из представителей N-[5-хлор-1-гексил-2-оксо-2,3-дихлор-1H-индол-3-илиден]бензогидразид (hCB_1 $EC_{50} = 9 \pm 1.4$ nM, hCB_2 $EC_{50} = 6 \pm 1.4$ nM)[6]
- Бензодиоксановые каннабиноиды, один из представителей LASSBio-881, он же N-[(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)метилен]-6-нитро-2H-2,3-бензодиоксан-5-карбогидразид (hCB_1 $EC_{50} = 86.4 \pm 8.5$ nM, hCB_2 $EC_{50} = 80.2 \pm 6.8$ nM)[7]
- Бензимидазолоновые каннабиноиды, один из представителей 3-(циклогексилметил)-N-(1-гидрокси-3,3-диметилбутан-2-ил)-2-оксо-2,3-дигидро-1H-1,3-бензодиазол-1-карбоксаимид ($CB_1 = 2.2$ nM)[8]
- Бензимидазольные каннабиноиды

Наиболее перспективной группой веществ, которые могут попасть на нелегальный рынок наркотиков, являются бензимидазольные каннабиноиды. Этому соответствует ряд причин:

- Это достаточно большая группа веществ, которую можно разделить на следующие подгруппы:
 1. Незамещенные (по бензольному кольцу) бензоимидазолы [9]
 2. 5-сульфонил-бензоимидазолы [10]
 3. 5-карбоксаимид-бензоимидазолы [11]
- По экспериментальным данным многие вещества показывают большое сродство к каннабиноидным рецепторам
- Простой синтез, который можно проводить в кустарных условиях

На сегодняшний день уже известны случаи идентификации некоторых бензоимидазолов в курительных смесях[12].

Все вышеперечисленное делает бензоимидазольные каннабиноиды потенциальными наркотическими веществами, которые в скором времени могут появиться на нелегальном рынке наркотических средств.

Список литературы

- [1] Fernández-Ruiz J., et al // *J. Pharmacol.* 2011. 163, 7. 1365–1378.
 [2] Sánchez A.J., et al // *Clin. Immunol.* 2012. 142, 1. 57–67.
 [3] Clayton, N., et al // *Pain* 2002, 96. 253-260.
 [4] Rinaldi-Carmona, M., et al // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998, 284. 644-650.
 [5] Giblin G., et al // *J. Med. Chem.* 2007, Vol.50 (11). 2597–600
 [6] Diaz, P., et al // *J. Med. Chem.* 2008, Vol.51 (16). 4932–4947.
 [7] Duarte CD., et al // *Bioorganic and Med. Chem.* 2007, 15;15(6). 2421-33
 [8] Ando, K., et al // *WO 2008/032164*
 [9] Wiley, L.J., et al // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015.
 [10] Verbist BM., et al // *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 18 (8): 2574–9.
 [11] Pagé D., et al // *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 18 (13): 3695–3700
 [12] Uchiyama N., et al // *Forensic Toxicology* 2013, 32 (1): 105–115
- New trends in mass spectrometry in forensic pharmacology and toxicology**

New trends in mass spectrometry in forensic pharmacology and toxicology

Thomas Kraemer

Dept. of Forensic Pharmacology and Toxicology
Zurich Institute of Forensic Medicine, University of Zurich

Forensic pharmacology and toxicology encompasses the measurement of alcohol, drugs, medicaments and other substances in biological specimens and interpretation of such results in a medico-legal context. Highly sophisticated mass spectrometric equipment is a prerequisite for successful forensic casework in the modern forensic lab. While confirmation of immunoassay results is easily done by simple hyphenated MS techniques, more sophisticated MS techniques are needed for the very specific problems in forensics: Postmortem samples which can be anything from fresh to severely putrefied can cause surprising matrix effects. Sometimes only alternative matrices are available (hair, nails, oral fluid, respiratory air). In the last years, about 500 new illegal drugs entered the market, for which reference standards are rarely available. Mass spectrometry has been used to encounter all these problems. Postmortem tissue samples are investigated by MALDI-MS imaging (MALDI MSI) techniques using multiple reaction monitoring mode for screening and MS/MS or MS³ for confirmation. Consumption behavior of illegal drugs can be monitored in single hair using MALDI MSI. Intake of drugs or medicaments can be detected even in exhaled air employing the most sensitive LC-MS/MS equipment. High resolution mass spectrometry allows for identification of new drugs. Finally, simultaneous QUAL/QUAN analysis using liquid chromatography high resolution MS and employing new Data Independent Acquisition (DIA) approaches (MS/MS^{ALL} with SWATH Acquisition) will make forensic toxicology fit for future.

Критерии выбора стандартных образцов для анализа наркотических веществ

Матвеев А.В., Гацко Я., Ожел А.
LGC Standards Sp. z o.o., Łomianki, Польша

Существует много различных определений для химических стандартных образцов и аттестованных стандартных образцов, а способ их именования зависит от конкретных стран, регионов и т.д. Хорошим примером может быть номенклатура, которая используется в странах СНГ и применяется в Европейском Союзе. Несмотря на терминологические разногласия, не вызывает никаких сомнений тот факт, что независимо от географического положения, эти материалы выполняют очень важную роль в процессе обеспечения качества химических анализов, а при необходимости получения точных количественных результатов их использование является просто необходимым. Тем не менее, их применение может вызвать кое-какие проблемы и сомнения, связанные с выбором правильного материала.

В отличие от физических измерений, в которых отношение (например, эталон метра или килограмма) является predetermined значением и зависит только от измеряемой величины, при химических анализах следует сделать осознанный выбор. Доступны разные виды стандартных образцов – сравнительные материалы в виде чистых веществ или их растворов, используемых для калибровки измерительного оборудования, а также матричные стандартные образцы, применяемые как при валидации аналитических методов, так и при управлении качеством лабораторных процедур.

Стандартные образцы изготавливаются разными производителями, такими как национальные метрологические институты, другими официальными организациями, как например мировые Фармакопеи, и, конечно, чисто коммерческими компаниями. В зависимости от конкретного производителя и назначения данного материала стандартные образцы различаются по качеству и в некоторых случаях предназначены только для одного конкретного вида анализа. Таким примером могут быть стандартные образцы для фармакопеи. Решение о покупке конкретного материала всегда должно быть принято на основании подробного анализа его сертификата. Такой документ является наилучшим источником информации как о качестве данного материала, так и о его предназначении. Рекомендуется, чтобы лаборатория использовала документированную систему выбора стандартных образцов. Создание такой системы должно быть проведено с осторожностью, поскольку документы, относящиеся к применению и выбору стандартных образцов,

разработанные специализированными организациями неоднократно, включают в себя сомнительные рекомендации.

Задача, стоящая перед лабораториями, анализирующими наркотические или психотропные вещества, особенно трудная, поскольку оборот материалов, предназначенных для анализа таких субстанций, подлежит специфическому регулированию. Весь процесс усложняет дополнительно процедура принятия решений, тем не менее, основным критерием выбора должно быть качество материала.

Методы пробоподготовки при проведении судебно-химической экспертизы и химико-токсикологических исследований физиологически активных веществ.

А.Н.Кирюшин

Центральная химико-токсикологическая лаборатория Первого
Московского государственного медицинского университета имени И.М.
Сеченова, г. Москва

Несмотря на развитие высокоэффективных аналитических приборов для конечного определения аналитов в фармацевтических продуктах и биологических пробах, при пробоподготовке, необходимо экстрагировать, изолировать, концентрировать интересующие аналиты из сложной матрицы. В общем, отбор проб и пробоподготовка занимают более 80% времени от общего анализа, эти стадии очень важны и определяют успех при анализе компонентов в сложной матрице.

Метод, выбранный для пробоподготовки, зависит от общей стратегии анализа. Если концентрация анализируемого соединения высока, а используемый метод анализа имеет высокую чувствительность, то пробоподготовка может быть минимальной. С другой стороны, анализ следовых количеств может требовать сложной процедуры исследования с многократными этапами концентрирования и очистки.

При больших объемах работ, в ходе которых исследуются сотни образцов, большую важность, наряду с такими параметрами как точность и воспроизводимость, имеет производительность метода, а также время, затрачиваемое на его оптимизацию. Если поступившее на исследование вещество определяется в лаборатории не на постоянной основе, а от случая к случаю, то перед анализом необходимо решить возможность адаптации метода, используемого для анализа подобного соединения.

В данном исследовании рассмотрены различные методы пробоподготовки биологических объектов, таких как печень, кровь, плазма крови, моча. Были рассмотрены жидкость-жидкостная экстракция (LLE), твердофазная экстракция (SPE), прямой анализ после обработки (фильтрация, осаждение белка).

Целью исследования был выбор унифицированных методов пробоподготовки, пригодных для извлечения широкого спектра веществ с достаточной степенью извлечения и воспроизводимостью. Полученные экстракты анализировались методами ГХ/МС и ВЭЖХ/МС/МС.

Выход экстракции и воспроизводимость была оценена по веществам с различными химическими свойствами, в их числе: амитиптилин, кофеин, хлорпрамазин, хлорпротиксен, циталопрам, кломипрамин, клозапин,

папаверин, верапамил, дифенгидрамин, доксиламин, десметиклозапин, норверапамил, окскарбазепин, пропранолол, метопролол, карбазепин-10,11-эпоксид, 4-гидроксимидазолам, мидазолам, карведилол, нортриптилин, хинин, барбитураты, опиаты, амфетамины.

Для выполнения работы использовались модельные смеси с добавлением стандартов веществ, искусственная моча Biochemical Diagnostics, Inc., реальные образцы биологических жидкостей и тканей.

ВЭЖХ/МС/МС анализ осуществлялся на масс-спектрометре QTRAP 4500 (AB Sciex) с хроматографом Flexar FX10 (Perkin Elmer). ГХ/МС анализ выполнялся на хроматографе МАЭСТРО-2 с масс-селективным детектором (Интерлаб).

Определение этил глюкуронида методом иммунохроматографии и ВЭЖХ/МС/МС в биологических объектах.

Н.Н. Ерощенко

Кафедра аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва

Доклад посвящен рассмотрению проблемы подтверждения потребления алкоголя путем определения концентрации этил глюкуронида в биологических образцах иммунохроматографическим методом с подтверждением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. В докладе рассмотрена валидация аналитической методики определения этил глюкуронида методом ВЭЖХ/МС/МС в биологических образцах, приводится сравнение точности измерения концентрации методом иммунохроматографии и ВЭЖХ/МС/МС. Рассмотрена проблема определения пороговых уровней концентраций этил глюкуронида при подтверждении потребления алкоголя, а так же изучено применение других метаболитов алкоголя.

Для установления факта употребления алкоголя до недавнего времени проводили главным образом измерение концентрации этанола в крови, моче и его паров в выдыхаемом воздухе. Данный метод дает отрицательные результаты уже спустя сутки, лишь в отдельных случаях чуть больше.

Для решения этой проблемы в течение многих лет проводились различные лабораторные испытания. Были предложены биохимические маркеры (метаболиты) употребления алкоголя: этил глюкуронид и этил сульфат. Эти метаболиты интересны своим длительным периодом распада (по сравнению с исходным соединением), что позволяет обнаруживать их на протяжении длительного промежутка времени (этил глюкуронид обнаруживается в моче вплоть до 80 часов после потребления)[1]. Данный факт позволяет использовать этил глюкуронид в качестве биохимического маркера для подтверждения факта употребления алкоголя, даже если это отрицается обследуемым, и когда сам этанол уже не определяется.

В данном исследовании для приготовления калибровочных образцов и контролей качества были использованы сертифицированные стандарты анализируемых веществ с чистотой более 98%.

Иммунохроматографический метод использовался в качестве предварительного анализа (анализатор для химико-токсикологических исследований ИК 200609). Прибор калибровался по тем же модельным растворам, которые использовались при валидации метода ВЭЖХ/МС/МС. Хроматомасспектрометрический анализ выполнялся на масс-спектрометре

QTRAP 4500 (AB Sciex) с хроматографом Flexar FX10 (Perkin Elmer). Было проанализировано образцы мочи от добровольцев и пациентов наркологической больницы.

На основании данных исследований были получены результаты о точности измерения концентрации этил глюкуронида иммунохроматографическим методом, была исследована специфичность метода. Была разработана и валидирована методика количественного определения этил глюкуронида в биологических образцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии. Коэффициент вариации не превышает 15%, точность измерений находится в пределах $100 \pm 15\%$ во всем диапазоне концентраций.

Был рассмотрен вопрос о выборе пороговых уровней концентраций этил глюкуронида в биологических объектах. Был поднят на обсуждение вопрос о применении других биомаркеров алкоголя: этил сульфат, фосфатидил этанол, этиловый эфир жирных кислот. Рассмотрена возможность их совместного определения для более точного определения факта потребления алкоголя[2-3].

Этил глюкуронид является чувствительным и специфичным метаболитом для определения факта потребления алкоголя. Методика определения этого метаболита имеет большие перспективы по внедрению в клиническую и экспертную практику. Сфера применения теста на этил глюкуронид обширна: тестирование пациентов, проходящих лечение от алкоголизма, или которым запрещено употребление алкоголя во время лечения, детский мониторинг употребления алкоголя, тестирование водителей и пилотов, обследование работников режимных объектов и так далее. Большие перспективы в увеличении точности подтверждения факта потребления алкоголя открывает совместное определение этил глюкуронида, этил сульфата и фосфатидилэтанола. Планируется дальнейшая работа в данном направлении.

Список литературы:

1. Jatlow P. I. et al. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate assays in clinical trials, interpretation, and limitations: results of a dose ranging alcohol challenge study and 2 clinical trials //Alcohol Clin Exp Res. – 2014 – N. 38(7) – P. 2056-65.
2. Skipper G.E. et al. Hays P. A. Phosphatidylethanol: the potential role in further evaluating low positive urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate results// Alcohol Clin Exp Res. – 2013 – N. 37(9) – P. 1582-6.
3. Himes S.K. et al. Clinical sensitivity and specificity of meconium fatty acid ethyl ester, ethyl glucuronide, and ethyl sulfate for detecting maternal drinking during pregnancy//Clin Chem. – 2015 – N. 61(3) – P. 523-32.

**Опыт внедрения методик определения синтетических
психостимуляторов и каннабимиметиков методом газовой
хроматографии с масс-селективным детектированием
В набережночелнинском наркологическом диспансере**

Л.А.Гизетдинова¹, И.Д. Шаймарданов¹, А.А. Мингазов², О.А. Дернова¹

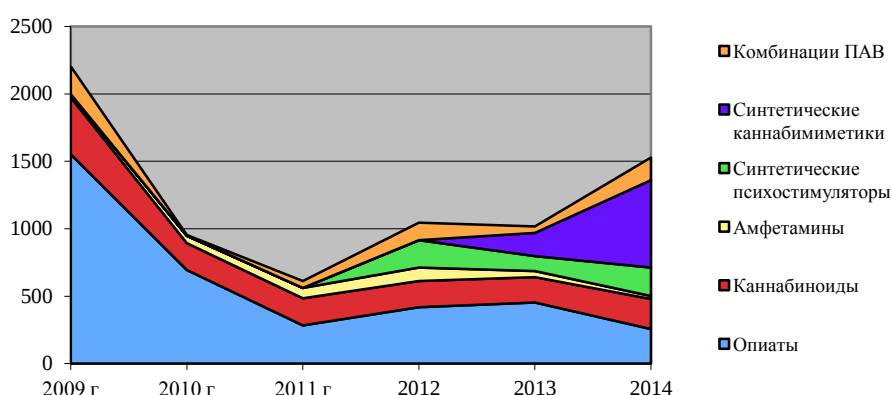
¹ филиал ГАУЗ «РНД» МЗ РТ Набережночелнинский наркологический
диспансер, Набережные Челны,

²Набережночелнинский филиал ГАУЗ «РБСМЭ» МЗ РТ

За последние 6 лет в г.Набережные Челны, произошло резкое изменение наркосцены. Это очень наглядно прослеживается по статистическим данным ХТЛ НЧНД в период за 6 лет. Значительно снизилось потребление классических наркотиков таких, как опиаты – в 2010 г. по сравнению с 2009 г. на 58%, в 2011 году по сравнению с 2010 г. на 55,2% (за 3 года на 81,2%), каннабиноиды (марихуана) – в 2010 г. по сравнению с 2009 г. на 48,5%, в 2011 г. по сравнению с 2010 г. на 14,1% (в целом за 3 года на 55,8%) (диаграмма 1).

Диаграмма 1

Число освидетельствованных, у которых подтверждено наличие психоактивных
веществ



Число освидетельствованных лиц, у которых подтверждено наличие психоактивных веществ, в 2012г. увеличилось на 28,2%, в сравнении с 2011г., в 2014г. увеличилось на 50,2%, в сравнении с 2013г. Это в первую очередь связано с выявлением потребителей синтетических психостимуляторов и каннабимиметиков (диаграмма 1).

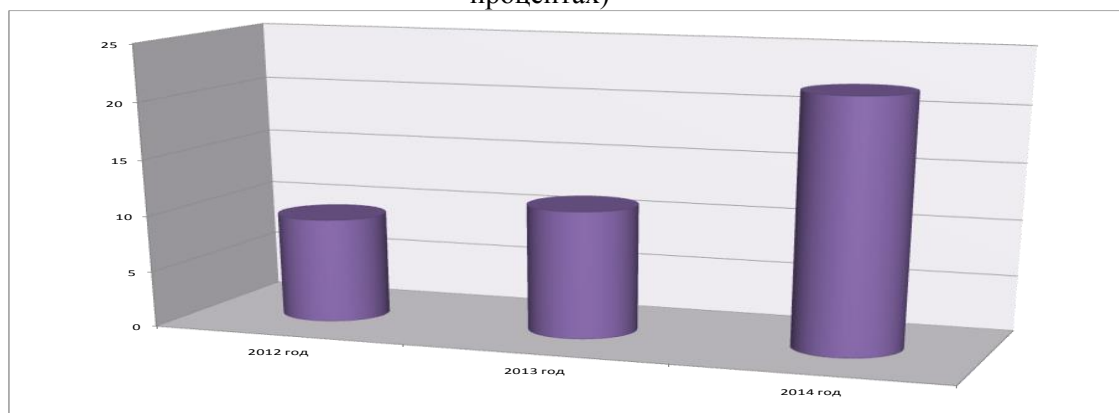
На диаграмме 1 четко прослеживается ситуация, в которой оказалась наша лаборатория к 2011 году (снижение числа освидетельствованных, у которых подтверждено наличие психоактивных веществ в 2,8 раза), что было связано с появлением новых синтетических наркотиков. Для выхода из сложившейся ситуации необходимо было срочное внедрение более точных и современных методов исследования таких как, например, метод газовой хроматографии с масс-селективным детектированием [2].

За период 2011-2013 гг. было введено в эксплуатацию 2 газовых хроматографа с масс-селективным детектором МАЭСТРО МСД. Для проведения химико-токсикологических исследований используются моча и образцы волос[3].

По данным кабинета медицинского освидетельствования, начиная с 2012 года количество положительных результатов выявления на наркотическое опьянение выросло с 9,3%- в 2012г., 11,3%- 2013г. и в 2014г дошло до 22% от всех экспертиз на наркотики (диаграмма 2). Ежегодно выявление потребителей наркотических и психотропных веществ в НЧНД увеличивается в связи с приобретением и установкой нового оборудования и внедрением новых методик для химико-токсикологического исследования.

Диаграмма 2

Количество положительных результатов выявления на наркотическое опьянение (в процентах)



Литература:

1. Антинаркотическая комиссия в Республике Татарстан: Доклад о наркоситуации в Республике Татарстан по результатам мониторинга в 2014 году, г.Казань, 2015г., 211стр. – С. 11 – 22.
2. Савчук С.А., Григорьев А.М. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике // Савчук С.А., Григорьев А.М. – М.: URSS, 2013, 224 с.
3. Гизетдинова Л.А., Мингазов А.А., Нугманова Р.Р., Дернова О.А., Пиляева А.Р., Савчук С.А. Хроматомасс-спектрометрическое определение нового наркотического средства метоксетамина и синтетических каннабимиметиков PB22, PB22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, FUB-PB-22 в биологических жидкостях и образцах волос в Набережночелнинском наркологическом диспансере // Наркология. – 2013. - №3.

Обнаружение наркотических и сильнодействующих веществ с применением трех-квадрупольного масс-анализатора с линейной ионной ловушкой

**Барсегян С.С.¹, Ерощенко Н.Н.², Кирюшин А.Н.² Пушкина В.В.²
Москалева Е.В.²**

1. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва

2. Центральная химико-токсикологическая лаборатория Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, г. Москва.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией находит широкое применение в токсикологическом скрининге [Herrera Lopez S., 2014]. Преимуществами данного метода являются высокая чувствительность, избирательность, высокая скорость проведения исследования. Уровень достоверности идентификации веществ повышается за счет применения в tandemной масс-спектрометрии автоматизированного поиска по спектральным библиотекам.

Представленная методика предназначена для многоцелевого скрининга 2500 лекарственных, наркотических средств и их метаболитов с использованием масс - селективного детектора с линейной ионной ловушкой. В методике реализовано преимущество гибридного прибора, сочетающего квадрупольный масс-анализатор с линейной ионной ловушкой. Для обнаружения целевых веществ и повышения чувствительности применяли селективный sMRM метод, при полном сканировании инов-продуктов на линейной ионной ловушке. Полученные спектры сравнивали с библиотечными с помощью программы LibraryView.

Методику применяли как в качестве подтверждающего исследования в паре с различными вариантами иммунохимических методов, а также при ненаправленном скрининге для идентификации наркотических и лекарственных веществ с их последующим количественным определением. Для большинства веществ по разработанной методике возможна идентификация от 1 нг/мл. Для примера на рисунке №1 представлены фрагменты хроматограммы и спектрограммы образца мочи, содержащей 1 нг/мл папаверина и амитриптилина.

Подготовку образца проводили путем разбавления мочи 0,5 % раствором муравьиной кислоты (1:1). Разделение веществ проводили на хроматографической колонке Phenomenex C18 в режиме градиентного элюирования.

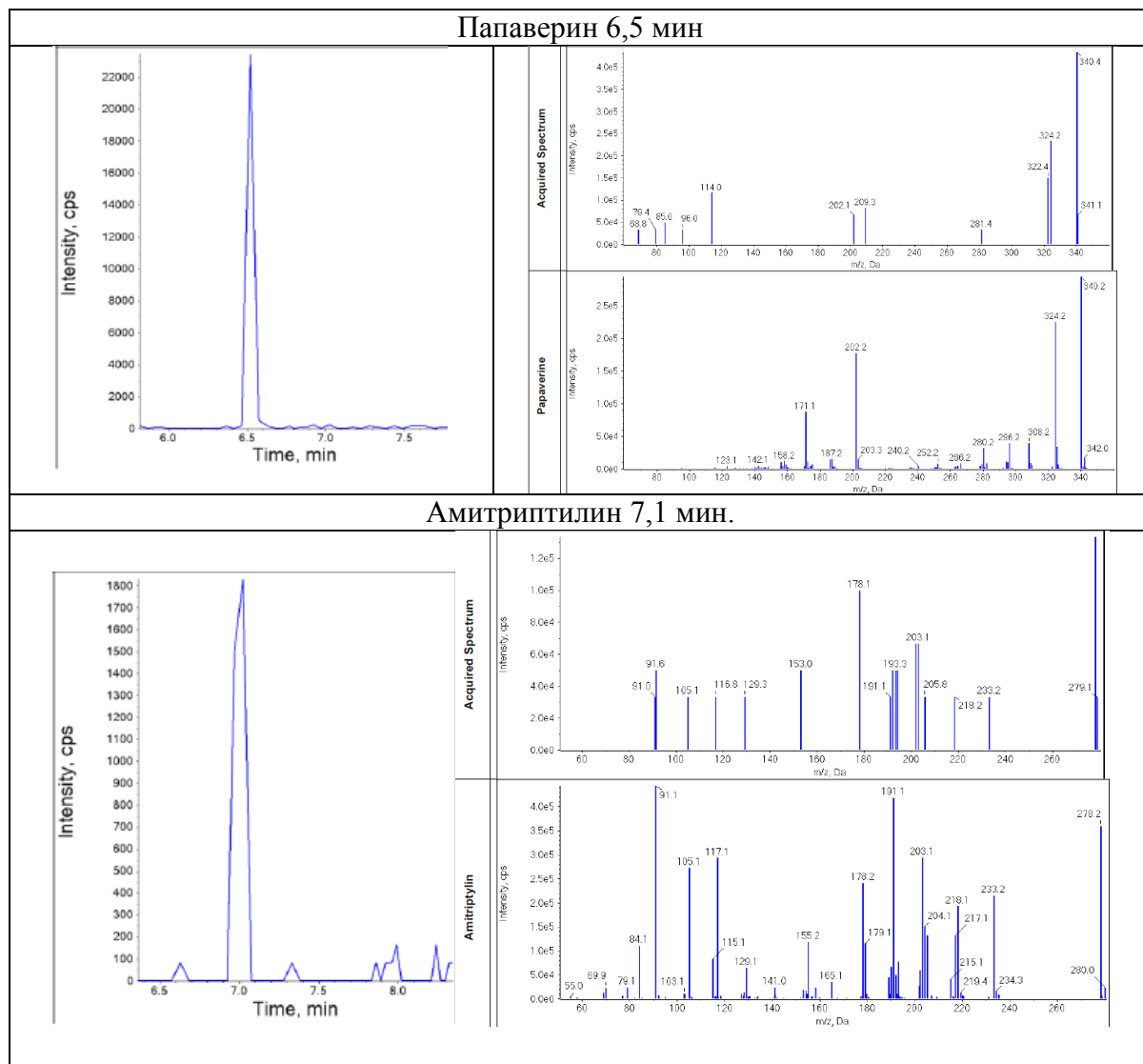


Рисунок №1. Фрагменты хроматограммы и спектрограммы образца мочи, содержащей 1 нг/мл папаверина и амитриптилина.

Масс-детектор работал в информационно-зависимом режиме (sMRM-IDA-2 EPI). Поиск выбранных ионов анализа осуществлялся в определенном интервале времени. Идентификацию веществ осуществляли по полному масс спектру иона предшественника, регистрируемому с помощью линейной ионной ловушки (QTrap).

Использование предложенной методики при скрининге или направленном химико-токсикологическом анализе позволяет в одной хроматограмме надежно идентифицировать и провести количественное определение до 300 соединений.

Масс-спектрометрия высокого разрешения - эффективный метод поиска неизвестных соединений в тяжелой биологической матрице

Колунтаев Д.А

сотрудник отдела исследований и разработок ООО «Интерлаб»

Введение: В настоящее время точность детектируемой массы является весомым аргументом в решении задачи не только установления элементного состава изучаемого соединения, но и достоверности присутствия целевых соединений в биологических объектах, таких как моча, кровь, ткани организма и прочие. Все эти объекты являются сложными органическими матрицами с большим количеством соединений и соэкстрактивных веществ, которые образуют интенсивный матричный фон на протяжении всего хроматографического процесса. Безусловно, качество и чистота спектра зависит и от условий подготовки пробы к исследованию, и от выбора правильного дериватизирующего агента, а также условий хроматографического анализа, но зачастую такого рода проблемы возможно нивелировать при использовании высокоразрешающего времяпролетного масс-спектрометра. На примере представленной работы рассмотрены преимущества таких систем; в частности, эффект снижения фоновой нагрузки на получаемый спектр, процедура формирования «чистых» спектров минорных и мажорных компонентов, а также получения их точных массовых величин.

Методика: В ходе исследования были использованы модельные образцы мочи с внесением в них нескольких целевых соединений наркотических веществ. Мочу экстрагировали смесью растворителей (изопропиловый спирт – этилацетат), после чего экстракт упаривали досуха и концентрировали в 50 мкл метанола. Образцы были проанализированы с помощью системы высокого разрешения (источник ионизации - электронный удар), в режиме сканирования полного ионного тока (диапазон масс m/z 60 - 400 а.е.м.). Для сбора данных использовали два различных режима, которые позволили показать новые возможности регистрирующей системы детектора, а также продемонстрировать высокую селективность системы к сложной матрице. В ходе обработки полученных данных применяли деконволюционные инструменты с последующим анализом и идентификацией фрагментов экстрагированных соединений.

Выводы: Наличие данных в режиме сканирования полного ионного тока (SCAN) открывает возможности для экспертов в поиске не только целевых, но и анализ нецелевых соединений. В частности, представленный подход изучения данных позволяет дать оценку элементного состава

соединений, зафиксированных в матрице, продемонстрировать его достоверное присутствие даже несмотря на наличие интенсивного матричного фона. Процедуры математической обработки данных позволяют выделить все фоновые компоненты для дальнейшего анализа только искомым соединений. В результате, все эти преимущества и алгоритмы доступны благодаря разрешающей способности используемой системы.

Применение жидкостной экстракции на концентрирующих патронах ISOLUTE SLE+ в анализе каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков

Шур Е.А., Лопатина О.Ю.

ГБУЗ «Наркологический диспансер Калининградской области»
г. Калининград

Для высокопроизводительного биологического анализа требуются быстрые, готовые к использованию методики, обеспечивающие надежные результаты. Жидкостная экстракция (ЖЭ) часто используется в биоаналитических исследованиях благодаря экономичности, простоте разработки методик и общей эффективности для МС-анализа.

Применение патронов для жидкостной экстракции на субстрате (ЖЭС) позволяет усовершенствовать методику ЖЭ за счет упрощения методик всех типов образцов и устранения проблем с разделением фаз и образованием эмульсий [1].

При использовании технологии ЖЭС нужно просто поместить пробу в колонку, заполненную инертным носителем (модифицированная диатомитовая земля). Проба, растворенная в воде, распределяется на поверхности частиц носителя в виде тонкой пленки, увеличивая поверхность контакта с экстрагентом, несмешивающимся с водой органическим растворителем (Solid liquid extraction /SLE/). Пропускание растворителя через патрон эффективно извлекает целевой компонент без образования эмульсии.

Такая процедура позволяет:

1. Увеличить производительность и автоматизировать процесс;
2. Увеличить степень извлечения в сравнении с традиционной жидкостной экстракцией;
3. Избежать образования эмульсии [2].

Цель нашей работы – применить единую пробоподготовку на патронах ISOLUTE SLE+ в анализе мочи на синтетические каннабимиметики (AB-CHMINACA, PB-22F) и карбокситетрагидроканнабинол.

При проведении экстракции на патронах для ТФЭ Strata X-C (200мг/3мл) с применением щелочного гидролиза производных индола и индазола к щелочному гидролизату добавляется кислота до pH=5-6 [3].

При экстракции на патронах ISOLUTE SLE+ 11-нор-дельта-9-карбокситетрагидроканнабинола и производных индола pH гидролизата мочи также равен 5.

Для экстракции нами была применена следующая методика:

К 2 мл мочи добавлялось 100 мкл 10N гидроксида натрия и проводился гидролиз при 60 градусах Цельсия в течение 30 минут. После охлаждения

гидролизата до комнатной температуры к нему добавлялось 200мкл ледяной уксусной кислоты, рН гидролизата равен 5-6 [5].

1 мл гидролизованной мочи помещался в патрон ISOLUTE SLE+ до полного впитывания в сорбент. Патрон экспонировался в течение 5 минут. Через 5 минут в патрон помещалось 2 мл дихлорметана. Дихлорметан впитывался в сорбент, экспозиция продолжалась 5 минут часть дихлорметана самотеком элюировалась в приемник.

Через 5 минут в патрон добавлялось 2 мл метилтретбутилового эфира, который самотеком элюировался в приемник [2].

Элюат упаривался досуха и дериватизировался BSTFA+1 % TMCS (бис-триметилсилилтрифторацетамид+триметилхлор-силан).

Условия ГХ-МС анализа

Температурная программа термостата колонок: метод Screen [3].

Анализ проводится в режиме постоянного давления газа-носителя (constant pressure). В качестве газа-носителя используется гелий марки А.

Температура испарителя 270градусов Цельсия, температура аналитического интерфейса 280 градусов Цельсия. Проба вводится в режиме с делением потока (split) 1/10.

Анализ проводится в режиме сканирования по полному ионному току. Задержка растворителя – 3 минуты после ввода пробы.

Вывод:

Применение экстракции на патронах ISOLUTE SLE+ позволяет одновременно обнаруживать триметилсилильные производные синтетических каннабимиметиков (PB-22F , AB-CHMINACA) и 11-нор-дельта-9-карбокситетрагидроканнабинол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Williams , L.,et al, 2010, «Extraction of THC and metabolites from urine using Supported Liquid extraction (SLE) prior to UPLC-MS/Analysis» SOFT 2010, Richmond, VA. P.4
2. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. «Идентификация маркеров каннабимиметиков PB-22 и PP-22F в моче методом ГХ-МС». 2013. 117с.
3. Савчук С.А., Григорьев А.М., Катаев С.С., профессор Изотов Б.Н., Гофенберг М.А., Гизетдинова Л.А., Мингазов А.А., Никитина И.М. «Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в моче». Информационное письмо. 2014. 7-8с.
4. Extraction of delta-9-carboxyTHC from urine and analysis by LC/MS or GC/MS. Improved methods for Forensic Toxicology Analysis (phenomenex). 2008. 10с.

Бессплиттерная двухколоночная гх-мс схема раздельного анализа силилированных и иных проб

А.В. Кинд¹, И.Л. Гринштейн¹, А.М. Григорьев²

¹ООО «Аналит Продактс», Санкт-Петербург

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Бюро
судебно-медицинской экспертизы Московской области», Москва.

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) является одним из широко применяемых методов в скрининговом анализе наркотических средств и их метаболитов. Для повышения чувствительности, получения достоверных и воспроизводимых результатов при анализе полярных и труднолетучих соединений методом ГХ-МС их необходимо подвергать дериватизации [1]. Поскольку большинство веществ, представляющих интерес для токсикологического скрининга, соответствуют этим характеристикам, то стадия дериватизации, как правило, является необходимым элементом пробоподготовки [2]. Способ дериватизации определяется полярными группами, входящими в структуру аналитов. Например, для определения соединений, структуры которых включают гидроксильные и/или карбоксильные группы (в том числе, синтетических каннабимиметиков, основного метаболита тетрагидроканнабинола и опиатов) нередко применяется триметилсилилирование, причем методология его использования обычно связана с введением избытка силилирующих агентов в хроматограф. Силилирование материалов хроматографических путей приводит к частичному силилированию недериватизированных (или дериватизированных иным способом) проб, вводимых в хроматограф впоследствии – эффект, известный как дериватизация «on-line». Дополнительным следствием этого эффекта является некоторая модификация колонки [3]. Как правило, проявления дериватизации «on-line» нежелательны, и хроматографисты стремятся проводить анализ силилированных образцов на отдельном хроматографе или с помощью колонки, специально выделяемой для этих целей. Однако подобный способ решения данных затруднений нельзя назвать оптимальным как из-за высокой стоимости хроматографического оборудования, так из-за трудоемкости смены колонки в ГХ-МС системах.

Предлагаемая нами схема обеспечивает разделение проб с разными видами дериватизации на двух колонках, установленных в одном термостате. Для ее реализации к стандартной комплектации газового хромато-масс-спектрометра дополнительно необходим инжектор, вторая хроматографическая колонка и система позволяющая вводить две колонки параллельно в интерфейс хромато-масс-спектрометра. Важнейшим компонентом схемы является применение феррулы, позволяющей соединять обе колонки с интерфейсом масс-спектрометра при отсутствии

объединенного газового пути, характерного для сплиттеров, и – следовательно – полностью разделять потоки газа из этих колонок. Для автоматизации процесса применяли автодозатор, позволяющий вводить пробы в обе хроматографические линии в рамках одной последовательности анализов. Данная схема была реализована и отработана на хромато-масс-спектрометре японского производства.

Реализация предлагаемой схемы обеспечивает высокую производительность при использовании одного хромато-масс-спектрометра для определения различных дериватов и свободных форм наркотических средств и их метаболитов.

Список литературы

1. Blau K., Halket. J.M. Handbook of Derivatives for Chromatograph. John Wiley & Sons. NY. pp.356
2. Краснова Р.Р., Николаева Э.Г. Дериватизация ГХ-МС анализе лекарственных и наркотических веществ, имеющих токсикологическое значение. -. Владимир: 2002. – 83 с.
3. Мелентьев. А.Б. Скрининг лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором. // Проблемы экспертизы в медицине,- 2002, - №4, - с. 15-21.

Необходимые изменения в нормативно – правовой документации для химико – токсикологических лабораторий

Скребкова К.А.

Государственное бюджетное учреждение «Курганский областной наркологический диспансер», г.Курган

Во всех действующих нормативно – правовых документах, отсутствуют утвержденные специальные знания для специалистов химико – токсикологических лабораторий, а также химических отделений в бюро судебно – медицинской экспертизы. С 4 августа 2013 года начал действовать Приказ Минздрава РФ от 23.04.2013 № 240н «О порядке и сроках прохождения медицинскими работниками и фармацевтическими работниками аттестации для получения квалификационной категории». Порядком установлены требования к теоретическим знаниям и практическим навыкам специалистов. В частности, на основании п. 8 Порядка специалист, претендующий на получение квалификационной категории, должен: иметь теоретическую подготовку и практические навыки в области осуществляемой им профессиональной деятельности. Поэтому, актуально утвердить перечень специальных знаний, по которым должны проводить оценку знаний и умений специалистов Химико – токсикологической лаборатории. Для этого так же требуется утвердить и разработать должностные инструкции для химико – токсикологической лаборатории.

На базе ГБУ «КОНД» разработаны и утверждены должностные инструкции, в которых выделены специальные требования, для врачей КДЛ, химиков – экспертов медицинской организации, фельдшеров – лаборантов:

Таблица 1
Специальные знания специалистов ХТЛ

№	Перечень специальных знаний	Специалист с высшим образованием	Специалист со средним образованием
1	специальная подготовка в сфере деятельности, связанной с оборотом наркотических средств и психотропных веществ;	+	+
2	знать законодательство связанное с деятельностью наркотических, психотропных и сильнодействующих	+	+

	лекарственных веществ;		
3	знать основы газовой хроматографии;	+	+
4	знать и уметь выполнять пробоподготовку на наркотические и психотропные вещества;	+	+
5	Интерпретация химико – токсикологических исследований;	+	
6	Обслуживание газовых хроматографов.	+	

Необходимо утвердить наименование медицинских услуг, включая методы с помощью которых определяют наркотические и психотропные вещества в биологических объектах. Перечень необходимых методов исследования, которые необходимо включить представлены в таблице 2.

Таблица 2

Необходимая номенклатура медицинских услуг

Код услуги	Наименование медицинской услуги
	ХТИ биологического объекта* методом газовой хроматографии с масс селективным детектором;
	ХТИ биологического объекта* методом газовой хроматографии;
	ХТИ биологического объекта* методом жидкостной хроматографии с масс селективным детектором;
	ХТИ биологического объекта* методом жидкостной хроматографии;
	ХТИ биологического объекта* методом тонкослойной хроматографии;
	ХТИ биологического объекта* методом иммунохроматографического анализа;
	Количественное определение психоактивных веществ в биологическом объекте* методом газовой хроматографии с масс селективным детектором;
	Количественное определение психоактивных веществ в биологическом объекте* методом газовой хроматографии;
	Количественное определение психоактивных веществ в биологическом объекте* методом жидкостной хроматографии с масс селективным детектором;
	Количественное определение психоактивных веществ в биологическом объекте* методом жидкостной

	хроматографии;
--	----------------

*Примечание: под биологическим объектом понимается моча, кровь, волосы, ногтевые края; ХТИ – химико – токсикологическое исследование.

Каждую из перечисленных лабораторную услугу, при кодировании дополнять определяемую группу наркотических и психотропных веществ, из номенклатуры клинических лабораторных исследований [1].

Например, ХТИ мочи методом газовой хроматографии с масс селективным детектором на алкалоиды опия, его синтетические производные и аналоги (7.2.1.2)[2].

Список литературы

1. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации №1664н от 27 декабря 2011 г. «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг».
2. Приказ Минздрава РФ от 21.02.2000 № 64 «Об утверждении Номенклатуры клинических лабораторных исследований».

Современные представления
О химико-токсикологическом анализе токсинов ядовитых грибов в
клинической и судебно-медицинской токсикологии

И.К.Журкович, В.Д.Великова, Н.В.Столярова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»
ФГБУН ИТ ФМБА России, г.Санкт-Петербург

Отравления грибами по общему количеству регистрируемых случаев встречаются существенно реже, чем отравления лекарственными или наркотическими средствами, алкоголем и его суррогатами. Тем не менее, проблема диагностики и лечения интоксикаций грибами не теряет своей актуальности в наши дни и является составной частью международной программы ВОЗ «Химическая безопасность».

С 2013 г в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 годы)» в ФГБУН ИТ ФМБА России проводится изучение и систематизация литературных и собственных данных по проблеме диагностики, лечения и судебно-медицинской экспертизы отравлений грибами.

Более 90% смертей при отравлении грибами обусловлено аманитинсодержащими видами [i, ii, iii]. Многолетние наблюдения в разных странах показали, что самые тяжёлые случаи заболеваний вызывают грибы *Amanita phalloides*. Летальность при отравлениях этим видом достигает 10-30% [iv, v, vi, vii, viii, ix, x, xi].

В нашей стране в большинстве случаев отравления грибами не верифицированы. Это обусловлено поздней обращаемостью пациентов, отсутствием технических возможностей и специалистов, знающих морфологию грибов. Сходство клинической картины с рядом инфекционных заболеваний является причиной госпитализации в непрофильные стационары, что приводит к отсроченному лечению и увеличению летальности.

В связи с этим своевременный химико-токсикологический анализ (ХТА) во многом облегчает раннюю диагностику отравлений грибами, помогает оценить опасность грибного токсина и избрать правильную тактику лечения.

При отравлении грибами химико-токсикологический анализ (ХТА) включает две основные стадии: исследование химического состава плодовых тел грибов, которые употреблял пострадавший, и изучение биологических жидкостей больного (плазма крови, моча, рвотные массы) на присутствие специфических токсинов, продуцируемых ядовитыми

грибами. Иногда проведение первой фазы анализа исключается за неимением объектов исследования.

В последние 30 лет в ХТА наибольшее распространение получили инструментальные хроматографические методы анализа, которые обеспечивают наибольшую специфичность определений. Благодаря развитию высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС), появилась возможность дополнительно повысить надежность идентификации определяемых веществ за счет точного измерения их масс и усовершенствовать многие методики определения токсинов грибов.

В частности, в ФГБУН ИТ ФМБА России разработаны специфичные методики определения α -аманитина и β -аманитина, продуцируемых некоторыми грибами рода *Amanita*, в пробах мочи и плазмы крови с пределом обнаружения 1-5 нг/мл методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения. Методики аттестованы в системе Государственного Стандарта (Свидетельства об аттестации №222.0301/01.00258/2013 и №222.0302/01.00258/2013).

Кроме того, для идентификации токсичных олигопептидов в биологических образцах, к числу которых относятся и аманитины, создана специализированная библиотека масс-спектров соединений этого класса, а также опубликованы методические рекомендации по ее использованию (МР ФМБА России 12.08.-14).

По материалам исследования подготовлено к печати пособие «Клиника, диагностика, лечение, судебно-медицинская экспертиза отравлений грибами», предназначенное для подготовки и практической деятельности врачей экстренной и скорой медицинской помощи системы ФМБА России, врачей токсикологов региональных центров по лечению острых отравлений, санитарных врачей центров гигиены и эпидемиологии и судебно-медицинских экспертов.

Структура пособия дает представление о токсинах, продуцируемых грибами, посиндромной характеристике клинической картины грибных отравлений с коротким и длительным латентным периодом, современных методах их лечения. Отдельные главы пособия посвящены вопросам химико-токсикологической диагностики и судебно-медицинской экспертизы отравлений грибами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Allen B., Desai B., Lisenbee N. Amatoxin: A review // ISRN Emergency Medicine. – 2012. – Vol. 2012. – 4 p. – <http://dx.doi.org/10.5402/2012/190869>.

1 Giannini L., Vannacci A., Missanelli A. et. al. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients // Clin. Toxicol. – 2007. – Vol.45. – P. 539-542.

1 Yilmaz I., Kaya E., Sinirlioglu Z.A., et. al. Clinical importance of toxin concentration in Amanita verna mushroom // Toxicon. – 2014. – Vol.87. – P. 68-75.

1 Lima A.D.L., Costa Fortes R., Garbi Novaes M.R.C., Percario S. Poisonous mushrooms: a review of the most common intoxications // Nutrition Hospitalaria. – 2012. – Vol. 27. – P. 402-408.

1 Antoni M. Mushrooms, amatoxins and the liver // Journal of Hepatology. – 2005. – Vol.42 – P.166-169.

1 Broussard C.N., Aggarwal A., Lacey S.R., et al. Mushroom poisoning-from diarrhea to liver transplantation // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 56 – P. 3195-3198.

1 Enjalbert F., Rapior S., Nouguiet-Soule' J., Guillon S., Amouroux N., Cabot C. Treatment of Amatoxin Poisoning: 20-Year Retrospective Analysis // Journal of Toxicology Clinical Toxicology. – 2002. – Vol. 40, N 6. – P. 715-757.

1 Hruby K., Csomos G., Fuhrmann M., Thaler H. Chemotherapy of Amanita phalloides poisoning with intravenous silibinin // Human Toxicology. – 1983. – Vol. 2, N 2. – P. 183-195.

1 Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1 // Altern. Med. Rev. – Vol. 3, N 6. – P. 410-421.

1 Sorodoc L., Lionte C., Sorodoc V., Petris O., Jaba I. Is MARS system enough for A. phalloides-induced liver failure treatment? // Human and Experimental Toxicology. – 2010. – Vol. 29, N10. – P. 823-832.

1 Trojanowska M., Dabski H., Pawłowska T. Ostre i smiertelne zatnicia grzybami // Wiadomosci Lekarskie. – 1980. – Vol. 33, N 5. – P. 355-359.

Идентификация метаболитов нового синтетического соединения mdmb(n)-073

¹А.Л. Печников, ²А.В.Лабутин, ¹Ж.Г.Колесникова, ³А.М. Григорьев

¹ГКУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Ямало-Ненецкого автономного округа», г. Салехард.

²ОГБУЗ «Томский Областной наркологический диспансер», г. Томск.

³ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Московской области», г. Москва.

16 февраля 2015 года вступил в силу Федеральный закон №7, которым в Российское антинаркотическое законодательство введена новая категория «новые потенциально опасные психоактивные вещества». Важнейшим этапом, и основанием для формирования Реестра этих веществ, является химико-токсикологическое исследование с целью поиска метаболитов нового соединения, позволяющее установить причинно-следственную связь между употреблением этого вещества и состоянием освидетельствуемого. В докладе описан практический случай идентификации выделенных из образца мочи метаболитов нового соединения, структурно схожего с актуальными синтетическими каннабимиметиками.

Эксперимент. Идентификацию метаболитов выполняли методами:

- капиллярной высокоэффективной газо-жидкостной хроматографии
- масс-спектрометрии: колонка HP-5MS, моноквадрупольный масс-спектрометр, режим электронной ионизации (EI);
- высокоэффективной обращённо-фазовой хроматографии - тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения: колонка «Zorbax Extend-C18 RRHT», масс-спектрометр тандемный квадруполь-времяпролётный (МСВР), режим электрораспылительной ионизации (ESI).

Метаболиты фазы II деконъюгировали в присутствии HCl и NaOH с последующей жидкостной экстракцией из объединенных гидролизатов, и дериватизацией метилированием, триметилсилилированием и их комбинацией. Для ЖХ-МС\МСВР объединенные гидролизаты пробы вводились в хроматографическую систему с помощью онлайн-ТФЭ при pH=8 без дериватизации.

Результаты. Были получены ГХ-МС, EI спектры нативного соединения, выделенного из вещественных доказательств, и метильных дериватов метаболитов, выделенных из гидролизатов мочи освидетельствуемого. Идентичность спектров нативного соединения и полученного метилового эфира, и анализ фрагментации, позволил предположить, что исследуемое соединение является метиловым эфиром

2-(1-бутил-1Н-индазол-3-карбоксамидо)-3,3-диметилбутановой кислоты, а в моче обнаружен карбоксилированный метаболит (I). В образце мочи так же был идентифицирован второй метаболит, моногидроксилированный по алифатической бутильной цепи (II). Наличие гидроксила в боковой алифатической цепи подтверждалось последовательным метилированием и силилированием (Рис. 1, А).

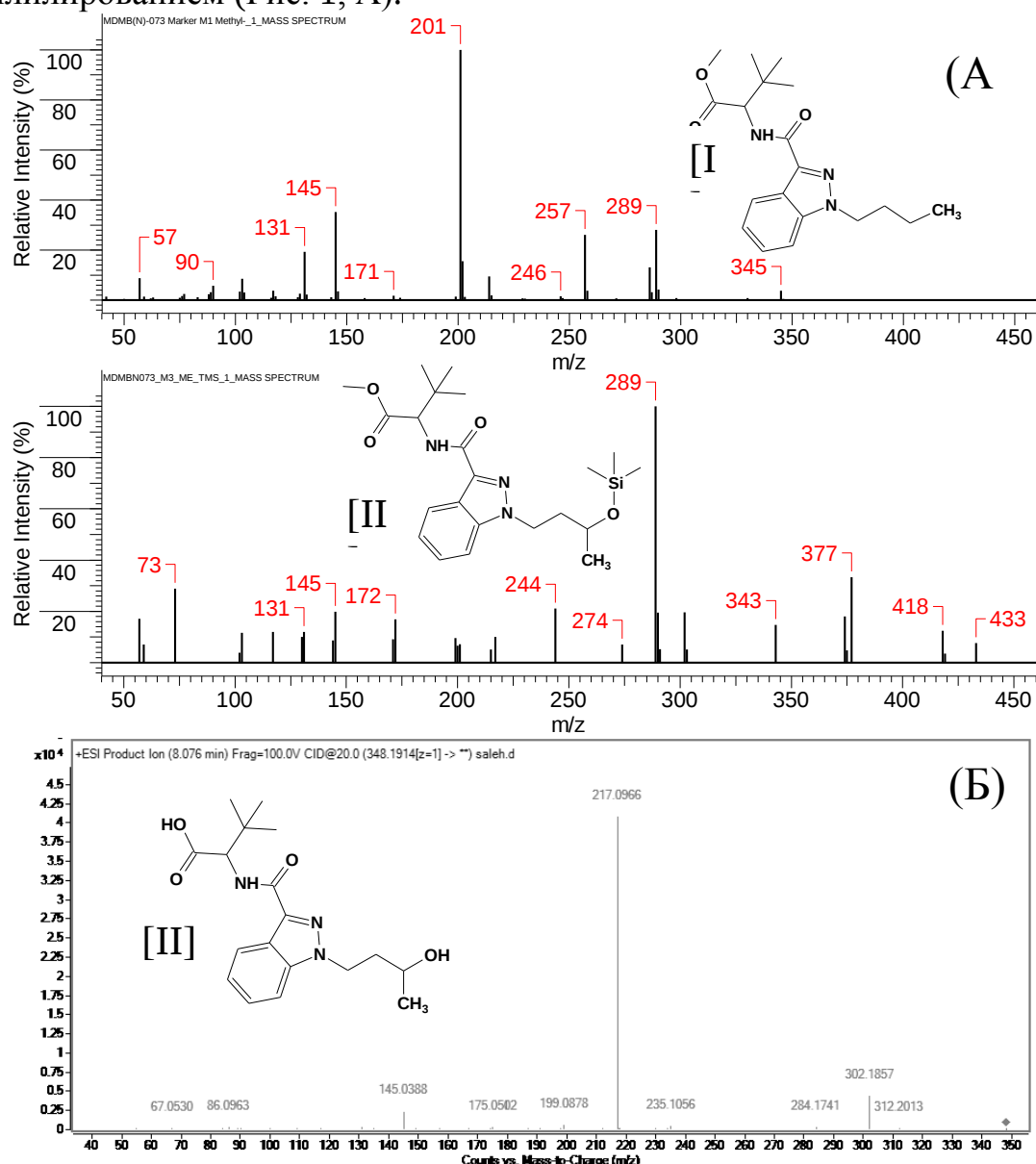


Рис. 1. Масс-спектры метаболитов, выделенных из мочи. ГХ-МС, EI, Methyl-, TMS- (А). ЖХ-МС\МСВР, ESI, (Б). Положение гидроксильной группы – предположительное.

Предложенная структура метаболитов I и II была подтверждена методом жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения (Рис. 1, В).

Определение флониамида в объектах окружающей среды и сельскохозяйственной продукции

А.С. Комарова, Т.Д. Черменская, В.В. Человечкова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин

ООО «Инновационный центр защиты растений», Санкт-Петербург,
Пушкин

Загрязнение пестицидами окружающей среды является негативным последствием деятельности человека. Пестициды и их метаболиты обладают высокой токсичностью, многие из них способны накапливаться в живых организмах. Пестициды относятся к загрязняющим веществам, контроль за которыми обязателен во всех объектах окружающей среды, согласно ФЗ РФ 109 «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами».

Целью данной работы была разработка и апробация методики определения остаточных количеств флониамида в воде, почве, яблоках и яблочном соке.

В аналитической лаборатории ВИЗР была разработана методика определения флониамида в воде, почве, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Работа выполнялась на хроматографе Acquity (Waters). Решены вопросы выбора оптимальной методики пробоподготовки, оптимальных параметров хроматографирования, определены рабочие диапазоны методики, установлены метрологические характеристики количественного анализа.

В разработанной методике установлены следующие пределы обнаружения в воде 0.001 мг/дм³, почве 0.02 мг/кг, яблоках и яблочном соке 0.05 мг/кг.

Эффективность предложенной методики продемонстрирована при анализе динамики разложения флониамида, входящего в состав современного инсектицида Теппеки, ВГ (500 г/л флониамида), применяемого против тли на яблоне с нормой расхода 0.15 кг/га (3-кратная обработка). Действующее вещество обнаружено в день обработки в плодах яблони в количестве от 0.04 до 0.13 мг/кг, в зависимости от региона проведения испытаний. В последующих точках отбора проб содержание флониамида постепенно снижалось и на 28 сутки составило от 0.004 до

0.01 мг/кг. При сборе урожая в плодах яблок и соке флонидамид не обнаружен.

Данная методика утверждена Роспотребнадзором (МУК 4.1.3135-13) и внесена в Федеральный реестр методик измерений (ФР.1.31.2013.16151).

Содержание

Применение методики измерений массовой доли токсичных элементов в биологических образцах атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией и прямым вводом проб в токсикологической экспертизе

Тюрников А.П., Саломатин В.Е 1

Tandem Mass Spectrometry Applications for Local Forensic and Toxicological Investigations in Cape Town, South Africa

Alicia Evans..... 3

Oral fluid as an alternative matrix for drugs of abuse testing

Michael Böttcher 4

Биомониторинг экспозиции человека летучими промышленными токсикантами

Савельева Е.И 7

Идентификация препаратов рекомбинантного химерного ЕРО-Fc белка в антидопинговом контроле методом IEF-PAGE.

П.В. Постников, Г.И. Кротов, Ю.А. Ефимова, Г.М. Родченков 8

Дифференциация поверхностных загрязнений и объемных содержаний психоактивных веществ в волосах и срезах краев ногтевых пластин

Савчук С.А., Скребкова К.А., Никитина Н.М., Тумурова Л.В., Самышкина Н.В., Надеждин А.В., Тетенкова Е.Ю 10

ЖХ-МС(n) глюкуронидированных метаболитов синтетических каннабимиметиков

А.М. Григорьев, О.Л. Заикина, А.Б. Симонов 15

Применение методов газовой и жидкостной масс-спектрометрии в хтл гбуз «наркологический диспансер» министерства здравоохранения Краснодарского края

Д.А.Любченко, Е.В.Светличная 17

Попытка создания унифицированного метода количественного определения ряда лекарственных средств в трупной крови с внутренним стандартом на основе ЖЖЭ и ВЭЖХ-УФ	
П.В.Никитин.....	20
Обнаружение метаболитов нового синтетического каннабимиметика индольной природы MDMB-CHM	
А.Л. Печников, А.Б. Васильев, А.М. Григорьев	22
Применение нового реагента для обнаружения синтетических катинонов в моче	
Е.В. Москалева.....	24
Поисковая ЖХ-МС\МС библиотека для обзорного анализа мочи (синтетические каннабимиметики и иные дизайнерские наркотики)	
О.Л. Заикина, А.М. Григорьев.....	27
Разработка методик идентификации и количественного определения некоторых атипичных нейролептиков в биологических объектах	
И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, А.В. Воронков, М.В. Сварыч, А.С. Рыбасова, Д.Ю. Санжиева.....	29
Идентификация метаболитов новых психоактивных веществ методом жидкостной тандемной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии.	
А.В.Лабутин.....	31
Проблемы немедицинского применения производных гамк в республике северная осетия-алания	
М.Ф. Правдюк.....	34
Определение летучих органических соединений в крови	
Л.В.Тумурова, А.А. Максимов, Т.В.Доржиева.....	36
Интерлаб - разработчик и производитель аналитического оборудования для химико-токсикологических исследований	
Иванов К.В.....	38
Прогнозирование появления новых видов синтетических каннабиноидов на нелегальном рынке наркотических средств	
Веселов В.В.	39
New trends in mass spectrometry in forensic pharmacology and toxicology	
Thomas Kraemer.....	41

Критерии выбора стандартных образцов для анализа наркотических веществ	
Матвеев А.В., Гацко Я., Ожел А.	42
Методы пробоподготовки при проведении судебно-химической экспертизы и химико-токсикологических исследований физиологически активных веществ.	
А.Н.Кирюшин.....	44
Определение этил глюкуронида методом иммунохроматографии и ВЭЖХ/МС/МС в биологических объектах.	
Н.Н. Ерощенко	46
Опыт внедрения методик определения синтетических психостимуляторов и каннабимиметиков методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием в набережночелнинском наркологическом диспансере	
Л.А.Гизетдинова, И.Д. Шаймарданов, А.А. Мингазов, О.А. Дернова.	48
Обнаружение наркотических и сильнодействующих веществ с применением трех-квадрупольного масс-анализатора с линейной ионной ловушкой	
Барсегян С.С, Ерощенко Н.Н., Кирюшин А.Н., Пушкина В.В., Москалева Е.В.	50
Масс-спектрометрия высокого разрешения - эффективный метод поиска неизвестных соединений в тяжелой биологической матрице	
Колунтаев Д.А.....	52
Применение жидкостной экстракции на концентрирующих патронах ISOLUTE SLE+ в анализе каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков	
Шур Е.А., Лопатина О.Ю.	54
Бессплиттерная двухколоночная гх-мс схема раздельного анализа силилированных и иных проб	
А.В. Кинд, И.Л. Гринштейн, А.М. Григорьев.....	56
Необходимые изменения в нормативно – правовой документации для химико – токсикологических лабораторий	
Скребкова К.А.	58
Современные представления о химико-токсикологическом анализе токсинов ядовитых грибов в клинической и судебно-медицинской токсикологии	

И.К.Журкович, В.Д.Великова, Н.В.Столярова	61
Идентификация метаболитов нового синтетического соединения mdmb(n)-073	
А.Л. Печников, А.В.Лабутин, Ж.Г.Колесникова, А.М. Григорьев	64
Определение флониамида в объектах окружающей среды и сельскохозяйственной продукции	
А.С. Комарова, Т.Д. Черменская, В.В. Человечкова	66
