



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
НАУК О ЖИЗНИ

Разработка методик обнаружения психоактивных веществ методами хроматомасс-спектрометрии и их практическое применение

Доцент Лисовская Светлана Борисовна (научный руководитель) студенты 5-ого курса, 15 группы Института Фармации: Петрушина Н.В. Каргин В.С., Башилов А.А., Черашев К.В.

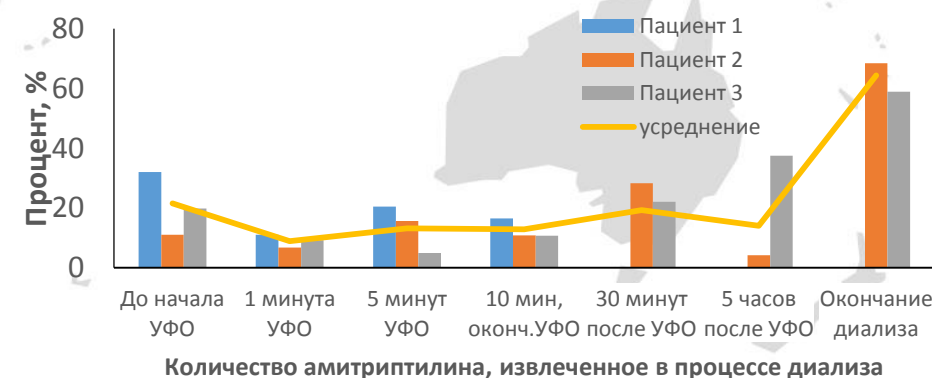
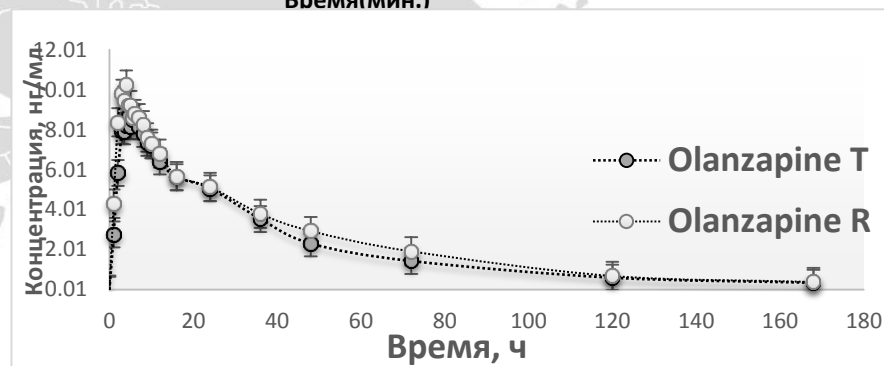
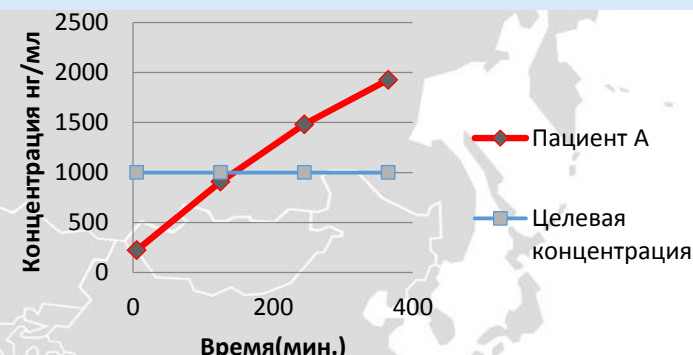
кафедра аналитической и судебно-медицинской токсикологии Института трансляционной медицины и биотехнологии

10 июня 2019, Москва

Результаты применения аналитических методик в медицинской практике

1. **Башилов Антон Антонович** «Разработка и валидация методики количественного определения пропосола методом хроматомасс-спектрометрии в биологических объектах»
2. **Каргин Владимир Сергеевич** «Изучение сравнительной фармакокинетики и биоэквивалентности оланзапина в лекарственных препаратах»
3. **Черашев Константин Владимирович** «Определение содержания амитриптилина в крови больных с острыми отравлениями при воздействии уф-излучения».
4. **Петрушина Надежда Владимировна** «Разработка методики обнаружения природных каннабиноидов (каннабинола, Δ^9 -тетрагидроканнабинола, каннабидиола) методом хроматомасс-спектрометрии в пищевых продуктах и БАДах»

(оборудование: хроматомасс-спектрометры Agilent 7890B/5977A, Маэстро α -МС «Интерлаб», жидкостной хроматограф Shimadzu 1c20ab с tandemным масс-спектрометрическим детектором AB ABSciex 3200 Qtrap)



Содержание природных контролируемых психоактивных веществ в пищевых продуктах, БАДах

- БАДы часто используют для улучшения жизнедеятельности (при стрессах, депрессиях, бессоннице, половых расстройствах, похудении, наращивании мышечной массы и т.д.) Реализация потребителю осуществляется в основном посредством сети Интернет через международные торговые площадки.
- В РФ оборот БАД регламентируется нормативной документацией^{1,2,3}, в соответствии с которой в них **должны отсутствовать** наркотические средства, психотропные, сильнодействующие, в том числе допинговые и ядовитые вещества. Однако многие из них могут содержать психоактивные вещества, такие как: эфедрин, каннабиноиды, опиаты, гармин и гарман, ибogaин и др. подлежащие контролю и запрещенные к обороту в большинстве стран.

¹ Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 6 марта 2007 г. № 8 «Об усилении надзора за производством и оборотом БАД»

² Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов»

³ Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий»



Для красоты и
здоровья
Топ товары со всего мира



Добавки, содержащие пищевые сорта из контролируемых родов растений

Ширина торгового ассортимента БАДов из конопли у различных производителей

Масляный Король
6%

Радогорад
6%

Рось
12%

Живеда
19%

Nutiva
13%

Компас Здоровья
44 %

$$X = \frac{[ТГК] + [КБН]}{[КБД]}$$

$X > 1$ –наркотические сорта

$X < 1$ –ненаркотические сорта

Доли различных видов продукции в ассортименте компании "Живеда"

Пряности
25%

Протеин
8%

Чай
26%

Ягоды и
цукаты
28%

Семена
10%

[ИМЯ
КАТЕГОРИИ
]
[ПРОЦЕНТ]

Модели аналитического оборудования используемые в исследовании

- Анализ методом ГХ-МС проводили на **газовом хромато-масс-спектрометре Маэстро α-МС** компании ООО «Интерлаб». Для разделения была использована хроматографическая капиллярная колонка BP-5MS 30 м x 0,25 мм, фаза - 0,25 мкм.
- Для анализа методом ВЭЖХ-МС-МС использовался жидкостной хроматограф Shimadzu 1c20ab с tandemным масс-спектрометрическим детектором AB Sciex 3200 Qtrap (Canada). Для разделения использовались хроматографические колонки Econova ProntoSIL 120-5-C18 AQ #2362, размер 2,0x75 мм и Phenomenex сорбент Kinetex 2.6 mkm C18 100ang LS column 50*3 mkm.

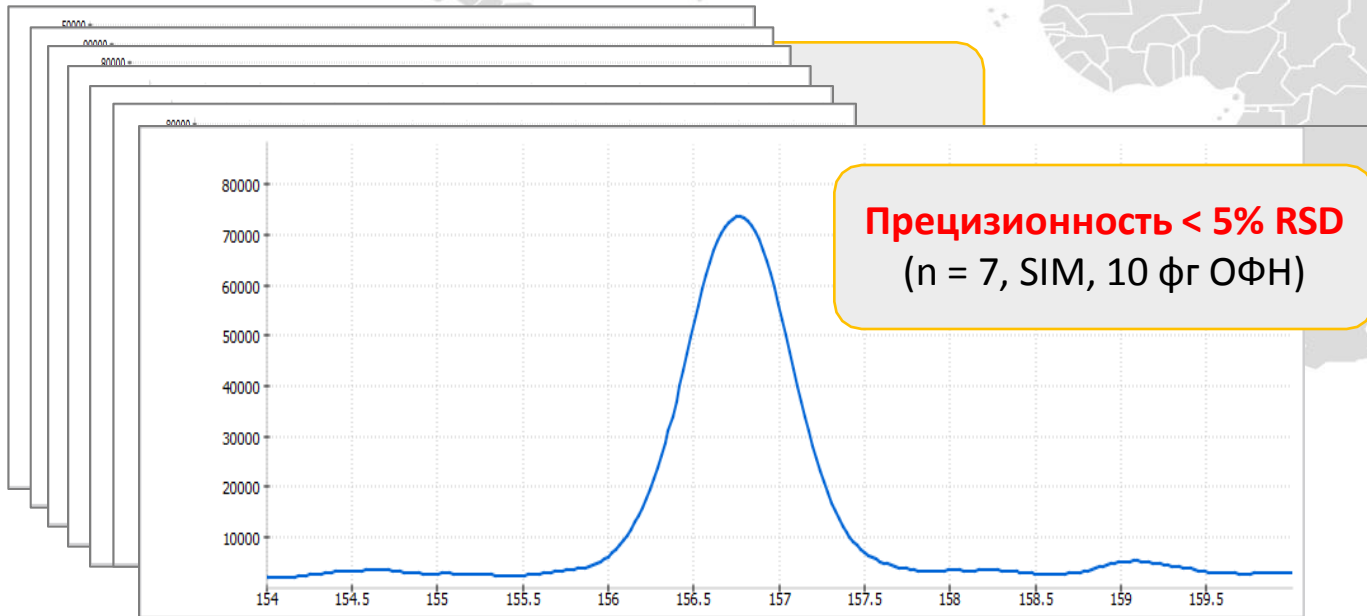


interlab

Выбор аналитического оборудования

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИСТЕМЫ

- ❑ Массовый диапазон: 10 – 1200 а.е.м.
- ❑ Скорость сканирования: свыше 20000 а.е.м. / сек
- ❑ Чувствительность системы: IDL < 10 фг (SIM mode, ОФН@272)



- Инертный керамический ионный источник, устойчивый к загрязнению проб с традиционно сложными матрицами
- Встроенный набор инструментов в помощь оператору для быстрого создания оптимального SIM метода для количественного анализа - SIM- Wizard®, iDwellTime®
- Инновационный расчетный алгоритм количественного анализа данных FlexibleSIM® для минимизации интерферирующих влияний в экстрактах сложных матриц
- Интеллектуальный алгоритм защиты детектора и результатов работы при аварийном отключении электропитания с возможностью автоматического возобновления серии анализов

Фундаментальный принцип при разработке программного обеспечения α-Maestro

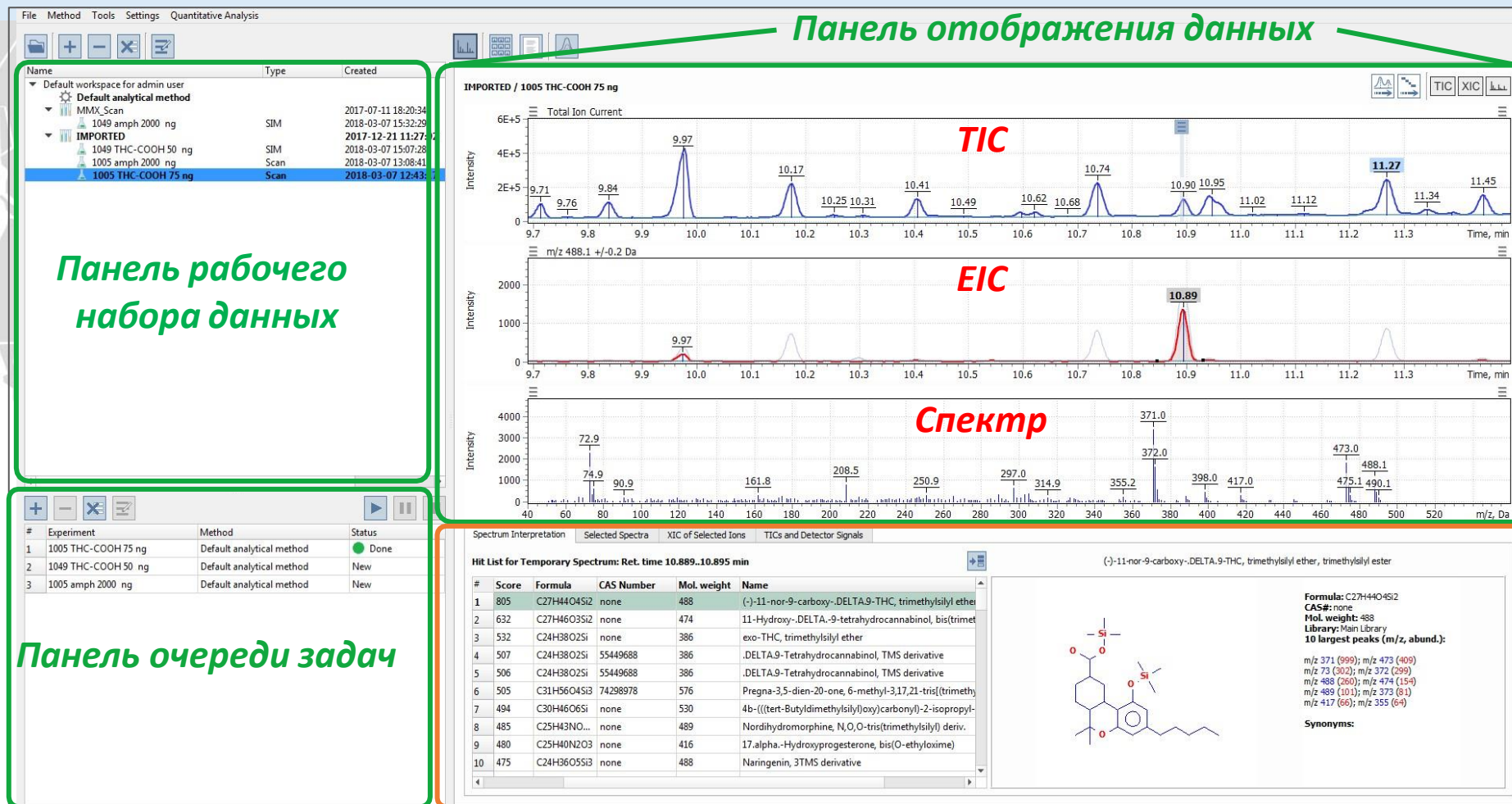
**Простой в
использовании:**

**ПРИНЦИП
«ОДНОГО ОКНА»!**

**Панель рабочего
набора данных**

Панель очереди задач

Панель отображения данных



Панель библиотечного поиска в режиме реального времени:

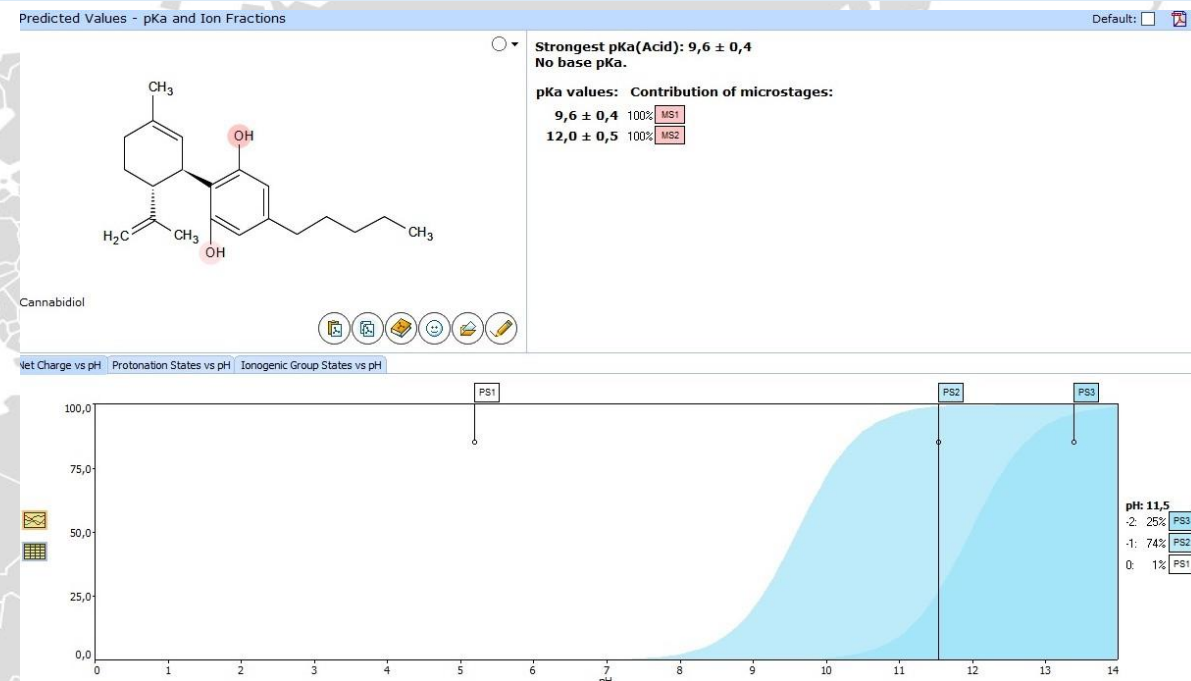
- Моментальный результат сравнения с библиотечным спектром;
- Одновременное использование множества библиотек.



Список результатов поиска по всем библиотекам, с привычной характеристикой сличения «Score»

Методы пробоподготовки используемые в исследовании

- Для получения извлечений из клетчатки использовали наборы для извлечения по технологии QuEChERS - VetexQ Tox компании ИнтерЛаб (дополнение 20 мин выдерживали на УЗ бане при 40°C)
- Для получения извлечений из растительного масла жидкость-жидкостную экстракцию: в пробирку на 10.0 мл вносили 3.0 мл масла, добавляли 1.0 мл гептана и 2.0 мл 1М NaOH, перемешивали в течение 10 мин на шейкере. Центрифугировали 10 мин при 3500 обор/мин. Отбирали нижнюю фракцию, добавляли примерно 1г NaCl, 1.0 мл 1М HCl, а также 2.0 мл смеси изопропанол: дихлорэтан: гептан (1:7:2), перемешивали в течение 10 мин на шейкере, затем в течение 10 мин выдерживали на УЗ бане при 40°C. Центрифугировали 10 мин при 3500 обор/мин. Отбирали верхний органический слой и упаривали досуха в токе сухого воздуха (азота) при нагревании. Затем сухой остаток перерастворяли в 100 мкл этилацетата и анализировали методом ГХ-МС.



Определение значений pKa на примере каннабидиола

Вещество	THC	CBD	CBN
LogP	7.11	6.03	6.35
pKa	9.6 +/- 0.4	9.6 +/- 0.4	9.6 +/- 0.8
LogD	7.25	6.43	6.8

Оптимизация условий аналитического исследования

Условия хроматографирования: начальная температура колонки 60°C, выдержка 1 мин, нагрев со скоростью 60°C/мин до 210°C, выдержка 2 мин, нагрев со скоростью 8°C/мин до 270°C, выдержка 0 мин, нагрев со скоростью 30°C/мин до 300°C, выдержка 1 мин; газ-носитель – гелий, инжектор – splitless, скорость потока газа-носителя 1 мл/мин; температура ионного источника – 250°C. Время включения катодов и анализатора («задержка на растворитель») – через 3.0 мин после ввода пробы, интервал сканируемых масс 50-550 m/z. Режим работы детектора установлен по стандартной программе «Autotune». Детектирование производили путем сравнения масс-спектра исследуемого пика с масс-спектром из библиотек и образцом контроля качества (извлечение из растительного сырья). При анализе использовали программу автоматизированной системы масс-спектральной деконволюции и идентификации (AMDIS) и библиотеки масс-спектров NIST 18 MS Search Program. Для идентификации образцов с относительно низкой концентрацией аналитов был выбран режим регистрации масс-спектров по выбранным ионам (SIM).

Аналитические характеристики веществ в SIM режиме (ГХ/МС)

Искомое в-во	Характерные ионы	Время удерживания
Δ ⁹ -ТНС	299 m/z (главный), 314 m/z и 231 m/z	13.26 мин
Каннабидиол	231 m/z (главный), 246 m/z и 314 m/z	12.40 мин
Каннабинол	296 m/z (главный), 238 m/z и 310 m/z	13.72 мин

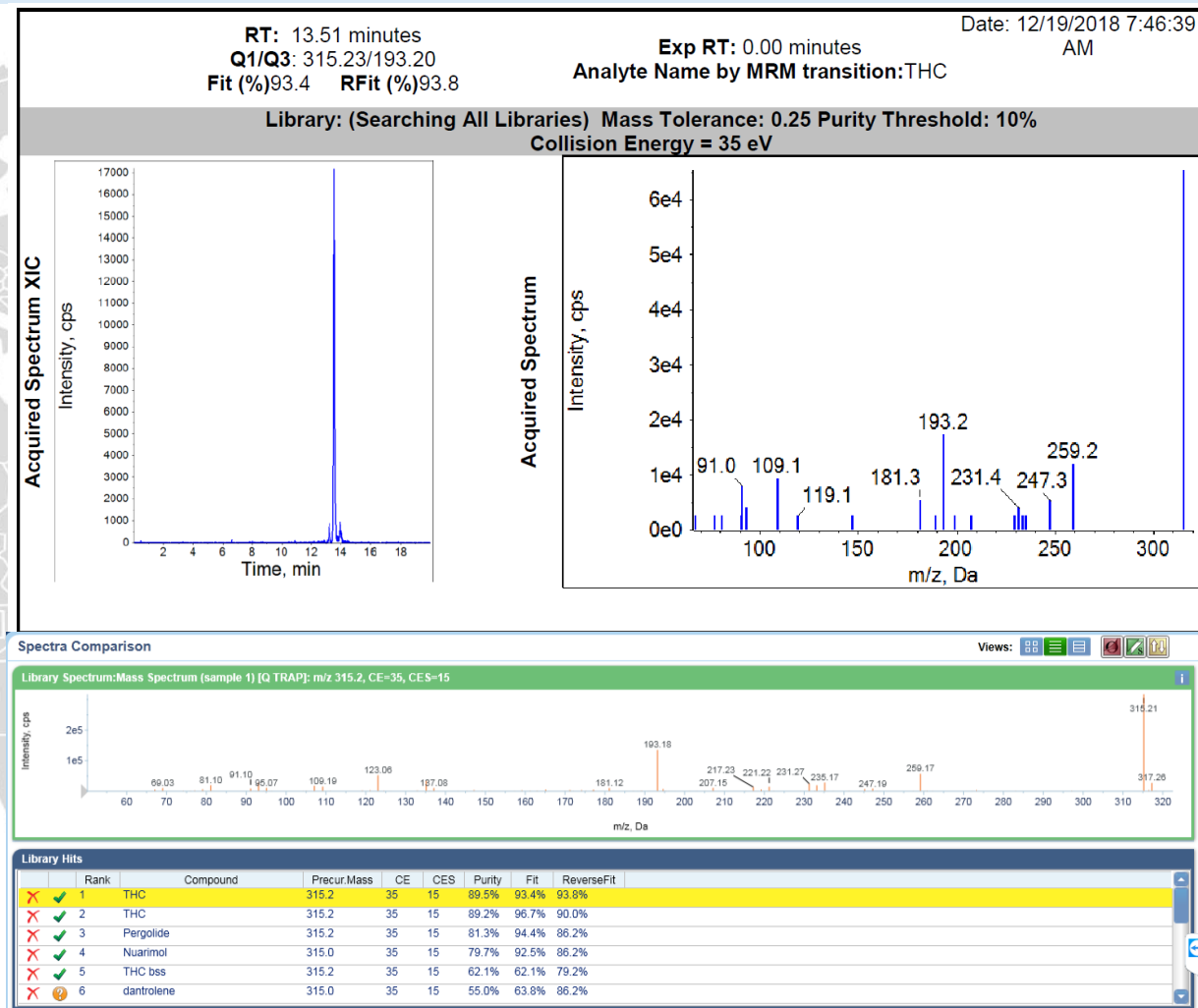


Хроматограмма извлечения из пищевого продукта 100% конопляного масла холодного отжима «Эльфа» производства компании ООО «ВИТАПРОМ».
Режим SIM Δ⁹-ТНС

Оптимизация условий аналитического исследования

При хроматографировании для выделения исследуемого соединения был использован градиентный режим, позволяющий получить пик симметричной формы с пригодным для анализа временем удерживания, который обеспечивался изменением состава элюента на входе в хроматографическую колонку. В качестве элюентов применяли формиат аммония 10 мМоль/л (элюент А) и смесь ацетонитрил: метанол 1:1 (элюент В). Температура термостата 40 °С. По данным предварительного проведенного исследования оптимальным был следующий режим подачи элюента: с 0 по 1 мин концентрация элюента В 15%; с 1 по 10 мин линейное увеличение концентрации элюента В до 100%; с 10 по 20 мин – изократический участок (100% элюента В). по завершении исследования осуществляли промывку хроматографической колонки 15% раствором элюента в течении 5 минут. Условия ионизации: напряжение электроспрея 5000.0 В; скорость потока подвижной фазы 35 мкл/сек; температура азота 300 °С; давление газа завесы и распыляющего потока 30.0 и 45.0 psi соответственно. Объем вводимой пробы 20 мкл.

Время удерживания для Δ^9 -ТГК составило 13.51 мин. Детектирование проводили по величинам M+N и MRM-переходу, используя основной m/z 315,23Да и дочерний m/z 193,20Да ионы для Δ^9 -ТГК и MRM- переход 315,23/193,20.



Спектральная характеристика Δ^9 – тетрагидроканнабинола, обнаруженного в капсулах БАД производителя ООО «Рось»



Результаты исследования

Исследуемый объект		КАННАБИДИОЛ	Δ^9 -ТНС	КАННАБИНОЛ
ГХ-МС	Масло «Эльфа»	+	+	+
	Масло «Живеда»	+	+	+
	Масло «Nativa»	+	+	+
	Конопляная клетчатка	+	+	+
ВЭЖХ-МС/МС	БАД капсулы «Рось» (Россия)	+	+	+
	БАД капсулы «Lindens» (Великобритания)	-	-	-

Для недлительного периода потребления согласно рекомендации производителя (однократно и 7 дней) было отобрано 100% конопляное масло холодного отжима «Эльфа» производства компании ООО «ВИТАПРОМ», а для длительного потребления в течение месяца БАД с содержанием конопляного масла производства компании ООО «РОСЬ» (Россия) и БАД капсулы «Lindens» (Великобритания)

При исследовании биологических объектов (моча), отобранных в начале перед потреблением и в конце периодов потребления методом ИХА были получены отрицательные результаты. Отсутствие в исследуемых объектах 11-нор - Δ^9 - тетрагидроканнабиноловой кислоты было подтверждено методом ВЭЖХ/МС/МС (линейная ионная ловушка)



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

