

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.214.31.074:543.5441.078.33

Морозова В.С., Другова Е.Д., Мягкова М.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ШЕСТИ КЛАССОВ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

Институт физиологически активных веществ РАН, г. Черноголовка Московской обл.

Разработаны иммунохроматографические тест-системы для определения психоактивных веществ (ПАВ) шести классов: опиаты, амфетамины, каннабиноиды, экстази, бензодиазепины, метадон. Впервые созданы простые методики пробоподготовки для быстрого выявления указанных веществ в биологических и небиологических объектах: потожировых выделениях, волосах, моче, смывах с поверхностей, частях растений, неизвестных субстанциях. Представленные методы пробоподготовки и анализа не требуют специального оборудования и реагентов и могут быть использованы в «полевых» или домашних условиях неспециалистами для предварительного скрининга ПАВ.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ; наркотические вещества; психоактивные вещества; моча; потожировые выделения; волосы; смывы с поверхностей; части растений.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(5): 27–31.

Morozova V.S., Drugova E.D., Miagkova M.A.

THE IDENTIFICATION OF SIX CLASSES OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES IN VARIOUS OBJECTS USING TECHNIQUE OF IMMUNE CHROMATOGRAPHY

The institute of physiologically active substances of the Russian academy of sciences, Chernogolovka, Russia

The immune chromatographic test-systems were developed to detect psychoactive substances of six classes: opiates, amphetamines, cannabinoids, ecstasy, benzodiazepines, methadone. for the first time the simple techniques of preparation of samples were developed to fast detect the mentioned substances in such biological and non-biological objects as sweat fatty discharges, hair, urine, surface lavages, parts of plants, unknown substances. The presented techniques of preparation and analysis of samples require no special equipment and reagents. They can be applied in the "field" or domestic conditions by laymen for preliminary screening of psychoactive substances.

Key words: immune chromatographic analysis; drug substances; psychoactive substances; urine; sweat fatty discharges; hair; surface lavages; parts of plants

Citation: *Klinicheskaja Laboratornaia diagnostika. 2015; 60(5): 27–31.*

Наиболее удобным и недорогим скрининговым методом определения наркотических веществ является иммунохроматографический анализ (ИХА). Он прост в использовании и может применяться в «полевых» условиях без оборудования. Метод получил широкое распространение в различных областях: клинической диагностике, самодиагностике, экологическом мониторинге, сельском хозяйстве и др. [11].

Эффективное выявление потребителей наркотиков проводят путем скрининга наркотических веществ в объектах разных видов: биологических и небиологических. Для установления факта приема психоактивных веществ (ПАВ) конкретным человеком и диагностики наркозависимости определяют ПАВ и их метаболиты в моче [2, 3, 9, 14], слюне [2, 4, 5], крови, волосах [2, 13], смывах с кожи (потожировые выделения), экстрактах тканей. В работе подразделений полиции, связанных с борьбой по распространению наркотиков, часто возникает необходимость определения наркотических веществ в неизвестных субстанциях, подозрительных частях растений, на различных поверхностях. Выявление ПАВ в смывах, сделанных на рабочем месте человека (с рабочего стола, клавиатуры и других предметов, с которыми часто соприкасается человек), позволяет установить наркопотребителя без согласия на тестирование и даже без ведома подозреваемого.

Определение наркотических и ПАВ в моче с помо-

щью иммунохроматографических тестов – это наиболее простой метод выявления факта недавнего употребления ПАВ. Ранее нами разработан метод ИХА для определения ПАВ в слюне [9], предназначенный для установления состояния наркотического опьянения. Определение ПАВ в более сложных объектах, требующих пробоподготовки (волосы, ногти, смывы, небиологические объекты), производится только хромато-масс-спектрометрическими методами в химико-токсикологических и экспертно-криминалистических лабораториях [1, 13]. Задача настоящего исследования заключалась в разработке тест-систем ИХА и методик пробоподготовки для быстрого скрининга шести наиболее распространенных классов ПАВ (опиаты, амфетамины, каннабиноиды, экстази, бензодиазепины, метадон) в различных видах биологических и небиологических объектов: потожировых выделениях, волосах, смывах с поверхностей, частях растений, неизвестных субстанциях.

Материалы и методы. Использовали реагенты: белки овальбумин (Ова), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), неорганические соли, органические растворители («Химмед», Россия), этиловый спирт медицинский 95% («Ферейн», Россия), наночастицы коллоидного золота (НКЗ) диаметром от 5 до 60 нм («ЭКОС-Сибирь», Россия), конъюгат овечьих антител к иммуноглобулинам мыши, меченные пероксидазой хрена («Имтек», Россия), антивидовые антитела кролик против мыши (antibodies-online GmbH, Германия), мышинные моноклональные антитела к морфину, амфетамину, Δ⁹-тетрагидроканнабинолу, экстази, диазепаму, метадону (antibodies-online GmbH, Германия).

Для корреспонденции:

Морозова Виталия Сергеевна, vmorozova@gmail.com

Материалы: микропланшеты для ИФА («Nunc», Дания), нитроцеллюлозная мембрана (Whatman, США). Для приготовления спайковых образцов частей растений использовали табак трубочный (Погарская сигаретно-сигарная фабрика, Россия).

Биологические объекты: образцы мочи, смывов с кожи, волос были собраны у 65 пациентов Московского научно-практического центра наркологии Департамента здравоохранения г. Москвы. В качестве контроля использовали биологические образцы 10 здоровых доноров.

Синтез конъюгированных антигенов для изготовления тест-полосок проводили по методикам, описанным в литературе [7, 12].

Разработка ИХА. Выбор оптимальных концентраций конъюгатов Ag-Ова и Ат-Au в ИХА проводили, как описано в [6].

Определение аналитических характеристик разработанных тест-систем. Предел обнаружения (ПО) определяли как концентрацию аналита, при которой процент положительных результатов теста равен или более 95%. Определение специфичности тест-полосок проводили путем анализа растворов веществ, являющихся близкородственными исследуемому веществу, в ФБС (?)

Разработка методик пробоподготовки образцов. В качестве экстрагента использовали этиловый спирт медицинский, в качестве растворяющего буфера – ФБС. Смывы проводили с помощью деревянной палочки с тампоном. Экстракт высушивали в чашке Петри в вытяжном шкафу до полного высыхания.

Приготовление экстрактов волос. Волосы отбирали согласно методике, описанной в [10], мелко измельчали ножницами и экстрагировали этиловым спиртом 12 ч при периодическом встряхивании. Экстракт высушива-

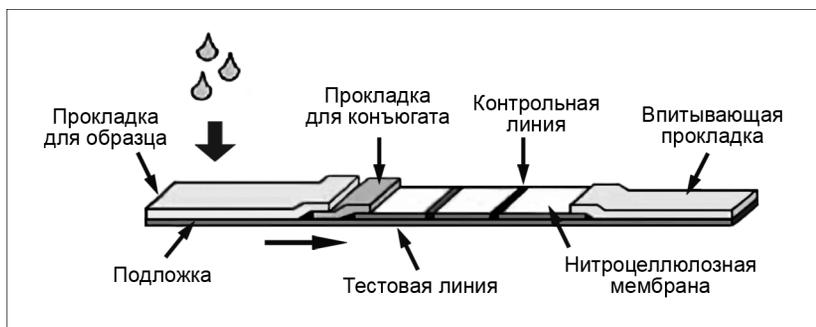


Рис. 1. Устройство разработанных тест-полосок.

ли и растворяли в ФБС. Подобным образом проводили экстракцию измельченных частей растений.

Приготовление смывов с кожи и поверхностей. Смывы с кожи проводили с помощью деревянной палочки с тампоном, смоченным спиртом. Тампоном тщательно протирали поверхности рук и лица (главным образом вокруг рта), периодически смачивая его в спирте. Далее полоскали тампон в спирте, полученный смыв выливали в чашку Петри, высушивали на воздухе и растворяли в ФБС. Подобным образом проводили подготовку смыва с поверхности стола.

Образцы мочи, экстракты волос, частей растений, смывы с кожи и поверхностей также анализировали с помощью подтверждающего метода высокоэффективной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ («Милюхром А-02», Россия). Статистические характеристики разработанных тест-систем рассчитывали способом для методик с качественными результатами [11]: определяли число истинно положительных результатов теста (ИП), число ложноположительных (ЛП), истинно отрицательных (ИО) и ложноотрицательных (ЛО) результатов

Таблица 1

Специфичность иммунохроматографических тест-полосок

Соединение	ПО, нг/мл	Соединение	ПО, нг/мл
Полоска "Морфин"		Полоска "Бензодиазепины"	
Морфин	200	Альпразолам	195
Кодеин	300	Бромазепам	390
Героин	300	Клобазам	390
Этилморфин	6250	Диазепам	200
Гидрокодон	50000	Эстазолам	780
6-Моноацетилморфин	400	Флунитразепам	>10000
Морфин 3-β-D-глюкоконид	1000	Лоразепам	>10000
Оксикодон	>10000	Нитразепам	100
Полоска "Амфетамин"		Полоска "Экстази"	
D-амфетамин	300	Норхлордиазепоксид	3125
D,L-амфетамин	390	Оксазепам	200
L-амфетамин	> 10000	Триазолам	>10000
3,4-Метилendioкси-амфетамин	1560	Полоска "Метадон"	
Полоска "Каннабиноиды"		3,4-Метилendioксиметамфетамин (МДМА)	500
11-Нор-Δ9-ТГК-9 СООН	50	3,4-Метилendioксиамфетамин	3000
Каннабинол	>20000	3,4-Метилendioксиэтиламфетамин	300
11-Нор-Δ8-ТГК-9 СООН	30	D-Амфетамин	5000
Δ8-ТГК	150	Полоска "Метадон"	
Δ9-ТГК	150	Метадон	300
		Доксилламин	> 10000
		6-Моноацетилморфин (6-МAM)	800
		Морфин 3-β-D-глюкоконид	2650

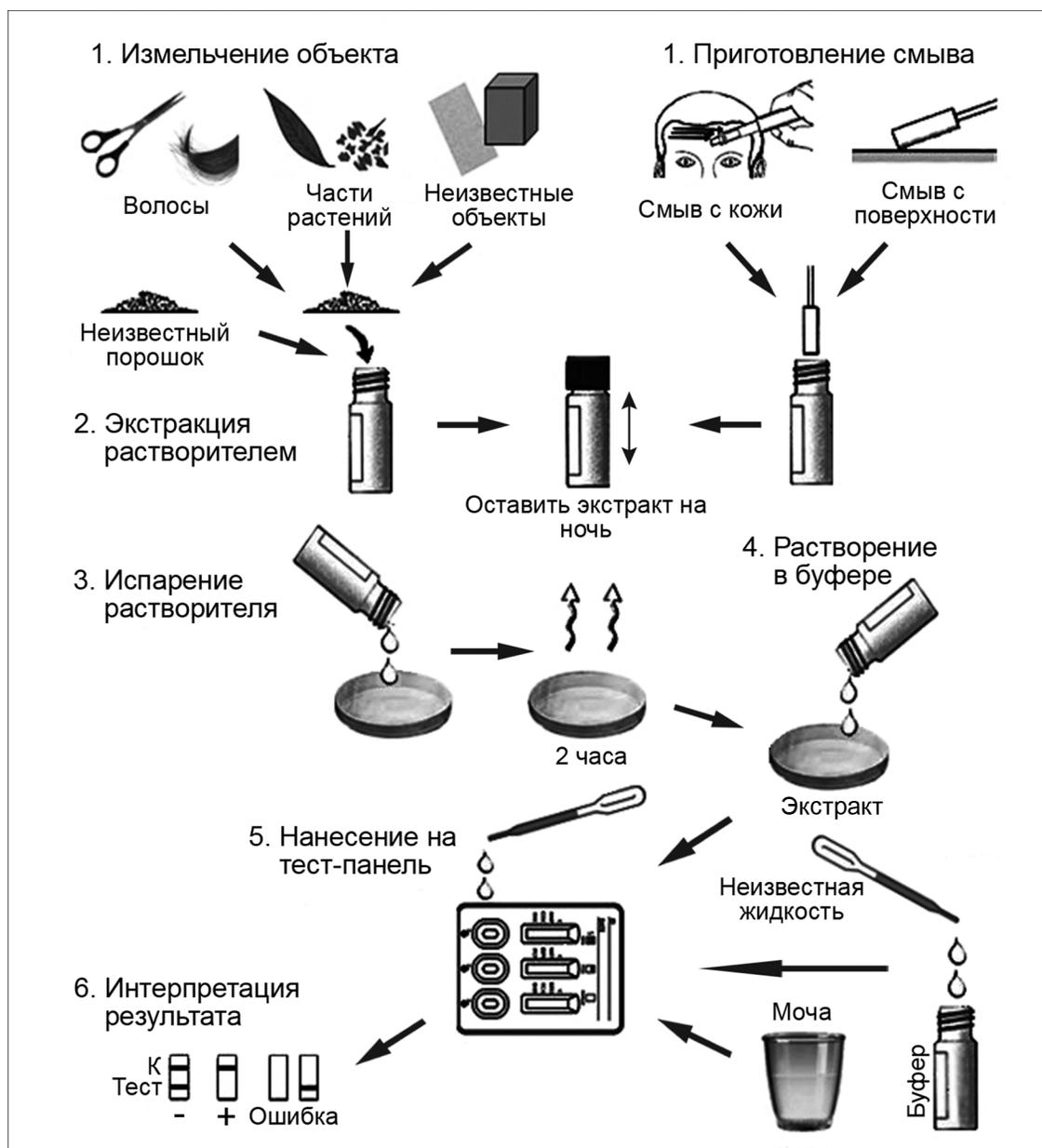


Рис. 2. Схема проведения пробоподготовки и ИХА ПАВ в различных объектах.

теста. Статистическую чувствительность (Ч) теста рассчитывали по формуле:

$$Ч = \frac{ИП}{ИП + ЛО}$$

а статистическую специфичность (С) – по формуле:

$$С = \frac{ИО}{ИО + ЛП}$$

Результаты и обсуждение. При разработке иммунохроматографических тест-систем для выявления низкомолекулярных веществ чаще всего используют непрямую конкурентную схему ИХА (рис. 1). На первой стадии разработки тест-полосок проводили предварительный подбор концентраций иммунореагентов в формате ИФА, используя параметры созданных нами ранее тест-систем ИФА [3, 13]. Затем на нитроцеллюлозной мембране оптимизировали эти концентрации. Для разработанных иммунохроматографических тест-систем

проведено исследование основных аналитических характеристик – чувствительности и специфичности определения наркотических и психотропных соединений. Пределы обнаружения ПАВ, т. е. минимально определяемая концентрация, установленная путем тестирования растворов ПАВ в ФБС, составили 200 нг/мл для морфина, 300 нг/мл для амфетамина, 50 нг/мл для каннабиноидов, 300 нг/мл для метадона, 500 нг/мл для экстази и 200 нг/мл для диазепамов.

Специфичность разработанных тест-полосок определяли путем внесения растворов близкородственных соединений в разных концентрациях в ФБС. В табл. 1 приведены минимальные концентрации веществ, при которых тест-полоска показывает положительный результат.

Процедуры пробоподготовки биологических и небиологических объектов разрабатывали с учетом использования набора реагентов в «полевых» условиях без специального лабораторного оборудования. В работе

Статистические характеристики ИХА ПАВ в моче, экстрактах волос, смывах с кожи

Показатель	Опиаты			Амфетамины			Каннабиноиды		
	Моча	Волосы	Кожа	Моча	Волосы	Кожа	Моча	Волосы	Кожа
Число лиц, употребляющих ПАВ	20			18			12		
Чувствительность, %	100	90	90	100	89	89	100	86	91
Специфичность, %	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Класс ПАВ	Экстази			Метадон			Бензодиазепины		
Число лиц, употребляющих ПАВ	9			9			8		
Чувствительность, %	100	89	95	100	89	89	100	100	94
Специфичность, %	100	100	100	100	100	100	100	100	100

проводили подбор соотношения массы (объема) образцов и объемов растворителя (ФБС) для максимального извлечения ПАВ из образца и успешного определения с помощью тест-полосок. Разработанные методики пробоподготовки представлены на рис. 2.

На первом этапе измельчают объект, если это требуется (волосы, части растений, твердые объекты). Твердый объект «натирают» абразивной бумагой до состояния порошка. Далее помещают (200 мг) во флакон с этанолом (5 мл), встряхивают и оставляют на ночь до полной экстракции.

При исследовании следов наркотических веществ на поверхностях приготавливают смыв, используя палочку с ватным тампоном, смоченным этанолом (5 мл), которым несколько раз протирают поверхность (объект), помещают тампон во флакон с растворителем, перемешивают, повторяют процедуру несколько раз. Затем раствор в чашке Петри высушивают в потоке воздуха или оставляют в вытяжном шкафу до полного высыхания (2–3 ч). Далее к остатку добавляют 0,5 мл ФБС, встряхивают и проводят ИХА. Неизвестные жидкости (5–10 капель) смешивают непосредственно с 0,5 мл ФБС и анализируют.

Характеристики разработанных методик определяли при анализе реальных образцов наркозависимых (моча, волосы, смывы с кожи). Вычисляли статистическую чувствительность и специфичность методик (табл. 2). Указанные характеристики составили значения от 89 до 100%, что доказывает высокую для предварительного метода достоверность определения ПАВ в данных биологических объектах.

Апробацию методик для выявления ПАВ в частях растений и смывах с поверхностей проводили с помощью теста введено-найденно. Сравнение введенной и найденной концентрации показывает, что процент извлечения ПАВ из растений составляет 51–70, а в смывах с поверхностей он равен 44–60. Данные значения приемлемы для целей предварительного скрининга ПАВ в «полевых» условиях. Созданные методики пробоподготовки направлены не на количественное извлечение, а на быстрый скрининг без применения специального оборудования.

Разработанные тест-полоски и методики пробоподготовки легли в основу создания тест-системы, состоящей из набора тест-полосок, запаянных в пластиковый корпус, флакона с растворителем (5 мл), флакона с ФБС (0,5 мл), деревянной палочки с ватным тампоном, чашки Петри, бумаги абразивной.

Заключение. Разработанные наборы реагентов могут использоваться в «полевых» условиях для предварительного анализа на наличие наркотического или психо-

активного вещества в объекте и установление его класса без применения дополнительного оборудования и реактивов. Разработанные тест-системы имеют широкие перспективы применения. Их могут использовать криминалисты, оперативные службы при выявлении наркопотребления в школах, колледжах, училищах, вузах, в наркологических лечебных учреждениях. Кроме того, их можно использовать в автохозяйствах при предрейсовых осмотрах водителей транспортных средств, при массовых обследованиях контингента лиц повышенного риска (заключенные в местах отбывания наказания, подростки, стоящие на учете в милиции и др.), для самоконтроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брюн Е.А., Мягкова М.А., Морозова В.С., Морозов С.В. Сравнительный опыт определения наркотических веществ в России и за рубежом. *Вопросы наркологии*. 2011; 1: 7–14.
2. Горбачева Н.С., Морозова В.С., Мягкова М.А. Сравнительное иммунохроматографическое определение наркотических веществ в жидкости ротовой полости, моче и волосах человека. *Вопросы наркологии*. 2013; 5: 94–9.
3. Демерчян Ш.А., Петроченко С.Н., Смирнов А.В., Абраменко Т.В., Мягкова М.А. Твердофазный иммуноферментный метод определения амфетаминов в моче. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; 12: 20–33.
4. Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Анохин Л.А., Петроченко С.Н., Смирнов А.В., Морозова В.С., Брюн Е.А. Сравнительный анализ выявления амфетаминов методом ИФА и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2010; 2: 42–4.
5. Киселева Р.Ю., Мягкова М.А., Шакир И.В., Брюн Е.А., Морозова В.С. Разработка иммуноферментного анализа амфетаминов в биологических жидкостях человека. *Биотехнология*. 2010; 4: 89–93.
6. Любавина И.А., Зинченко А.А., Лапенков М.И., Николаева Т.Л. Экспресс-метод выявления морфина в водных образцах с помощью иммунохроматографии с использованием моноклональных антител, меченных коллоидным золотом. *Биоорганическая химия*. 2005; 31(1): 108–12.
7. Мягкова М.А., Лушникова М.В., Полевая О.Ю. Иммунохимические свойства естественных и индуцированных антител человека к морфину. *Вопросы наркологии*. 1989; 4: 7–11.
8. Мягкова М.А., Морозова В.С. Способ определения наркотических средств в ротовой жидкости человека методом иммунохроматографии. Патент на изобретение RU 2442988. 2010.
9. Солдухина Н.М., Абраменко Т.В., Пушкина В.В., Морозова В.С., Мягкова М.А., Грицкова И.А. Экспресс-метод для определения опиатов в биологических жидкостях человека. *Микроэлементы в медицине*. 2010; 11(3–4): 71–4.
10. Приказ Минздрава России от 27 января 2006 г. № 40 «Об организации проведения химико-токсикологических исследований».

дований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ». Available at: <http://docs.pravo.ru/document/view/13349/17359/>

11. He J., Parker S. Chapter 2.7 Qualitative Immunoassay – Features and Design. In: *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Wild D., ed. *Elsevier Science*. 2013. 139–47.
 12. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques. Third Edition*. USA: Academic Press, 2013.
 13. Imbert L., Dulaurent S., Mercerolle M., Morichon J., Lachâtre G., Gaulier J.-M. Development and validation of a single LC–MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic Science International*. 2014; 234: 132–8.
 14. Otero-Fernández M., Cocho J.Á., Taberner M.J., Bermejo A.M., Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Anal. Chim. Acta*. 2013; 784(19): 25–32.
-
- REFERENCES
1. Bryun E.A., Myagkova M.A., Morozova V.S., Morozov S.V. Comparative experience of drugs of abuse detection in Russia and other countries. *Voprosy Narkologii*. 2011; 1: 7–14. (in Russian)
 2. Gorbacheva N.S., Morozova V.S., Myagkova M.A. The comparative detection of the narcotic drugs by immunochromatographic assay in human oral fluid, urine and hair. *Voprosy Narkologii*. 2013; 5: 94–9. (in Russian)
 3. Demerchyan S.A., Petrochenko S.N., Smirnov A.V., Abramenko T.V., Myagkova M.A. Enzyme kinked immunosorbent assay of amphetamines in urine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2007; 12: 20–33. (in Russian)
 4. Kiseleva R.Yu., Myagkova M.A., Anokhin L.A., Petrochenko S.N., Smirnov A.V., Morozova V.S. et al. Comparative analysis of amphetamines determination by ELISA and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Sudebno-meditsinskaya Ekspertiza*. 2010; 2: 42–4. (in Russian)
 5. Kiseleva R.Yu., Myagkova M.A., Shakir I.V., Bryun E.A., Morozova V.S. Development of Enzyme Immunoassay of Amphetamines in Human Biological Fluids. *Biotekhnologiya*. 2010; 4: 89–93.
 6. Lyubavina I.A., Zinchenko A.A., Lapenkov M.I., Nikolaeva T.L. Method of express morphine detection in water samples by means of immunochromatography with the use of monoclonal antibodies labeled by colloidal gold. *Bioorganicheskaya Himiya*. 2005; 31(1): 108–12. (in Russian)
 7. Myagkova M.A., Lushnikova M.V., Polevaya O.Yu. Immunochemical properties of natural and induced human antibodies to morphine. *Voprosy Narkologii*. 1989; 4: 7–11. (in Russian)
 8. Myagkova M.A., Morozova V.S. *Method of narcotic substances determination in human oral fluid using the immunochromatography. Patent RF N 2442988*, 2010. (in Russian)
 9. Solodukhina N.M., Abramenko T.V., Pushkina V.V., Morozova V.S., Myagkova M.A., Gritskova I.A. Express method for opiates detection in human biological fluids. *Mikroelementy v Meditsine*. 2010; 11(3–4): 71–4. (in Russian)
 10. *Order of the Health Ministry from 27.01.2006 N 40 «On the organization of the chemical-toxicological studies with analytical diagnosis of the presence in the body of alcohol, narcotics, psychotropic and other toxic substances»*. Available at: <http://docs.pravo.ru/document/view/13349/17359/> (in Russian)
 11. He J., Parker S. Chapter 2.7 Qualitative Immunoassay – Features and Design. In: *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Wild D., ed. *Elsevier Science*. 2013. 139–47.
 12. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques. Third Edition*. USA: Academic Press, 2013.
 13. Imbert L., Dulaurent S., Mercerolle M., Morichon J., Lachâtre G., Gaulier J.-M. Development and validation of a single LC–MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic Science International*. 2014; 234: 132–8.
 14. Otero-Fernández M., Cocho J.Á., Taberner M.J., Bermejo A.M., Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Anal. Chim. Acta*. 2013; 784(19): 25–32.

Поступила 02.02.15

Received 02.02.15

Вниманию авторов!

Начинается подписка на журнал
«Клиническая лабораторная диагностика»
на II полугодие 2015 г.
Индекс журнала – 71442
в Каталоге Агентства «Роспечать».