

ПРОБЛЕМЫ ЭКСПЕРТИЗЫ В МЕДИЦИНЕ

Редакционная коллегия:

главный редактор — В.И. Витер

заместители главного редактора —

Н.А. Кирьянов, В.Л. Прошутин

члены редакционной коллегии —

А.Ю. Вавилов, В.В. Кунгурова, И.А. Лебянкина,
С.В. Хасанянова

Редакционный совет:

В.И. Акопов (Ростов-на-Дону),

В.И. Алисиевич (Москва), А.П. Ардашкин (Самара),

В.В. Жаров (Москва), В.Н. Звягин (Москва),

О.М. Зороастров (Тюмень), В.В. Колкутин (Москва),

А.Е. Мальцев (Киров), Ю.А. Молин (Санкт-Петербург),

В.П. Новоселов (Новосибирск), Г.А. Пащинян (Москва),

Ю.И. Пиголкин (Москва), В.О. Плаксин (Москва),

П.О. Ромодановский (Москва), Н.С. Стрелков (Ижевск),

Е.С. Тучик (Москва), В.В. Хохлов (Смоленск),

В.Э. Янковский (Барнаул)

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
ОСНОВАН В ИЮЛЕ 2000 ГОДА

№ 1 [29]

ТОМ 8 ЯНВАРЬ-МАРТ 2008 г.

Журнал зарегистрирован

Министерством печати и информации РФ.

Свидетельство о регистрации

ПИ № 77-3999 от 17.07.2000 г.

Подписка по каталогу Роспечати (стр. 377).

Подписной индекс: 82199

Адрес редакции: 426009, г. Ижевск, ул. Ленина 87^а

Телефон: 8 (3412) 75-24-93

e-sudmed.narod.ru

E-mail: expertiza@e-mail.ru

Сдано в набор: 21.04.2007.

Подписано в печать: 18.05.2007.

Формат 60×88 1/8.

Условных печатных листов 6,23

Учетно-издательских листов 7,08

Отпечатано: Типография "Пешта",

г. Ижевск, ул. Кирова, 113

Верстка А.Д. Рамишвили

**Материалы публикуются после представления
положительной рецензии**

© Общество судебных медиков Удмуртии, 2008

© ГОУ ВПО "ИГМА", 2008

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть преобразована в электронный вид, либо воспроизведена любым способом без предварительного согласия с издателем.

А.Б. Мелентьев

ОБРАЗОВАНИЕ АРТЕФАКТОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПРОБ И В ПРОЦЕССЕ АНАЛИЗА ПРИ СКРИНИНГЕ МОЧИ МЕТОДОМ ГХ/МС

Бюро судебно-медицинской экспертизы (нач. — к.м.н. Е.Ф. Швед) Челябинской области

Рассмотрены процессы изменения структуры некоторых наркотических и психотропных веществ и их метаболитов в процессе подготовки биологических проб к ГХ анализу, а также термической деструкции анализируемых веществ в процессе анализа. В результате этих изменений на хроматограммах появляются пики артефактов, которые могут приводить, как к ложноотрицательным, так и к ложноположительным результатам. Рекомендовано использовать специализированные библиотеки для различных методик ГХ скрининга, учитывающие рассмотренные процессы.

Ключевые слова: наркотические, лекарственные вещества, токсикологический анализ.

FORMATION OF ARTEFACTS BY PREPARATION OF TESTS AND DURING THE ANALYSIS AT SCREENING WET

A.B. Melentyev

In to work are stated processes of change of structure of some narcotic and psycho-tropic substances and them metabolitis during preparation of biological tests to the analysis, and also thermal деструкции analyzed substances during the analysis. As a result of these changes on analysis there are peaks of artefacts. It is recommended to use the specialized libraries for various techniques GX of the screening, the taking into account considered processes.

Key words: narcotic, medicinal substances, the toxicological analysis.

Для надежного обнаружения факта приема какого-либо наркотического или сильнодействующего лекарственного вещества по анализу мочи необходимо, прежде всего, учитывать основные метаболические реакции этого вещества в организме человека. Важно знать, в виде каких метаболитов это вещество преимущественно выводится из организма с мочой, а также что происходит с этими метаболитами и нативными веществами в процессе подготовки мочи для анализа. Большой объём данных по метаболизму наркотических и лекарственных веществ приведен в монографиях [3,4]. Однако, в них отсутствуют данные по метаболизму лекарственных веществ, которые распространены только в России. Превращения, происходящие с лекарственными веществами и их метаболитами в процессе пробоподготовки, зависят от методики подготовки проб к ГХ анализу. В данной работе описаны основные реакции, приводящие к изменению структуры анализируемых соединений (нативных и их метаболитов) в процессе подготовки проб мочи к ГХ анализу по методике, используемой в нашем бюро, а также образование артефактов в процессе самого ГХ анализа. Как описано ранее [1], методика пробоподготовки мочи к ГХ анализу включает стадии кислотного гидролиза и дериватизации для получения ацелированных производных. Эти стадии необходимы для разрушения конъюгатов анализируемых соединений с глюкуроновой кислотой и получения летучих эфиров полярных соединений. В процессе гидролиза и ацелирования могут происходить и побочные реакции, которые иногда полностью меняют структуру анализируемых соединений и, соответственно, газохроматографические и масс-спектральные свойства анализируемого вещества. Эти побочные реакции необходимо учитывать при поиске пиков потенциальных токсикантов, а масс-спектры и газохроматографические параметры артефактов необходимо включать в используемые библиотеки масс-спектров и хроматографические базы данных.

Материалы и методы исследования

Все наблюдаемые нами процессы изменения структур анализируемых соединений происходят при использовании приведенных ниже параметров подготовки проб и ГХ анализа.

Методика подготовки мочи для ГХ анализа: к 1 мл мочи добавляли 50 мкл спиртового раствора этилморфина г/х

с концентрацией 0,02 мг/мл и 0,2 мл концентрированного раствора соляной кислоты, флакон герметично закрывали и нагревали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли 0,2 мл 30% раствора гидроксида натрия и 100 мг бикарбоната натрия. Проверяли pH раствора по индикаторной бумаге «ФАН» (pH=8,4-8,8) и экстрагировали 5 мл смеси хлороформ — н-бутанол (9:1). Смесь встряхивали 10 мин и центрифугировали 5 мин. при 3000 об/мин. Органический экстракт пропускали через слой безводного сульфата натрия (0,5 г) и испаряли в потоке воздуха до объема 0,5-1 мл, переносили экстракт в виалу и испаряли в потоке воздуха досуха при температуре не выше 50°C. К сухому остатку добавляли 50 мкл смеси уксусного ангидрида с безводным пиридином (3:2), смесь нагревали при 80°C 20 мин в закрытой виале. Избыток реактивов удаляли в потоке воздуха при 40-50°C. Перед анализом пробу реконструировали в 100-400 мкл бутилацетата (в зависимости от используемого масс-спектрометра).

ГХ/МС анализ экстракта: анализ проб проводили на хроматографах HP 5890 с масс-селективным детектором 5972 и Agilent Technologies 6890N с автосамплером 7683B и масс-селективным детектором 5975B. ГХ колонкой HP-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с толщиной пленки 5% фенил-метилсилоконовой фазы 0,25 мкм. Параметры работы ГХ и масс-селективного детектора в обоих случаях были одинаковы: начальная температура колонки 80°C, выдержка 1,0 мин, увеличение температуры со скоростью 40°C/мин до 200°C и дальнейший подъем температуры со скоростью 12,5 град/мин до 300°C выдержкой при конечной температуре 6 минут. Режим постоянного потока «Constant flow» — 1,4 мл/мин. Начальное давление на колонке 17,0 psi. Температура инжектора 250°C, устройства сопряжения с детектором 280°C. Ввод пробы без разделения потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:20 (Split/Splitless). Вводимый объем пробы 1-2 мкл. Ионизация электронным ударом 70 эВ. Режим сканирования ионов от 50 до 550 а.е.м. Регистрация ионного тока через 4 мин после ввода пробы.

Автоматическую обработку хроматограмм производили с помощью программы AMDIS (Автоматическая система масс спектральной деконволюции и идентификации), встроенной в программу ChemStation. Иденти-

фикацию проводили с помощью собственных библиотек масс-спектров и с использованием индексов удерживания по н-алканам.

Обсуждение результатов исследования

Первым этапом пробоподготовки, на котором происходят химические изменения с анализируемыми веществами, содержащимися в моче, является кислотный гидролиз.

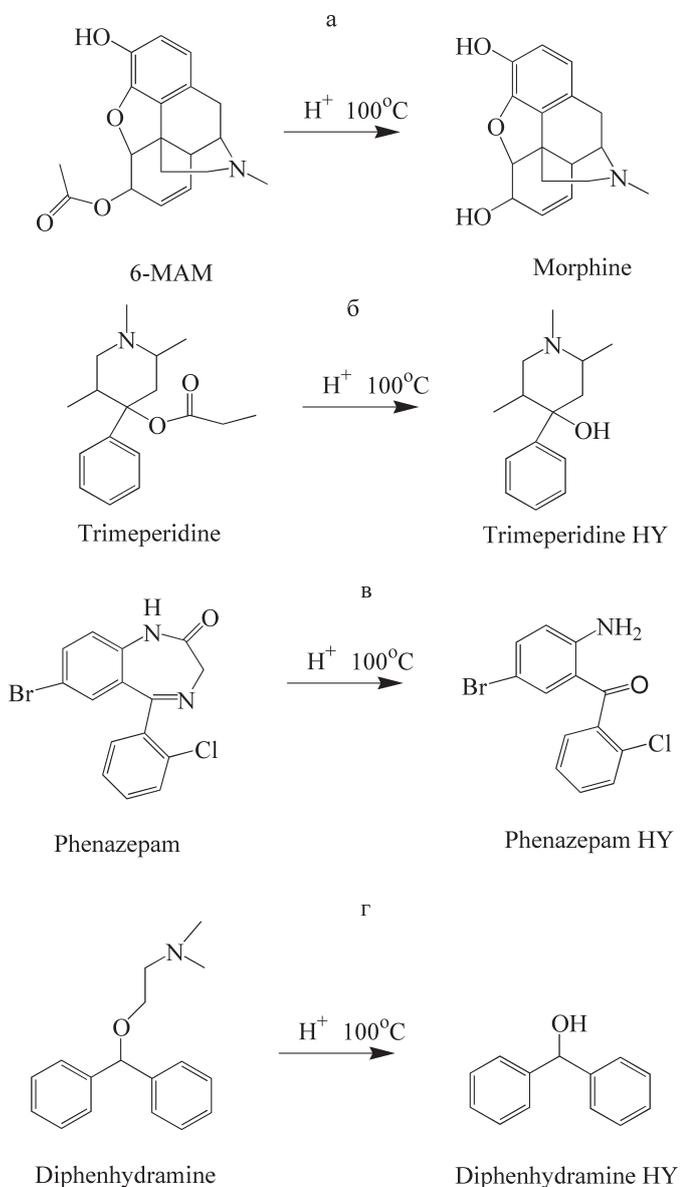


Рис.1. Схемы превращений некоторых соединений в процессе кислотного гидролиза.

Гидролиз сложно-эфирных связей: В процессе кислотного гидролиза большинство сложно-эфирных связей в нативных соединениях и метаболитах гидролизуются. На рис 1 (а, б) приведены примеры реакций гидролиза 6-моноацетилморфина и тримеперидина (промедола). Однако при описанных выше условиях гидролиза не все молекулы, имеющие сложно-эфирные связи, подвергаются гидролизу в значительной степени. Например, атропин, являющийся сложным эфиром троповой кислоты, практически не гидролизует в данных условиях. Продукты кислотного гидролиза (независимо от их типа) обозначаются нами в базах данных с приставкой НУ, например «Trimeperidine НУ». Естественно, что все образованные в ходе гидролиза группы HO- ацетируются на последующей стадии дериватизации. Полученный после ацетилирования продукт будет обозначен как «Trimeperidine НУ Ас».

Гидролиз 1,4 бензодиазепинов. При кислотном гидролизе большинство производных 1,4 бензодиазепина разрушаются, что не всегда позволяет точно установить строение нативного соединения по масс-спектрам продуктов гидролиза. Схема процесса гидролиза производных 1,4 бензодиазепина на примере феназепама приведена на рис.1 (в). Например, при обнаружении на хроматограммах образцов мочи ацетилированных производных 2-амино-5-хлорбензофенона и 2-метиламино-5-хлорбензофенона не удастся достоверно установить нативное соединение, принятое обследуемым лицом. Необходимо дополнительное исследование для ответа на этот вопрос. Однако, не все производные 1,4 бензодиазепина в ходе кислотного гидролиза дают бензофеноны, существуют и более сложные продукты гидролиза некоторых метаболитов клобазама, флюразепама и тетразепама [5]. Следует отметить, что наибольшую устойчивость к гидролизу по нашим данным проявляет диазепам. В некоторых случаях на хроматограммах экстрактов мочи удается обнаружить нативный диазепам и ацетилированное производное его 3-гидроксид метаболита (темазепама).

Гидролиз простых эфирных связей. Наиболее типичным примером этого типа гидролиза является разрушение молекулы дифенгидрамина (основания димедрола) до дифенилметанола (рис. 1 г). Большинство простых эфирных связей устойчиво при используемых нами условиях гидролиза.

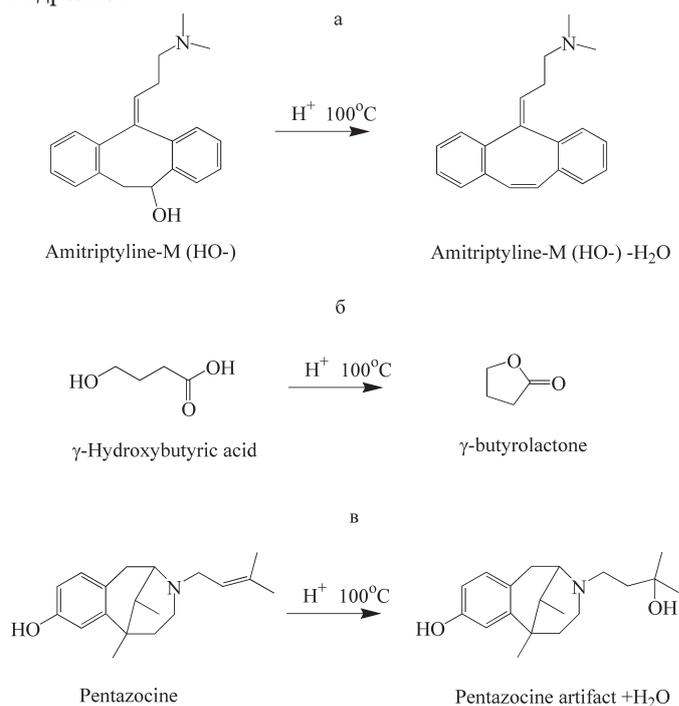


Рис.2. Схемы реакций дегидратации и гидратирования, происходящие в процессе кислотного гидролиза.

Реакции дегидратирования. Под действием высокой концентрации ионов водорода в некоторых молекулах анализируемых соединений происходит дегидратирование с образованием двойных связей (рис. 2 а) или гетероциклов (рис. 2 б). Продукты таких превращений обозначаются нами в базах данных с приставкой «-H₂O», например, « γ -Hydroxybutyric acid -H₂O», «Amitriptyline-M (HO-) -H₂O».

Реакции гидратирования двойных связей. Для некоторых аналитов (пентазоцин, метаболит альпренолола) в кислой среде наблюдается и обратный дегидратированию процесс (рис. 2 в), приводящий к появлению дополнительных полярных HO-групп в молекуле.

Альтернативой кислотного гидролиза является enzymный гидролиз с использованием β -глюкуронидазы, который целенаправленно разрушает глюкурониды, не затрагивая при этом большинство других связей в молекулах аналитов. Но, из-за высокой стоимости β -глюкуронидазы, этот способ гидролиза не всегда применим для рутинных анализов в малобюджетных лабораториях.

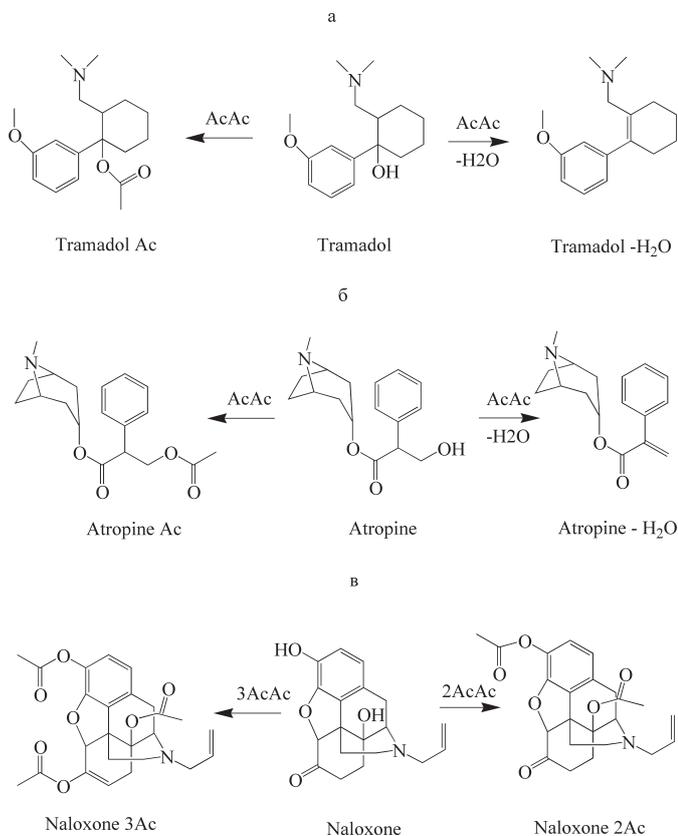


Рис. 3. Основные и побочные реакции, происходящие при дериватизации в смеси уксусного ангидрида с пиридином.

Реакция ацетилирования в смеси уксусного ангидрида с пиридином происходит для большинства аналитов практически полностью без образования побочных продуктов, поэтому она широко применяется для количественного анализа наркотических веществ методами ГХ и ГХ/МС. Однако, для некоторых анализируемых соединений возможны побочные реакции из-за высокого сродства уксусного ангидрида к воде, также за счет существования некоторых молекул в различных таутомерных формах. Контролировать степень прохождения реакций дегидратации при дериватизации довольно сложно, поэтому образование побочных неконтролируемых продуктов усложняет идентификацию анализируемых веществ и приводит к потере чувствительности ГХ анализа. Типичные основные и побочные реакции, происходящие при дериватизации в смеси уксусного ангидрида с пиридином приведены на рис. 3. Частичная дегидратация ряда соединений происходит не только при дериватизации уксусным, но и пропионовым, трифторуксусным и другими ангидридами. Для устранения этого явления используют реакции получения производных, происходящие в более мягких условиях, например триметилсилилирование [4]. Другой реакцией, ведущей, как правило, к двум продуктам с переменным соотношением между ними является это ацетилирование кетонных групп в молекулах аналитов. Кетонные группы существуют в двух равновесных формах — кетонной и енольной. Так как реакция с уксусным ангидридом идет только с енольной формой, то получаются два продукта

реакции. Типичная схема ацетилирования кето-опиатов показана на рис. 3 (в).

Наконец, ряд соединений подвергается изменению непосредственно в инжекторе газового хроматографа. Частичная термическая деструкция приводит к элиминированию простых молекул типа воды, углекислого газа или алкиламинов. Примеры наиболее часто встречающихся типов термической деструкции приведены на рис. 4.

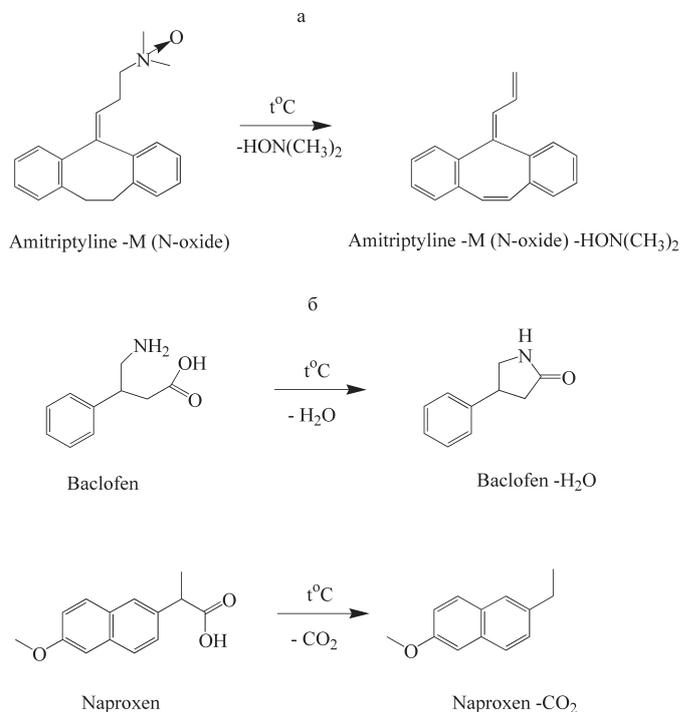


Рис. 4. Реакции, происходящие при термической деструкции в инжекторе ГХ. а) Элиминирование молекулы диметилгидроксиламина, б) циклизация баклофена, в) декарбоксилирование напроксена.

Таким образом, помимо метаболических процессов, происходящих с наркотическими, психотропными и сильнодействующими лекарственными веществами в организме человека, могут происходить превращения этих веществ и их метаболитов на стадиях подготовки проб биологических жидкостей к анализу, а также в ходе самой хроматографической разгонки. Это приводит в некоторых случаях к появлению продуктов, имеющих отличные от исходных анализов газохроматографические и масс-спектральные свойства. Следовательно, в используемые для рутинных анализов библиотеки масс-спектров и ГХ-базы данных должны входить данные об этих артефактах. Более того, хроматограммы, полученные при использовании различных методик пробоподготовки биожидкостей к ГХ анализу должны обрабатываться с использованием различных библиотек масс-спектров и баз ГХ данных. Например, для скрининга мочи и крови нами используются различные методики подготовки проб и методики ГХ анализа, описанные в [1, 2]. Соответственно, для обработки и идентификации пиков на хроматограммах с помощью программы AMDIS используются разные библиотеки. В библиотеку, используемую при скрининге мочи включены все известные метаболиты, их ацетилированные производные и артефакты, из нее исключены соединения, разлагающиеся при гидролизе или дающие ацетилированные производные. В библиотеку, используемую для скрининга крови, включены помимо нативных соединений только артефакты, образующиеся в ходе ГХ анализа, и исключены все производные нативных веществ

и метаболитов, которые не могут быть получены в данном виде анализа. На такой же основе построены макрокоманды для визуального поиска пиков токсикантов по их характеристическим ионам, реализованные в программе ChemStation версий от C 02. 00 до D 03.01. Использование

специализированных библиотек, предназначенных для обработки хроматограмм только одного или нескольких методов, использующих одинаковую подготовку проб и ГХ условия, позволяет избежать как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов анализа.

Литература:

1. Мелентьев А.Б., Ким Д.Г. Идентификация метаболитов трамадола в виде их ацетилированных производных методом газовой хроматографии с масс селективным детектором // Известия Челяб. Науч. Центра. — 2003. — №. 1 (18).
2. Мелентьев А.Б. Латышева Г.А. Скрининг слабополярных наркотических и сильнодействующих лекарственных веществ в крови, методом газовой хроматографии — масс спектрометрии. Материалы шестого всероссийского съезда судебных медиков: «Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской науки и практики». Москва — Тюмень: Издат. Центр «Академия», 2005. — С. 196-197.
3. Baselt R.C., Cravey R.H. Disposition of Toxic Drug and Chemicals in Man. — 4-d Ed. — Chemical Toxicology Institute Forest City. — California. — 1995. — 802 p.
4. Clarke's analysis of drugs and Poisons / Edited by A.C. Moffat, M.D.Osselton and B.Widdop. London., Pharmaceutical Press. — 2004. — 1632 p.
5. Pfleger K., Maurer H.H., Weber A. Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites. — 2-d Ed. Part.1. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. — 1992. — 1266 p.

© С.М. Карпов, Е.А. Шарай, 2008
УДК 616.33/.34-002.3-08:615.835.14

С.М. Карпов, Е.А. Шарай

ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ДЕТЕЙ С РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ЗАКРЫТОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Кировская Центральная районная больница Ставропольского края (гл. врач — С.А. Алиева)

Бюро судебно-медицинской экспертизы Ставропольского края (начальник — А.В. Копылов)

Было обследовано 134 ребенка в возрасте 13-16 лет с диагнозом « Сотрясение головного мозга и ушиб головного мозга легкой степени. При этом были использованы нейрофизиологические методы исследования: электроэнцефалография и методика вызванных зрительных потенциалов. Исследование показало, что характер электроэнцефалограммы зависит от формы черепно-мозговой травмы. Данные обстоятельства позволяют уточнить тяжесть поражения головного мозга и прогнозировать исход заболевания.

Ключевые слова: закрытая черепно-мозговая травма, электроэнцефалограмма, детский возраст, диагностика.

ELECTROENCEPHALOGRAPHIC FACTORS BESIDE CHILDREN WITH DIFFERENT FORMS LOCKED SKULL-BRAIN TRAUMA

S.M. Carпов, E.A. Sharay

134 children in the age of 13-16 years with the diagnosis Concussion of a brain and a bruise of a brain of an easy degree have been surveyed. Thus have been used neuro-physiological methods of research: electroencephalographic and a technique of the caused visual potentials. Research has shown, that character electroencephalographic depends on the form of a craniocerebral trauma. The given circumstances allow to specify weight of defeat of a brain and to predict an outcome of disease.

Key words: the closed craniocerebral trauma, electroencephalographic, children's age, diagnostics.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) занимает особое место среди детского нейротравматизма. При диагностике ЧМТ легкой степени у детей, врач-невролог и судебно-медицинский эксперт сталкиваются со многими трудностями, где нередко возникают проблемы в дифференциальной диагностике между разными формами ЧМТ (сотрясение головного мозга от ушиба головного мозга легкой степени). Ориентир на продолжительность утраты сознания хотя и является наиболее достоверным клиническим признаком тяжести ЧМТ, но не во всех случаях это может служить диагностическим критерием. Кроме того, в оценке выраженности неврологических симптомов, их симметричности всегда присутствует доля субъективизма. Если пациент обращается за помощью спустя несколько дней после травмы, то зачастую при диагностике легкой ЧМТ или ее отрицании, врач-невролог полагается исключительно на свой опыт и свою интуицию, что в свою очередь не может приниматься судмедэкспертом в качестве аргумента. Вышеперечисленные трудности диагностики легкой ЧМТ у детей объясняются скудностью, неспецифичностью, непредсказуемой динамичностью объектив-

ных данных. Это способствует двум противоположным явлениям: гипердиагностики или недиагностированию ЧМТ. В связи с этим важна не только скрупулезная оценка клинических симптомов, но и показатели объективных данных нейрофизиологических методов обследования, дающие математическую оценку состоянию ЦНС, что несомненно позволило бы проводить наиболее точную дифдиагностику ЧМТ у детей.

Целью исследования явилось изучение и сопоставление клинических и нейрофизиологических данных у детей с разными формами ЧМТ.

Материал и методы

Под наблюдением в условиях травматологического стационара в возрасте от 13-16 лет находилось 134 школьника, перенесших ЧМТ. Среди них 97 мальчиков и 37 девочек, средний возраст которых составил $14,55 \pm 2,3$. В 101 (75,4%) случае дети перенесли сотрясение головного мозга (1-я группа), в 33 (24,6%) случаях — ушиб головного мозга легкой степени — 2я группа (по классификации Коновалов А.Н. и соавт., 1978 г.). Более половины всех травм (53%), явились следствием уличных происшествий, из них