



ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.И.Сеченова

Н.Н. Ерощенко

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



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Кафедра аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии



**Центральная химико-токсикологическая  
лаборатория**



MC/MC: AB SCIEX 3200 Qtrap и 4500 Qtrap  
ВЭЖХ: Perkin Elmer Flexar FX 10



**Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology**

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail [bn38@mail.ru](mailto:bn38@mail.ru)

# Иммуно-химический анализатор для химико-токсикологических исследований ИК 200609



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Определение алкоголя

1) Потребление алкоголя устанавливается измерением концентрации этанола в крови, моче и его паров в выдыхаемом воздухе.

Данный метод дает отрицательный результат уже спустя сутки, лишь в отдельных случаях дольше.

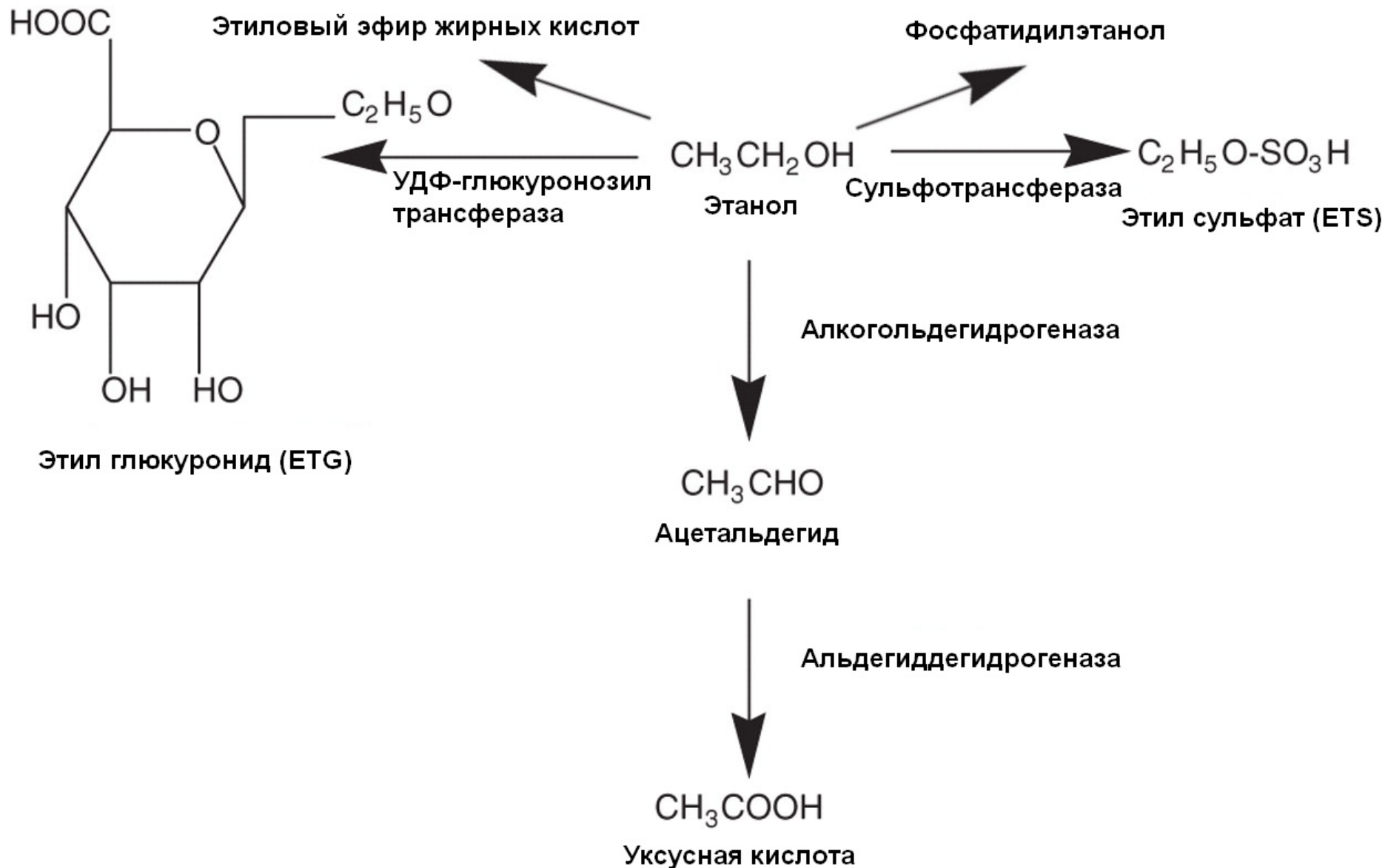
2) Маркеры потребления этанола:

- *Непрямые маркеры* – воздействие высоких токсических доз этанола на организм человека и гомеостаз - GGT, AST, ASL, MCV, CDT, 5HTOL

- *Прямые метаболиты* – возникают в процессе метаболизма этанола - EtG, EtS, PEth, FAEES.



# Метаболизм этанола



**Менее 0.5 % этанола метаболизируется по неокислительному пути с образованием этил глюкуронида и этил сульфата.**





# Маркеры и метаболиты потребления алкоголя

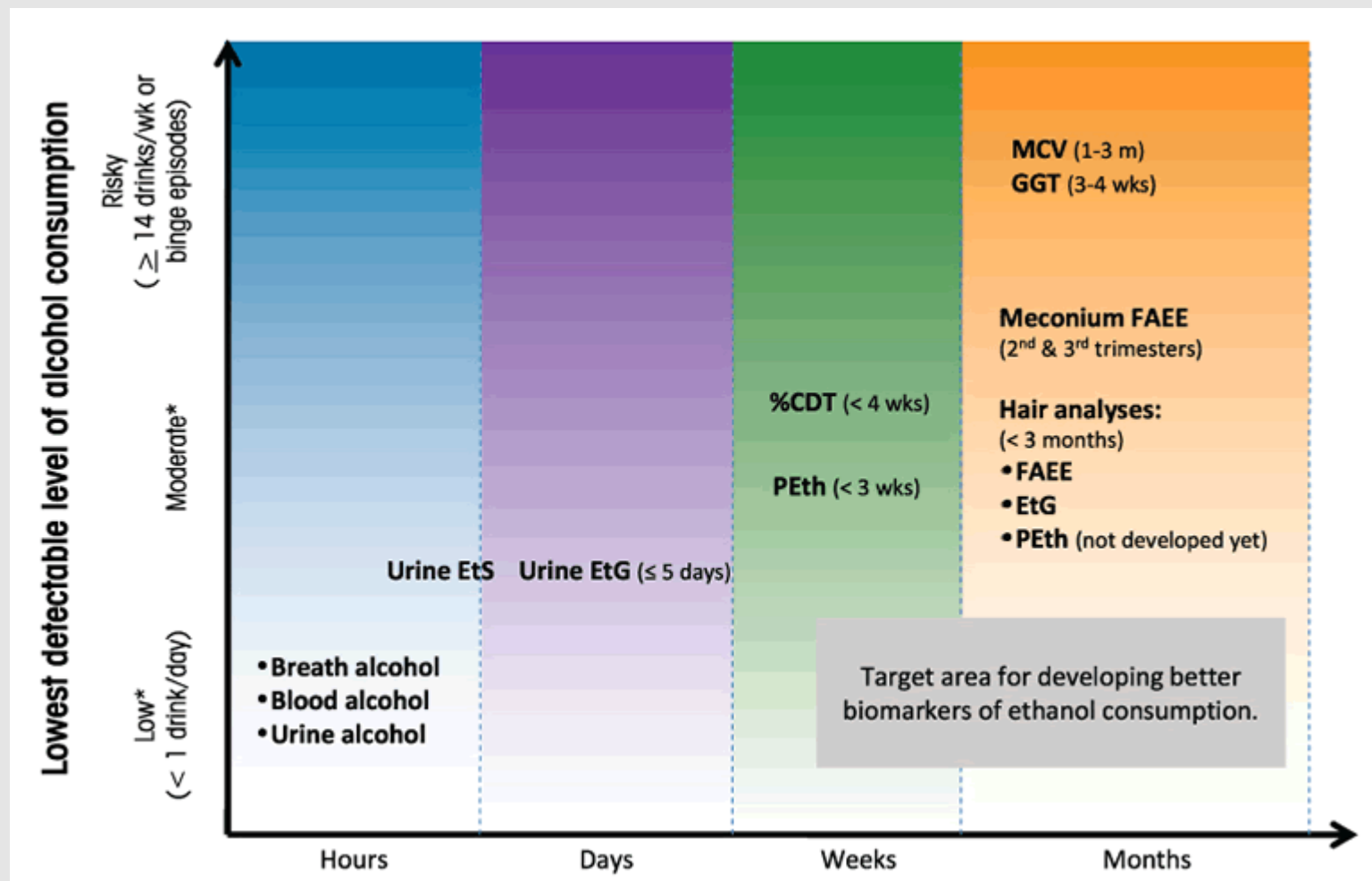
Биомаркер	Аббревиатура	Принятие алкоголя	Ложно положительные результаты
Этанол	<b>EtOH</b>	Под влиянием	Еда
Этил глюкуронид / сульфат	<b>ETG, ETS</b>	Недавнее потребление	Спиртосодержащие средства для личной гигиены: полоскание рта и протирание рук. Косметика, еда
5-Гидрокситриптофол	<b>5-HTOL</b>	Недавнее потребление	Необходимы дальнейшие исследования
Углеводно-дефицитный трансферрин	<b>CDT</b>	Потребление больших доз этанола	Железодефицитная анемия, менструальный цикл, углеводно-дефицитный гликопротеиновый синдром, гепатит С.
Фосфатидил этанол	<b>PEth</b>	Потребление больших доз этанола	Необходимы дальнейшие исследования
Гамма глутамил трансфераза	<b>GGT</b>	Хроническое злоупотребление/повреждение органов	Заболевания печени, курение, ожирение, медикаментозная индукция микросомальных ферментов печени
Аспартат & Аланин аминокислотная трансфераза	<b>AST &amp; ALT</b>	Хроническое злоупотребление/повреждение органов	Как и у GGT. Избыточное потребление кофе-содержащих напитков может снизить концентрацию в крови.
Средний корпускулярный объем эритроцитов	<b>MCV</b>	Хроническое злоупотребление/повреждение органов	Заболевания печени, гемолиз, заболевания крови, анемия, дефицит фолиевой кислоты



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Временные пределы обнаружения





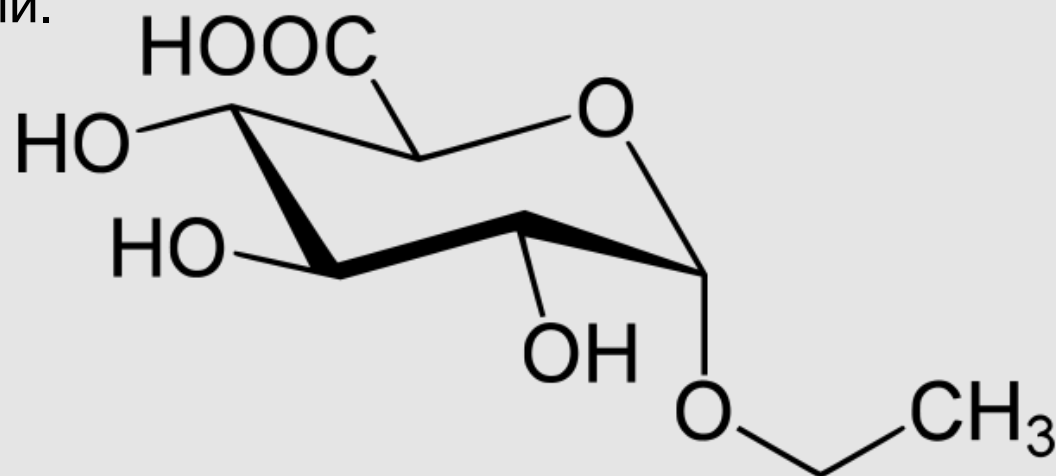
# Актуальность

- Подтверждающий анализ алкогольного опьянения водителей.
- Контроль ремиссии употребления алкоголя.
- Контроль работников предприятий повышенной опасности, военнослужащих и других категорий граждан.
- Медицинский осмотр обучающихся.
- Судебно-медицинская экспертиза.
- Контроль потребления алкоголя женщинами во время беременности.



# Этил глюкуронид

1. Прямой метаболит этанола.
2. Чувствительный и специфичный.
3. Обнаруживается в моче до 80 часов после употребления алкоголя.
4. В меньшей степени зависит от возраста, пола, приема лекарственных препаратов и хронических заболеваний.
5. Накапливается в волосах.



# Валидационные параметры

- Селективность
- Нижний предел количественного определения
- Функция отклика и калибровочный диапазон (воспроизводимость калибровочной кривой)
- Точность (Accuracy)
- Прецизионность (Precision)
- Влияние матрицы (эффекты матрицы)
- Стабильность анализа(ов) в биологической матрице
- Стабильность анализа(ов) и внутреннего стандарта при хранении, в рабочих растворах и экстрактах в течение всего периода хранения и обработки
- Воспроизводимость (робастность)





# Нормативные документы

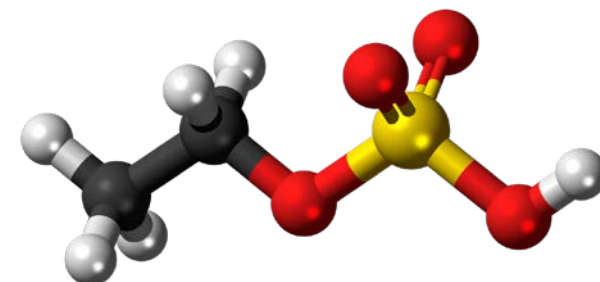
- Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» и ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. Food Drug Administration, 2001.
- Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency, 2011.
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. ФГБУ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ» Минздрава России, 2013, Москва.



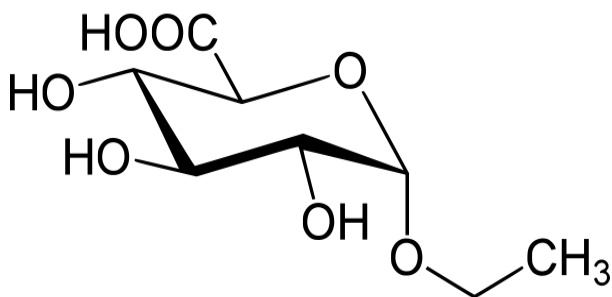
# Пробоподготовка для ВЭЖХ/МС/МС



Мочу центрифугируют. В пробирку типа «Эппендорф» отбирают 50 мкл мочи и 50 мкл метанола с ВС. Затем добавляют 900 мкл воды.



Встряхивают в течение 1 минуты и центрифугируют при 12000 об/мин в течение 5 минут.



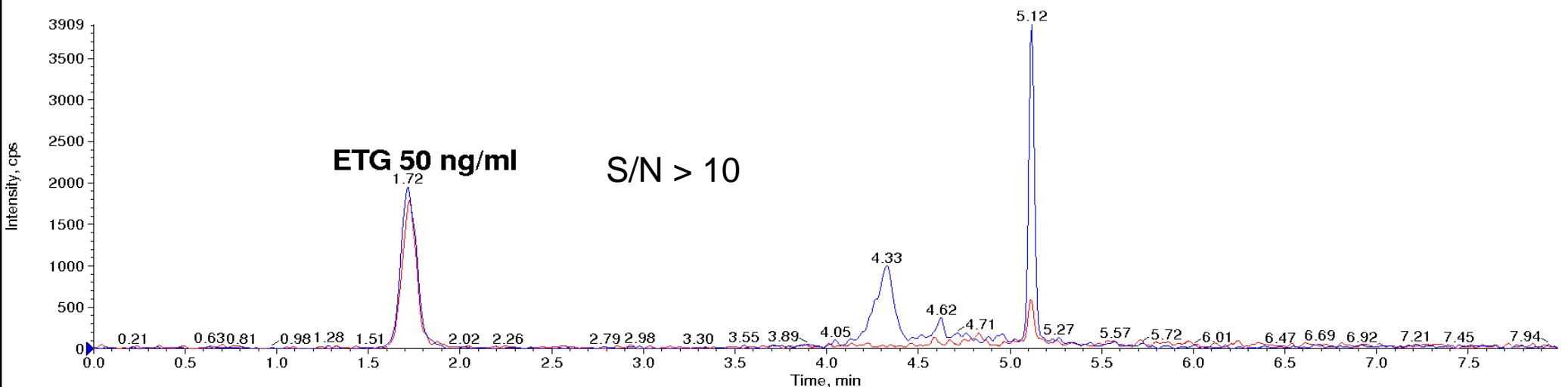
Отбирают 700 мкл образца в стеклянные вials и анализируют.



# Хроматограмма ETG и ETS при содержании 50 нг/мл (LLOQ)

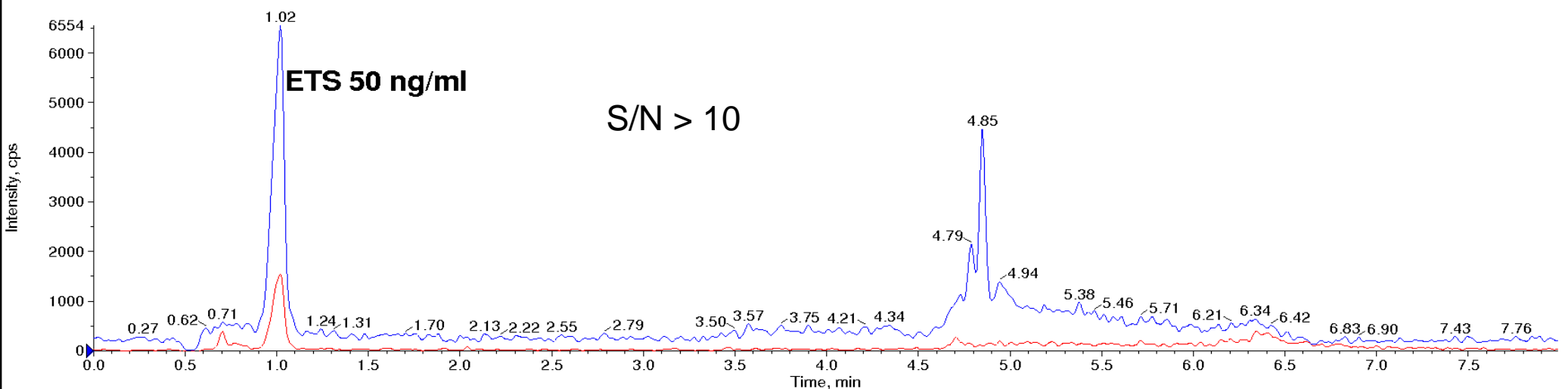
XIC of -MRM (8 pairs): 220.824/74.900 Da ID: ETG\_1 from Sample 5 (cc50) of ValidationDay3.wiff (Turbo Spray), Smoothed, Smoothed

Max. 3908.7 cps.



XIC of -MRM (8 pairs): 124.847/96.900 Da ID: ETS\_1 from Sample 5 (cc50) of ValidationDay3.wiff (Turbo Spray), Smoothed, Smoothed

Max. 6553.6 cps.



Department of Analytical Toxicology and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

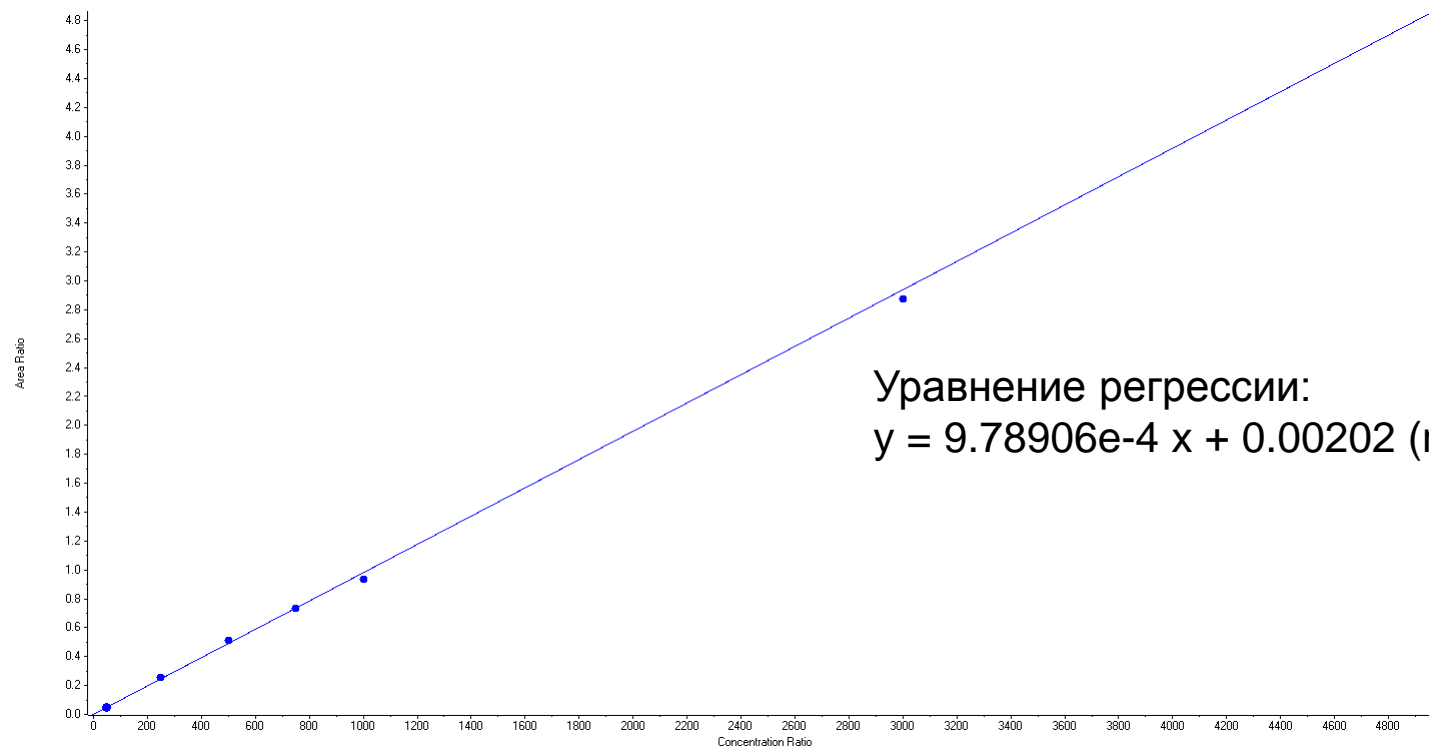
Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru





# Результаты градуировки методики анализа ETG по методу внутреннего стандарта

Ожидаемая концентрация, нг/мл	Количество значений	Среднее значение концентрации	Точность % Accuracy
50.00	1 of 2	49.48	99.0
250.00	1 of 1	261.36	104.5
500.00	1 of 1	522.00	104.4
750.00	1 of 1	745.16	99.4
1000.00	1 of 1	955.49	95.5
3000.00	1 of 1	2935.96	97.9
5000.00	1 of 2	4966.44	99.3



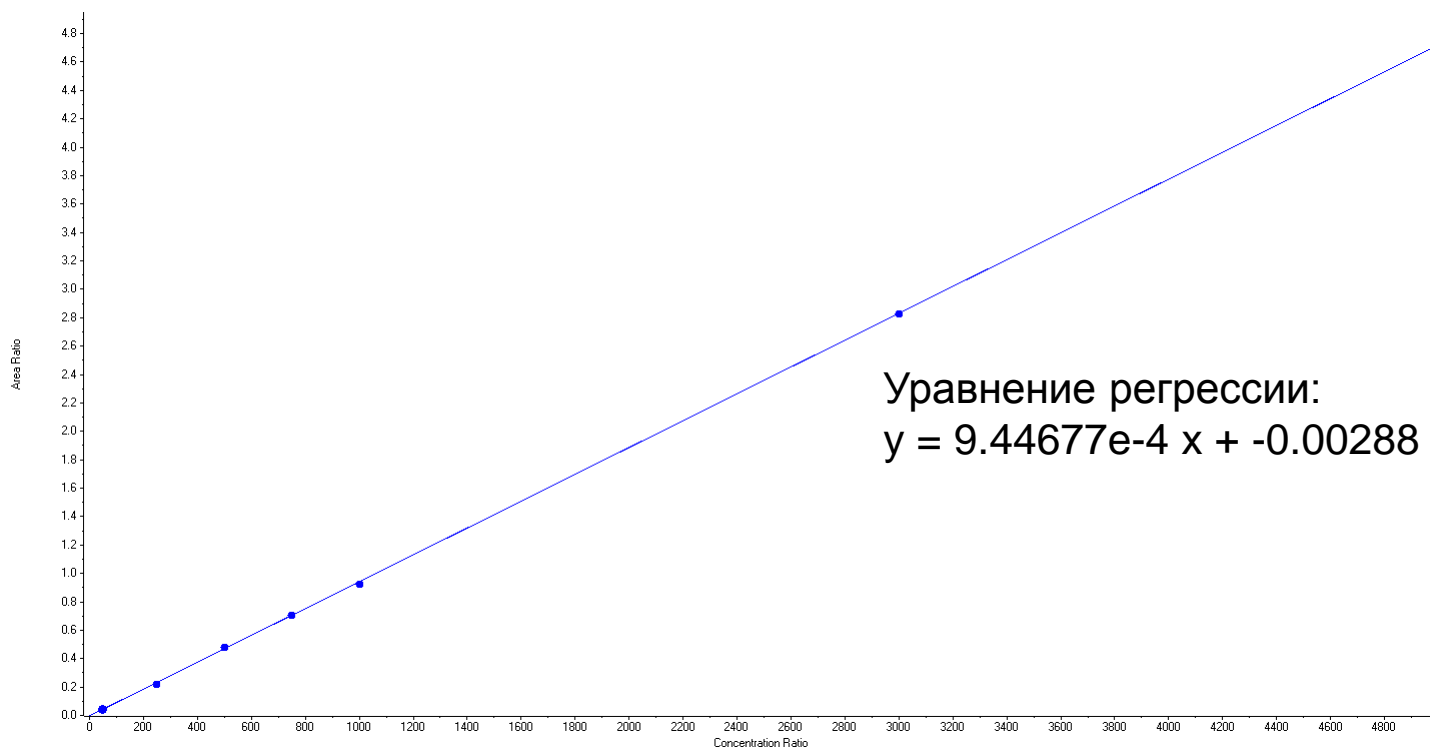
Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru



# Результаты градуировки методики анализа ETS по методу внутреннего стандарта

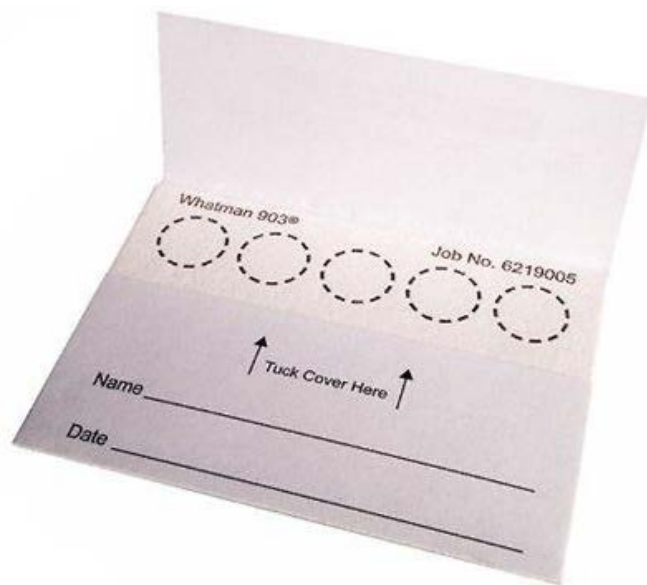
Ожидаемая концентрация, нг/мл	Количество значений	Среднее значение концентрации	Точность % Accuracy
50.00	1 of 2	50.50	101.0
250.00	1 of 1	235.13	94.1
500.00	1 of 1	513.13	102.6
750.00	1 of 1	745.86	99.4
1000.00	1 of 1	981.49	98.1
3000.00	1 of 1	2996.82	99.9
5000.00	1 of 2	5241.02	104.8



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Использование бумажного носителя для транспортировки биологических образцов



- Бумажный носитель создан для транспортировки образцов крови, мочи и плазмы.

- На область, выделенную пунктиром, наносится определенное количество образца, затем бумажный носитель высушивают и отправляют на анализ в лабораторию.

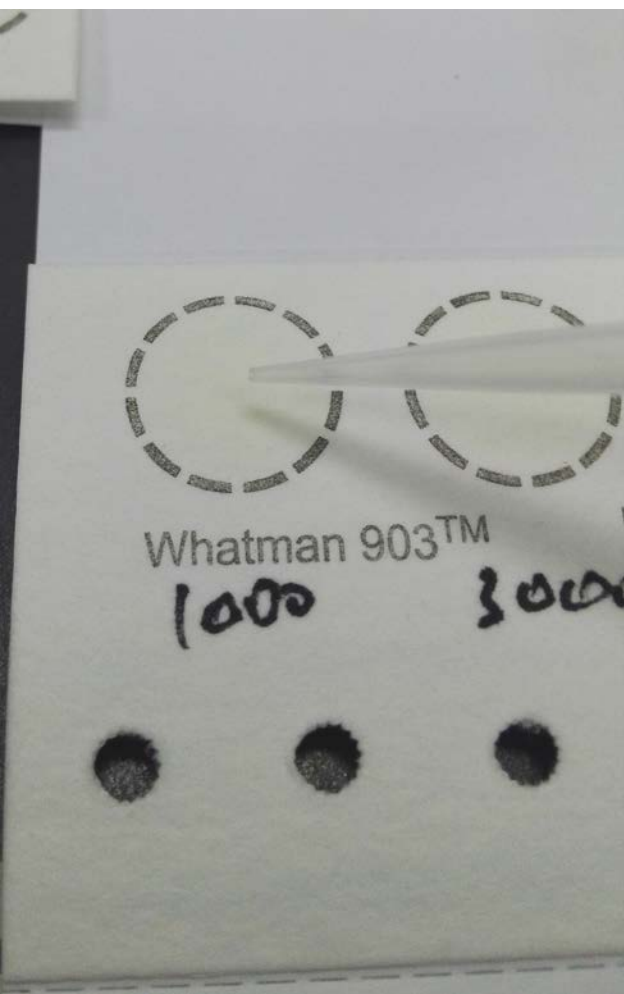
- Плюсы данного носителя:

- Удобство нанесения образца (области выделены пунктиром)
- Не требует охлаждения образца при транспортировке
- Бумажный носитель имеет области для заполнения данных
- Высокая воспроизводимость при экстракции образца с носителя (количественная оценка образца)





# Пробоподготовка при использовании бумажного носителя

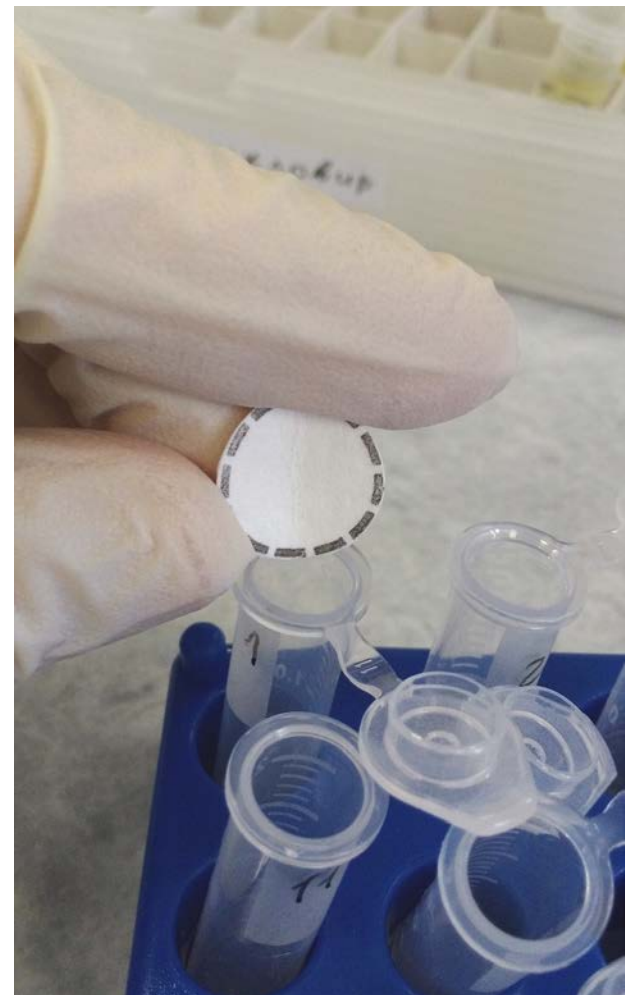


Нанесение точного объема образца (50 мкл) на бумажный носитель (до 100 мкл в одну область, выделенную пунктиром). Носитель высушивают.

**Транспортировка**



Область, выделенную пунктиром, вырезают из носителя и помещают в пробирку «Эппендорф».



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Пробоподготовка при использовании бумажного носителя



В пробирку «Эппендорф»  
добавляют  
500 мкл метанола с IS и  
встряхивают  
в течение 10 минут.



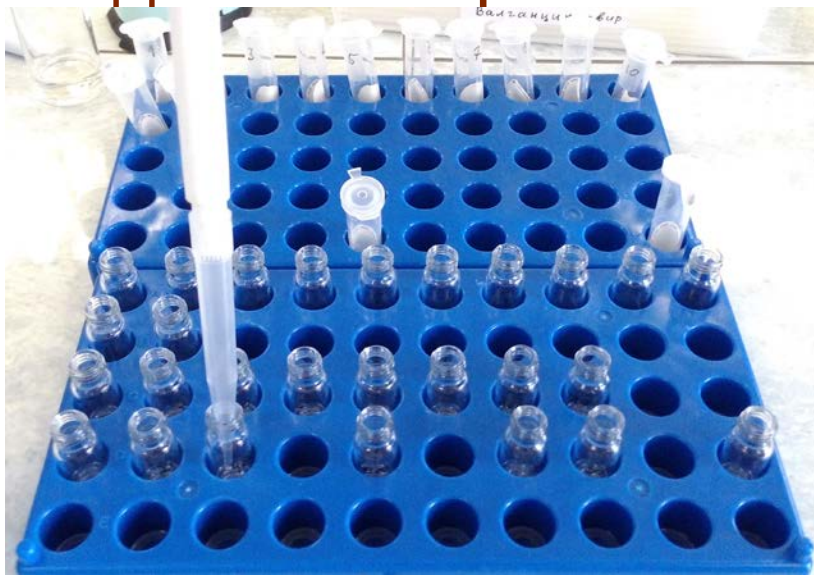
Пробирки помещают в  
центрифугу на 10 минут при  
12000 об/мин.



**Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology**

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail [bn38@mail.ru](mailto:bn38@mail.ru)

# Пробоподготовка при использовании бумажного носителя



После центрифугирования  
отбирается 400 мкл метанола и  
переносится вialsу.  
Затем образцы упаривают и  
перерастворяют в 400 мкл воды.



Анализ ВЭЖХ/МС/МС

Ожидаемая концентрация, нг/мл	Количество значений	Среднее значение концентрации	Точность % Accuracy
50.00	1 of 2	49.37	98.7
250.00	1 of 1	260.31	104.1
500.00	1 of 1	529.37	105.9
750.00	1 of 1	759.56	101.3
1000.00	1 of 1	976.10	97.6
3000.00	1 of 1	2854.09	95.1
5000.00	1 of 2	4862.54	97.3



Уравнение регрессии:

$$y = 8.41653e-4 x + 0.01420 \quad (r = 0.99909)$$

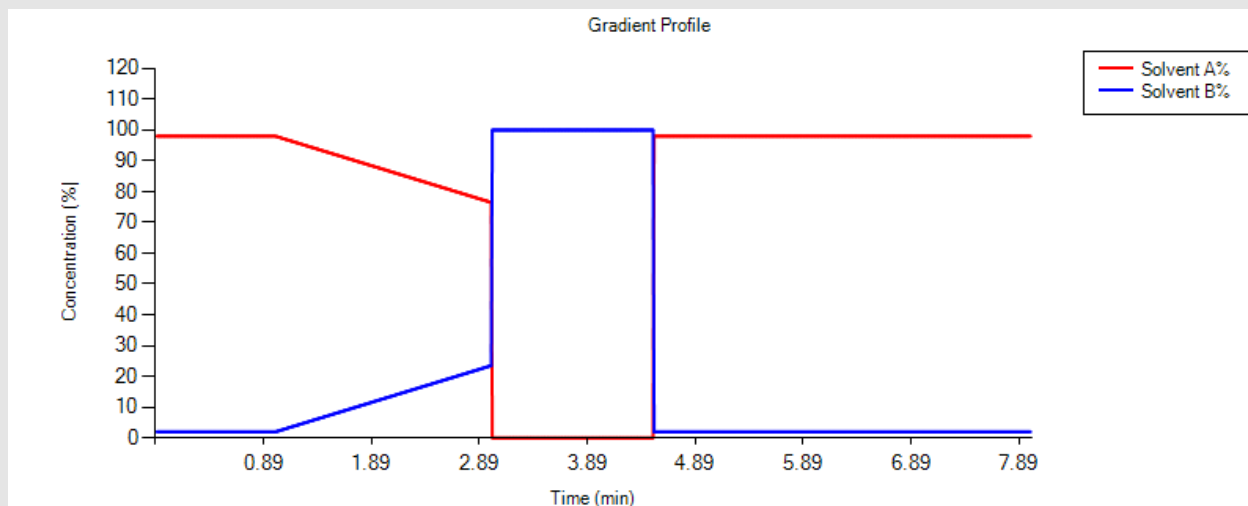


# Условия ВЭЖХ/МС/МС анализа

- Хроматографическая колонка *ProntoSIL 120-3-C18 AQ*, размер 2.0x75 мм, зерно 3.0 мкм;
- Температура термостата 50°C;
- Режим: градиентный;
- подвижная фаза - элюент А – вода, 0.1% муравьиная кислота;
- Элюент В - ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота;
- Скорость потока 300 мкл/мин;
- Объем вводимой пробы 5 мкл;

Градиентная программа:

Время	Процент А	Процент В
0.1	98	2
1.0	98	2
3.0	76.5	23.5
4.5	0	100
4.6	98	2
8	98	2



# Условия ВЭЖХ/МС/МС анализа

Прибор: Sciex 4500 Qtrap

Режим ионизации: ESI (-)

Занавесочный газ: 35

Газ камеры столкновений: Средний

Напряжение Ион спрей: -4500

Температура: 400 °C

Газ 1: 40

Газ 2: 70

Таблица MRM-переходов:

Название	Prec Ion	Prod Ion	DP	EP	CE	CXP
ETG_1*	220,824	74,9	-70	-10	-18	-7
ETG_2	220,824	85	-70	-10	-24	-11
ETG-D5_1*	225,837	75	-55	-10	-20	-7
ETG-D5_2	225,837	84,9	-55	-10	-22	-7
ETS_1*	124,847	96,9	-120	-10	-22	-3
ETS_2	124,847	79,8	-120	-10	-44	-11
ETS-D5_1*	129,867	98	-120	-10	-26	-9
ETS-D5_2	129,867	79,8	-120	-10	-44	-5

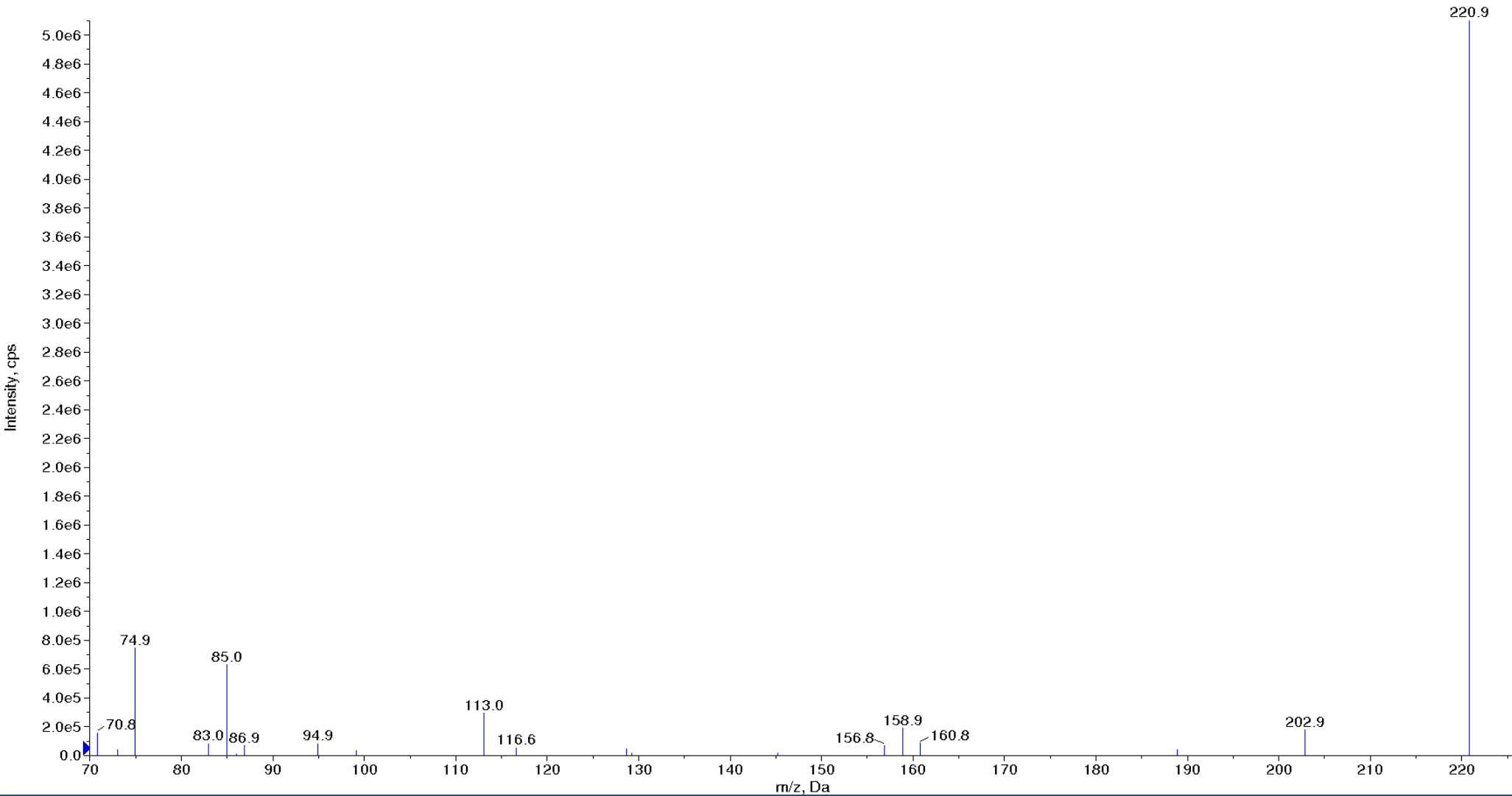
\* MRM для количественного определения



# Масс-спектр ETG

■ -MS2 (220.82) CE (-37): 26 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleName) of ETG\_InitProduct\_Neg.wiff (Turbo Spray), Centroided

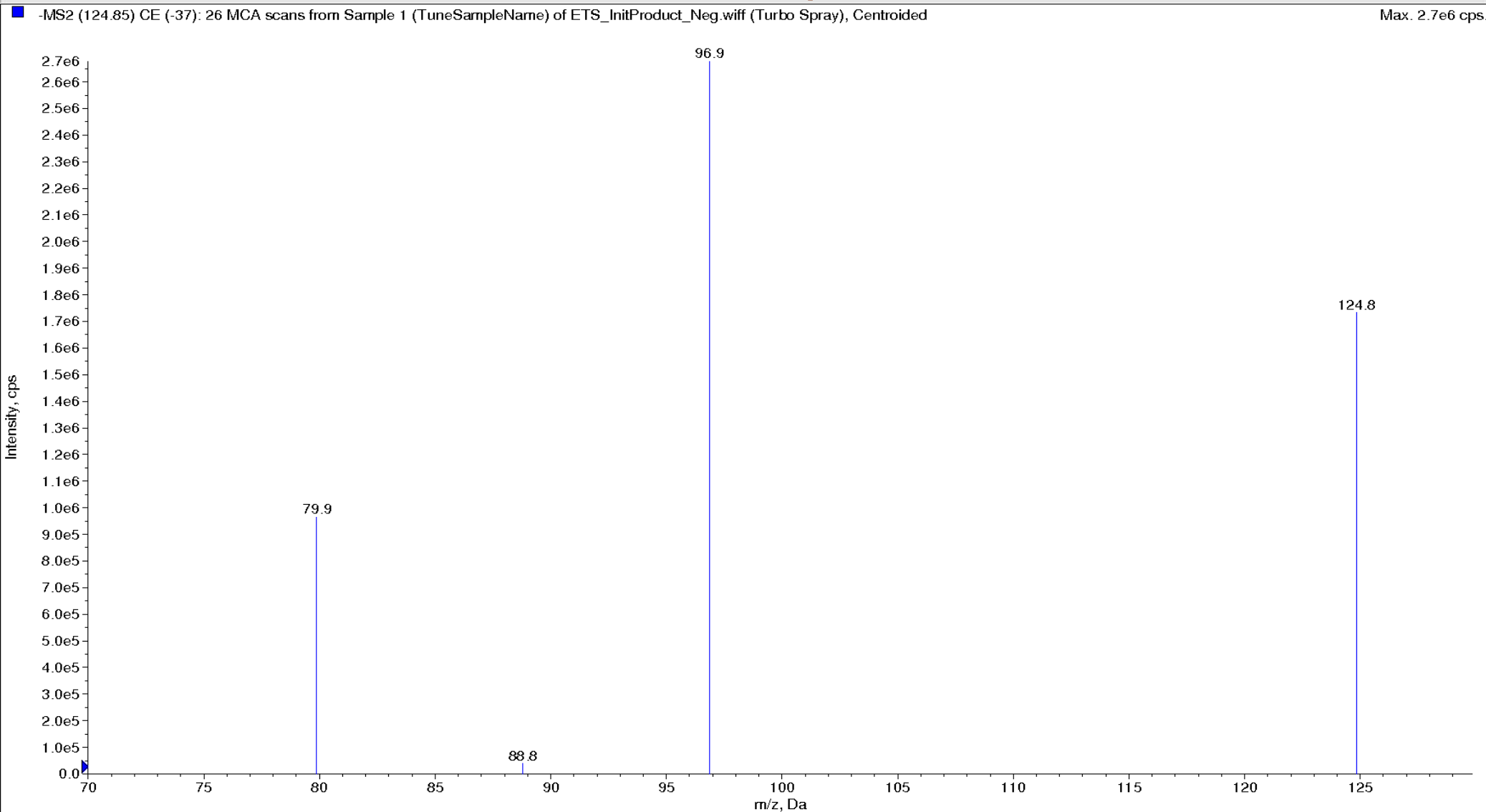
Max. 5.1e6 cps.



Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Масс-спектр ETS

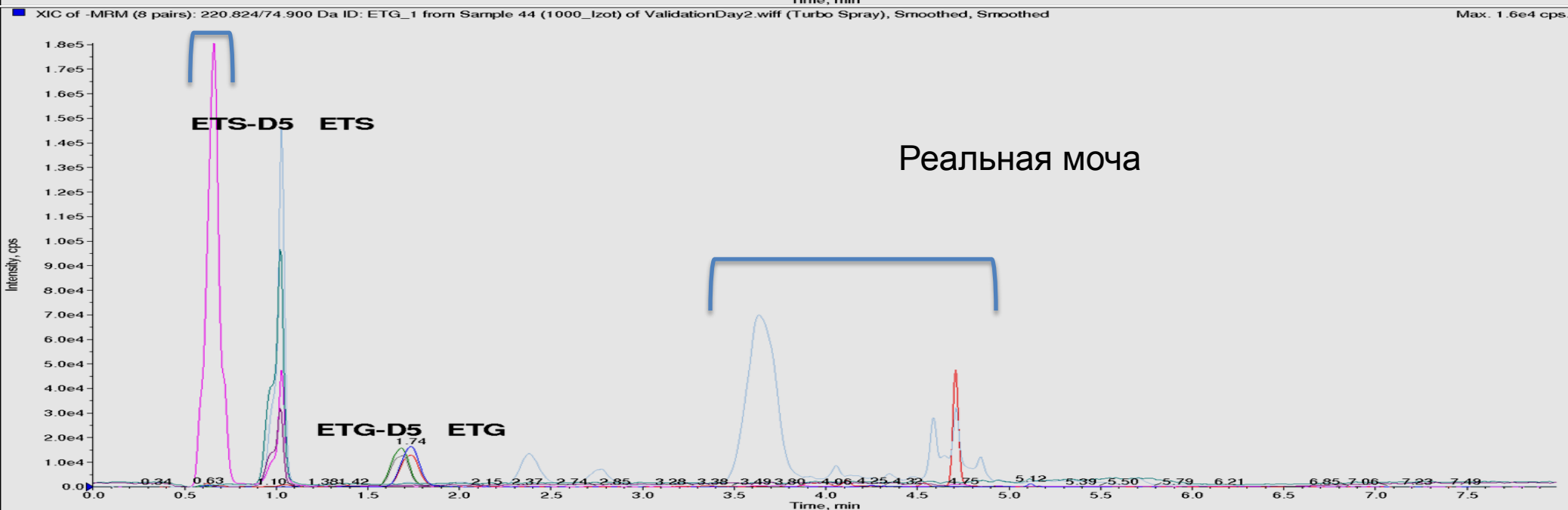
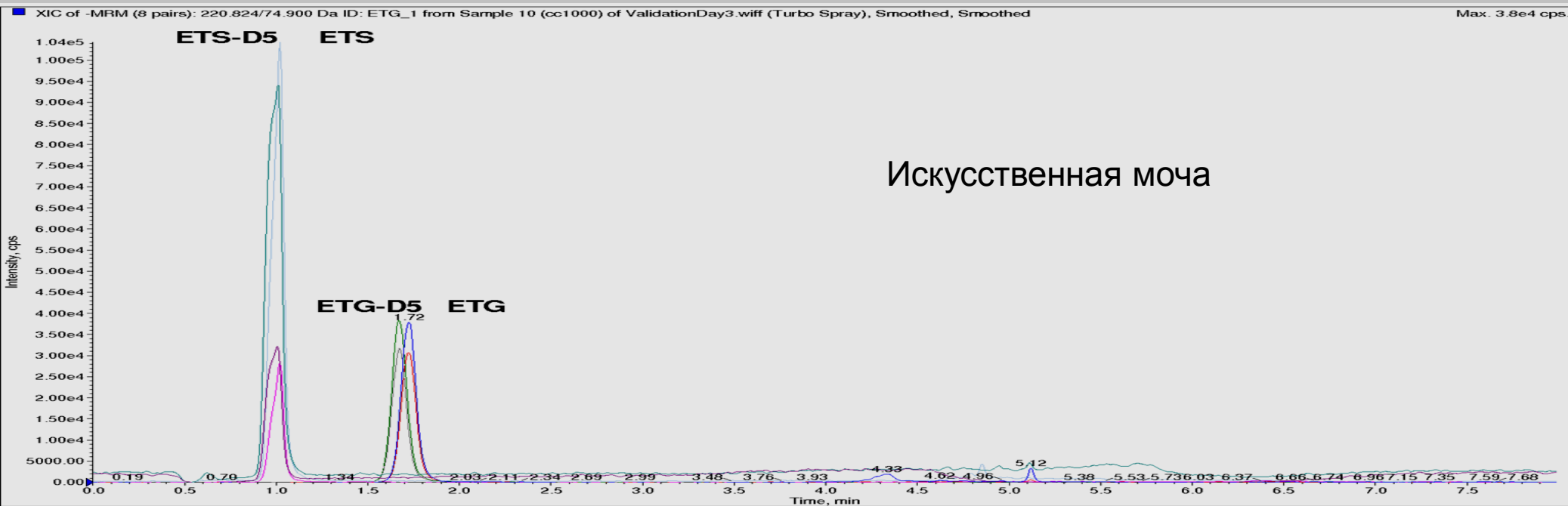


Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru



# Хроматограмма ETG и ETS в искусственной моче и настоящей.



# Сравнение результатов ВЭЖХ/МС/МС и иммунохроматографии

Образцы от людей, сообщивших о факте приёма алкоголя.

Образец	Концентрация, нг/мл	Результат на тест-полосках, нг/мл
16	< LLOQ	< 200
10	1725.4	> 1000
12	662.03	556.7
4	1141.34	> 1000
9	429.37	360.5
Sample 3	8749.14	> 1000
Sample 6	9461.36	> 1000
Sample 7	2343.11	> 1000
Sample 8	1249.74	> 1000
Sample 11	474.81	720.97
Sample 13	2094.55	> 1000
Sample 21	793.16	784.86
Sample 22	132.97	504.33
3	13202.41	> 1000
8	19204.42	> 1000

Предел обнаружения для тест-полосок был 200 нг/мл в целях уменьшения вероятности ложноположительных результатов.

Образцы от людей, не принимавших алкоголь более 7 дней.

Образец	Концентрация, нг/мл	Результат на тест-полосках, нг/мл
16	< LLOQ	< 200 нг/мл
1	< LLOQ	389.4 нг/мл
2	< LLOQ	< 200 нг/мл
3	163.22 нг/мл	< 200 нг/мл
6	< LLOQ	< 200 нг/мл
8	55.76 нг/мл	< 200 нг/мл
11	< LLOQ	< 200 нг/мл
13*	< LLOQ	>1000 нг/мл
14*	< LLOQ	>1000 нг/мл
16	< LLOQ	< 200 нг/мл
17	< LLOQ	< 200 нг/мл
18	< LLOQ	< 200 нг/мл
18	< LLOQ	< 200 нг/мл
21	< LLOQ	< 200 нг/мл

\* Человек болен сахарным диабетом второго типа.



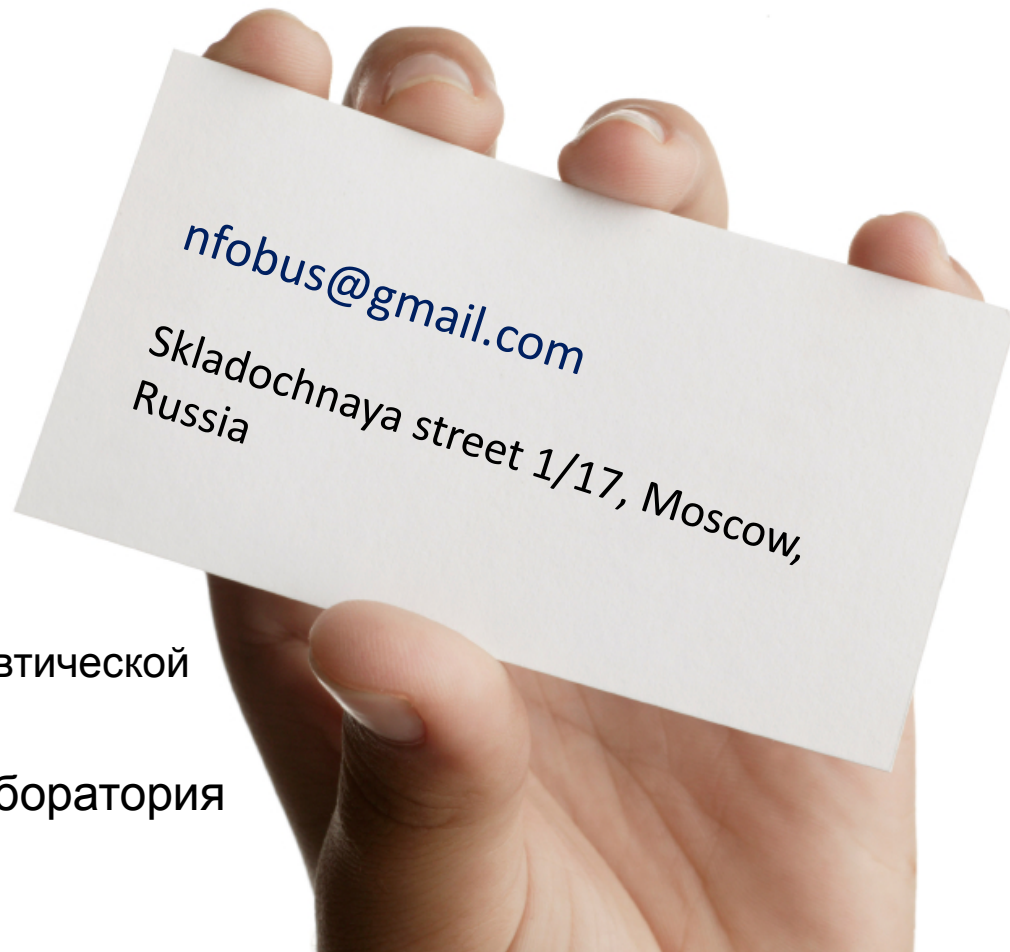
Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail bn38@mail.ru

# Выводы

- В результате проведения первого этапа исследования была валидирована методика обнаружения этил глюкуронида в моче методом ВЭЖХ/МС/МС.
- Был установлен нижний предел определения этил глюкуронида методом иммунохроматографии.
- Установлена корреляция между двумя аналитическими методами.
- Исследован способ транспортировки образцов мочи с помощью бумажного носителя. Данная методика была разработана и проверена на реальных образцах мочи.
- Следующим этапом наших исследований будет проведение клинических испытаний.





[nfobus@gmail.com](mailto:nfobus@gmail.com)  
Skladochnaya street 1/17, Moscow,  
Russia

## Россия

**ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова**

Кафедра аналитической токсикологии, фармацевтической химии и фармакогнозии

Центральная химико-токсикологическая лаборатория

Москва, ул.Складочная, дом 1, строение 17.



**Department of Analytical Toxicology Pharmaceutical Chemistry  
and Pharmacognosy  
Central Chemical Laboratory of Toxicology**

Moscow,  
1/17 Skladochnaya St.,  
e-mail [bn38@mail.ru](mailto:bn38@mail.ru)



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!  
Я буду рад ответить на ваши вопросы!

