

Методы химико-токсикологической диагностики в мониторинге ситуации с потреблением наркотиков в России

ИЗОТОВ Б.Н.	д.м.н., профессор, зав. кафедрой аналитической и судебно-медицинской токсикологии и Центральной химико-токсикологической лабораторией ММА им. И.М. Сеченова, Москва
КОЗЛОВ А.А.	к.м.н., доцент, зам. начальника отдела Медицинского управления ФСКН России, Москва
ДИДЕНКО Е.С.	зам. начальника Медицинского управления ФСКН России, Москва
ДОРОВСКИХ И.В.	д.м.н., профессор, 1586 окружной военный клинический госпиталь Министерства обороны РФ, Москва
КАЛЯГИН Ю.С.	Центральная химико-токсикологическая лаборатория ММА им. И.М. Сеченова

Представлены материалы о методах диагностики психоактивных веществ (ПАВ) в биологических средах человека. Показан предложенный к реализации в системе Минздравсоцразвития России принцип унификации методов и их отбора на основе научных критериев для повсеместного применения в области аналитической токсикологии (диагностики) наркотических и других ПАВ. Указан ряд недостатков исследований с применением "тест-полосок". Описана целесообразность проведения предварительного тестирования на предмет употребления ПАВ скрининговыми лабораторными методами в условиях химико-токсикологической лаборатории (ХТЛ), в том числе для организации качественного мониторинга ситуации с потреблением наркотиков в стране.

Как за рубежом, так и в Российской Федерации разрабатываются и внедряются в медицинскую практику разнообразные методы (программы) диагностики ПАВ в биологических средах человека. Обилие методических вариантов, предлагаемых различными производителями, породило разноречивые результаты определения даже одних и тех же веществ. В связи с этим, в области аналитической токсикологии (диагностики) наркотических и других ПАВ, предложен и реализуется в системе Минздравсоцразвития России принцип унификации методов и их отбора на основе научных, технических, экономических критериев и их рекомендаций для повсеместного применения.

Необходимо отметить, что выявление факта немедицинского употребления наркотических веществ (в организме человека) является медицинским вмешательством и рассматривается как один из видов медицинского освидетельствования. Медицинское освидетельствование должно проводиться исключительно в профильных медицинских учреждениях системы Минздравсоцразвития России и может быть добровольным¹ и принудительным². Закрепление результатов медицинского освидетельствования должно иметь установленную форму (№ 454/у)³.

На современном этапе наркологической службой Росздрава РФ при проведении медицинского освидетельствования проводятся предварительные диагностические исследования скрининговыми методами экспресс-диагностики (иммуноферментного анализа — ИФА, тонкослойной хроматографии — ТСХ и др.), проводимые в ХТЛ. Деятельность ХТЛ определена Приказом Минздравсоцразвития России от 27.01.2006 г. № 40 "Об организации

проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ".

В настоящее время также предлагаются внелабораторные (внешние) средства и способы проведения медицинского освидетельствования. К таким внелабораторным предварительным средствам экспресс-диагностики относятся так называемые тест-полоски — скрининговый иммуноферментный метод, с помощью которого повсеместно рекомендуется не только осуществлять мониторинг наркологической ситуации в стране, но и планировать профилактические мероприятия.

Однако существует ряд недостатков исследований с применением "тест-полосок":

1) высокая возможность фальсификации результатов исследования мочи: это различные добавки к моче (разработанные для случаев возможного внезапного тестирования), растворимый газированный напиток "Clear Choice" (эффективен в течение 5 ч, содержит комплекс витаминов группы B и креатинин), порошок "Сухая моча", "Ваниш", таблетки "Пергидроль" и т.д.;

2) недостоверность исследования (низкая специфичность и отсутствие надежного качества):

- "тест-полоски" могут указывать только на возможное содержание в организме тестируемого лица определенных групп наркосодержащих соединений (и их метаболитов) без определения его конкретного вида и количества, в связи с чем требуется проведение химико-токсикологического исследования (с вынесением заключения по форме № 454/у);

¹ Ст. 32 Основ законодательства РФ об охране здоровья граждан от 22.07.1993 г. № 5487-1; ч. 5 ст. 213 Трудового кодекса РФ.

² Ст. 44 Федерального закона от 8 января 1998 г. № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах»; ст. 29 и 32 Закона РФ от 02.07.1992 г. № 3185-1 «О психиатрической помощи и гарантиях прав граждан при ее оказании»; ст. 18, п. «Г» ч. 1 ст. 47, ст. 116 УИК РФ, ст. 24 Федерального закона от 15.07.1995 г. № 103-ФЗ «О содержании под стражей подозреваемых и обвиняемых в совершении преступления», Приказ Минюста от 03.08.2001 г. № 229; ст. 21.1, 27.12 и др. Кодекс Административных правонарушений (КоАП РФ).

³ Приказ Минздравсоцразвития России от 27.01.2006 г. № 40 "Об организации проведения химико-токсикологических исследований при аналитической диагностике наличия в организме человека алкоголя, наркотических средств, психотропных и других токсических веществ".

- экспресс-диагностика выявляет возможного "потребителя" преимущественно на ранней стадии и (или) в течение 1—2 дней с момента последней наркотизации;

- результат может быть как ложноотрицательным, так и ложноположительным, что является одной из основных проблем аналитической диагностики наркотических средств и психотропных веществ — правильная интерпретация результатов (является ли результат истинным: истинноположительным или истинноотрицательным);

3) использование предварительных диагностических средств (иммунохроматографические тесты или так называемые тест-полоски), предлагаемых в настоящее время различными фирмами⁴, нормативными правовыми актами не урегулировано. Отсутствует порядок такого тестирования (утвержденного Минздравсоцразвития России).

Поэтому целесообразнее проводить предварительное тестирование на предмет употребления ПАВ скрининговыми лабораторными методами, чтобы полученные результаты тест-полосок не отправлять для подтверждения на лабораторное исследование в ХТЛ (в ХТЛ выявляют разовое употребление в течение 30 последних дней и более). Двойное (повторное исследование) при наличии ХТЛ является экономически нецелесообразным⁵.

20-летний европейский опыт позволяет использовать тест-полоски только в качестве самоконтроля, но с учетом требований Приказа № 40 Минздравсоцразвития России от 27.01.2006 г., необходима также последующая диагностика результатов таких предварительных исследований в ХТЛ⁶.

**Предварительные (скрининг) методы,
не требующие пробоподготовки.
Методы иммунного анализа**

Для скринингового поиска ПАВ в лабораторных условиях все шире используются различные варианты иммуноанализа [6]. Основу иммунохимического анализа составляют иммунологические принципы, а именно способность антител образовывать прочные высокоспецифичные комплексы с определенными антигенами (гаптенами). Реакции между меченым антигеном, немеченым антигеном (например, соединениями опиной группы) и антителами проходят конкурентно, пропорционально концентрациям компонентов реакционной смеси. Реакция антиген—антитело проходит в строго количественном соотношении и используется в анализе для определения одного из этих реагентов. Измеряя количество меченых антигенов, прореагировавших или не прореагировавших с антителами, зная кинетику процесса иммунной реакции, можно рассчитать количество немеченых антигенов, т.е. искомого анализируемого вещества. В зависимости от природы применяемой метки и способа ее детектирования существует несколько видов иммунохимического анализа. Иммунохимические методы просты и высокочувствительны, не требуют дополнительной очистки

или обогащения исследуемых образцов, удобны при выполнении серийных анализов, особенно при работе с готовыми промышленными наборами реагентов. Все это позволяет отдавать им предпочтение при рутинной работе. Отличительной особенностью иммунохимических методов является их способность открывать как нативные соединения (например, морфин, кодеин), так и их метаболиты (например, 3β-морфинаглукуронид), т.е. методы позволяют определять групповую принадлежность ПАВ и их суммарное количество. Вместе с тем, не исключается возможность ложноположительного результата, т.е. из-за перекрестного реагирования (CR), когда могут быть открыты не только вещества, имеющие подобную химическую структуру, но и вещества, отличающиеся по химической структуре, однако в количествах на 2—3 порядка больше, чем исследуемая группа. При тестировании образцов мочи с содержанием на 25% ниже или выше установленного порога обнаружения в небольшом числе случаев получают нечеткие результаты (категория "неподтвержденных" образцов). Поэтому для исключения ошибок после получения положительного результата при исследовании на наркотические средства требуется провести подтверждающий анализ любым более специфичным методом (преимущественно хромато-масс-спектрометрией). В случае отрицательного ответа вследствие высокой чувствительности дальнейший анализ проводить нецелесообразно [1, 4].

Выбор того или иного иммунохимического метода для проведения химико-токсикологических исследований зависит от задач исследования, экономических возможностей, оснащенности лаборатории.

В России для анализа на наркотические средства группы опиатов более широко используются различные варианты гетерогенного иммуноферментного анализа, иммунохроматографический метод и поляризационный флуороиммуноанализ.

Для скринингового поиска наркотических средств во внелабораторных условиях иногда рекомендуется использовать иммунохроматографические тесты, но обязательно необходимо подтверждать результат такого теста в химико-токсикологической лаборатории. Иммунохроматографический тест представляет собой устройство, в котором наркотик, находящийся в образце, конкурирует с родственным веществом, иммобилизованным на мембране стрип-полоски, за возможность связывания с ограниченным количеством антител. В лабораторно-клинических условиях рекомендуется использовать инструментальные иммунохимические методы анализа, такие, как поляризационный флуороиммуноанализ, твердофазный гетерогенный иммуноферментный метод анализа, которые выгодно отличаются от других методов рядом преимуществ (чувствительность, специфичность и т.д.). Используемые при этом стандартное оборудование и реактивы существенно повышают надежность экспресс-диагностики, а полученные количественные результаты при исследовании позволяют проводить более рационально дальнейший выбор схемы исследований с учетом аналитических возможностей лабораторий.

⁴ В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы 9 фирм по производству тест-полосок, перечень которых утвержден Письмом Минздравсоцразвития России от 12.05.2004 г. № 10-04/6. В основном "полуфабрикаты" для производства тестов закупаются за рубежом, в России происходит их упаковка и в лучшем случае доведение до завершающего этапа изготовления (так как отсутствуют высокотехнологические иммунные лаборатории, виварии и т.д.).

⁵ Пример: в Московской области было протестировано более 80 тыс. учащихся (затрачено большое количество средств), при этом выявлено всего 90 положительных тестов, которые, в свою очередь, требуют подтверждения в ХТЛ.

⁶ Пример: гинекологи, гепатологи используют тест-полоски, но для избегания риска недостоверной диагностики результаты отправляют для исследования в лабораторию для дальнейшего сравнения с полученными данными при тестировании "полосками".

Подтверждающие методы определения наркотиков в биологических жидкостях

В качестве подтверждающих используют высокочувствительные и селективные методы, обеспечивающие определение морфина в моче с пределом обнаружения 10–15 нг/мл и ниже. Наилучшим, безусловно, является метод хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС), также применяются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и, в меньшей степени, газожидкостная хроматография (ГЖХ).

Все методы требуют введения в анализируемую пробу мочи внутреннего стандарта. В качестве внутренних стандартов используют соединения, близкие анализируемым веществам по структуре, выходящие на хроматограмме в непосредственной близости к анализируемым и вместе с тем не мешающие их определению. Практически, внутренний стандарт определяют на основании наибольшего соответствия строения и свойств анализируемому соединению. Наилучшим выбором для ГХ/МС-анализа являются дейтерированные опиаты: морфин, кодеин, 6-МAM, диацетилморфин. Можно использовать синтетические опиаты, имеющие химическую структуру, подобную морфину, например налорфин [7], молекула которого отличается от молекулы морфина только длиной алкильного радикала у атома азота. При анализе морфина методом ВЭЖХ рекомендован 1,α-ацетилметадол [13], а при анализе сухих проб без экстракции — длинноцепочечные нормальные алканы [11, 12]. Внутренний стандарт добавляют в исследуемый образец (мочу) на начальной стадии пробоподготовки с тем, чтобы ВС подвергался тем же воздействиям, что и анализируемый компонент.

Газожидкостная хроматография

Это хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы используется газ; неподвижная фаза представляет собой инертный материал, покрытый нелетучей жидкостью, которым заполняется колонка. Исследуемые вещества продвигаются с газом-носителем по колонке. После выхода из колонки вещества попадают в детектор; электрический (или какой-либо другой) сигнал которого пропорционален количеству анализируемого вещества в токе газа-носителя. В качестве детекторов в газожидкостной хроматографии могут быть использованы: пламенно-ионизационный детектор, детектор захвата электронов, полярографический, дифференциальный рефрактометр, детектор флуоресценции, детектор электропроводности, масс-спектрометр, электрохимический, ультрафиолетовый, микроабсорбционный.

При использовании ГЖХ-анализа в качестве подтверждающего при обнаружении или количественном определении опиатов разделение проводят, как правило, на кварцевых капиллярных колонках с неполярными или слабополярными стационарными фазами и реже — на набивных колонках, также с неполярными (типа SE-30 или OV-1) и среднеполярными фазами (типа OV-17).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Идентификация исследуемых веществ на так называемом ВЭЖХ-анализаторе обусловлена унифицированной методикой пробоподготовки биологических жидкостей, едиными условиями хроматографического анализа раз-

личных групп соединений и прикладной программой поиска, содержащей базу данных, которая включает временна удерживания и спектральные характеристики исследуемых веществ, обеспечивая высокую надежность получаемых результатов.

Основным преимуществом ВЭЖХ как метода анализа опиатов в биожидкостях является возможность определять глюкурониды морфина, являющиеся основными метаболитами морфина и героина, и таким образом исключить стадию гидролиза при подготовке пробы, а в случае использования предколонки — и методы извлечения.

Хромато-масс-спектрометрия

Метод ГХ/МС в варианте масс-спектрометрии электронного удара широко используется для идентификации и количественного определения опиатов. ГХ/МС является хроматографическим методом⁷ подтверждения первоначального результата, призванным выдать заключение, принимаемое к рассмотрению судебными инстанциями. Наиболее часто применяют хроматографы с масс-селективным детектором (МСД) фирмы "Хьюлетт-Паккард" (Hewlett-Packard).

Как показал анализ литературных данных, наличие психоактивных веществ в биообъектах является диагностическим показателем и может использоваться в совокупности с другими при установлении факта немедицинского употребления наркотических средств опиоидной группы, а также частично — при установлении степени опьянения и динамики злоупотребления ими. Эффективность предложенных методик анализа определяется возможностью их рационального выбора от стадии пробоподготовки объекта до выбора схемы анализа в зависимости от поставленных задач исследования. Все это позволяет в значительной степени усовершенствовать диагностику наркотической зависимости, особенно при решении вопросов наркологической экспертизы. Методы могут быть использованы в решении задач химико-токсикологического исследования наркотиков в биологических средах.

Большинство субъектов Российской Федерации испытывает сложности из-за отсутствия общелaborаторного оборудования для пробоподготовки, что, в свою очередь, осложняет завершение процедуры предварительной экспертно-диагностической работы, в том числе и с применением тест-полосок. Отсутствие достаточного количества ХТЛ в России является прямым фактором для повсеместного внедрения "простых, недостоверных средств и способов тестирования".

В настоящее время функционируют ХТЛ только в 45 субъектах Федерации, и к 2009 г. планируется завершить оснащение всех государственных наркологических диспансеров необходимым лабораторным оборудованием (предусмотрено открытие к 2009 г. еще 44 ХТЛ) по ФЦП "Комплексные меры противодействия злоупотреблению наркотиками и их незаконному обороту на 2005–2009 гг."

⁷ Хроматографические методы — совокупность методов разделения и анализа смесей веществ, основанных на различном распределении компонентов между подвижной (газ или жидкость) и неподвижной (жидкость, твердый сорбент или их смесь) фазами. Компоненты образца движутся через хроматографическую систему только тогда, когда они находятся в подвижной фазе. В соответствии с типом подвижной и неподвижной фаз различают газовую хроматографию (подвижная фаза — газ), газожидкостную (подвижная фаза — газ, неподвижная — жидкость), жидкостную (обе фазы жидкости).

В сложившейся ситуации очень важными, являются также:

- организация средств доставки (экспресс-почты) исследуемого материала из отдаленного региона в ближайшую ХТЛ;⁸
- обязательное тестирование "тест-полосок" (введение сертификата качества);
- организация системы отбора и подбор квалифицированного персонала, а также его обучение.

Тот факт, что все 89 субъектов Российской Федерации будут оснащены единым комплектом лабораторного оборудования для исследований и пробоподготовки, это позволит унифицировать процедуру проведения анализа на наличие наркотиков в организме человека и обеспечит

сопоставимость получаемых результатов по всей стране, даст возможность обеспечения контроля за качеством лабораторных исследований по единой методике, позволит организовать обучение по единой программе всех специалистов лабораторий, снизит ежегодные затраты на последипломную подготовку специалистов этой области

Таким образом, все это будет способствовать более полному удовлетворению потребности в медицинском освидетельствовании на предмет установления факта употребления наркотиков, повышению выявления случаев немедицинского потребления наркотиков, улучшению диагностики наркоманий на ранней стадии и проведению качественного мониторинга наркологической ситуации в стране.

Список литературы

1. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики. Действие. Свойства. Метаболизм. — М.: Триада, 2000.
2. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. — М.: Мысль, 1993. — С. 105—122.
3. Руководство по современной тонкослойной хроматографии. Научный Совет РАН по хроматографии, 1994. Материалы школы-семинара по ТСХ. — М., 1993.
4. Тернон М., Банхем Д.Р., Колкотт К.А. и др. Новые методы иммуноанализа/ Пер.с англ. Под ред. У.П. Коллинза. — М.: Мир, 1991. — С. 5, 145.
5. Фланаган Р. Дж., Брейтуэйт Р.А., Браун С.С., Уиддон Б., де Вольф Ф.А. Основы аналитической токсикологии// ВОЗ, Программа ООН по окружающей среде, Международная организация труда. — Женева, 1997.
6. Bogusz M.J., Maier R.-D., Schiwy-Bochat K.-H., Kohls U. // J. Chromatogr. B. — 1996. — Vol. 683. — P. 177—188.
7. Bowie L.J., Kirkpatrick P.B. // J. Analyt. Toxicol. — 1989. — Vol. 13. — P. 326—329.
8. Foltz R.L., Fentiman A.F., Foltz R.B. // GC/MS Assays for abused drugs in body fluids. — NIDA Research monograph series, — 1980. — Vol. 32. — P. 110—127.
9. Maurer H.H. Methods. Experimental Section/ Pflieger K., Maurer H.H., Weber A. Mass-Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites: Second, revised and enlarged edition, part 1. — Weinheim, New-York — Basel — Cambridge, 1992. — P. 5—9.
10. Pflieger K., Maurer H.H., Weber A. Mass-Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites: Second, revised and enlarged edition. Weinheim, New-York — Basel — Cambridge, 1992.
11. Recommended methods for testing heroin: Manual for use by national narcotics laboratories. — United Nations, New York. Division of Narcotic Drugs. Vienna, 1986.
12. Recommended methods for testing opium/crude morphine: Manual for use by national narcotics laboratories. United Nations, New York. Division of Narcotic Drugs. — Vienna, 1987.
13. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens: Manual for use by National laboratories. United Nations International drug control program. United Nations. N. Y., 1995.

METHODS OF CHEMICAL-TOXICOLOGICAL DIAGNOSTICS IN MONITORING OF DRUG ADDICTION SITUATION IN RUSSIA

IZOTOV B.N.

Dr.med.sci., professor, head of the Analytical Chemistry and Forensic Toxicology Department, Moscow Medical Academy by I.M. Sechenov, Moscow

KOZLOV A.A.

Ph.D., Medical Department of Federation State Service of Narcotraffic Control, Moscow

DIDENKO E.S.

deputy chief of Medical Department of Federation State Service of Narcotraffic Control, Moscow

KALYAGIN YU.S.

psychologist, Russian Academy of State Service at President of Russian Federation, Moscow

POLUNINA A.G.

Ph.D., neurologist, Moscow Research Practical Center of Narcology, Moscow

This article presents data on methods of diagnostics of psychoactive drugs in human biological liquids. We demonstrate a principle of unification and selection of methods according to scientific criteria for widespread application in the field of analytical toxicology of illicit and other psychoactive drugs, which was introduced by Ministry of Health and Social Development of Russia. Limitations of toxicological diagnostics using test-strips are discussed. Indications for preliminary testing of psychoactive drugs by screening laboratory methods at chemical-toxicological laboratory including organization of monitoring drug addiction situation in Russia are presented.

⁸ Экспресс-доставка разработана профессором Изотовым Б.Н. — заведующим кафедрой аналитической и судебно-медицинской токсикологии и Центральной химико-токсикологической лабораторией ММА им. И.М. Сеченова.