



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
НАУК О ЖИЗНИ

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет);
ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи
им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Определение алкалоидов иервина, протовератрина А, протовератрина В в биологических жидкостях при отравлениях чемерицей методом ВЭЖХ-МС/МС

Мельник Елизавета Валерьевна, к.ф.н.

Белова Мария Владимировна, д.б.н.

Тюрин Игорь Александрович

Раменская Галина Владиславовна, д.ф.н.

Москва, 2021

Актуальность темы исследования

- Род Чемерица (*Veratrum*, сем. Лилейные (*Liliaceae*)) насчитывает до 45 видов
- Различные представители распространены в большей части Северного полушария (Европа, вся территория РФ, Китай, Япония и Корея, Северная Америка)
- Все части растения содержат токсичные алкалоиды
- Употребление внутрь приводит к острому отравлению (в редких случаях – к летальному)
- Во всем мире отравления алкалоидами чемерицы носят случайный характер
- В РФ отравления обусловлены приемом в состоянии алкогольного опьянения, приемом с целью (само)лечения алкоголизма, ошибочным приемом, а также попыткой суицида

Актуальность темы исследования

- Чемерица Лобеля (*Veratrum Lobelianum Bernh.*) разрешена для использования в фармацевтической практике (ФС.2.5.0104.18 «Чемерицы Лобеля корневища с корнями», ГФ XIV)
- Из данного ЛРС производят лекарственный препарат (ЛП) «Чемеричная вода» (ЧВ)
- Чемеричная вода применяется наружно в качестве противопаразитарного средства
- Употребление внутрь приводит к острому отравлению вследствие содержания токсичных алкалоидов
- Постановка диагноза отравления алкалоидами чемерицы в основном проводится на основании анамнестических данных и клинической картины



Корневища с корнями чемерицы Лобеля



Чемеричная вода



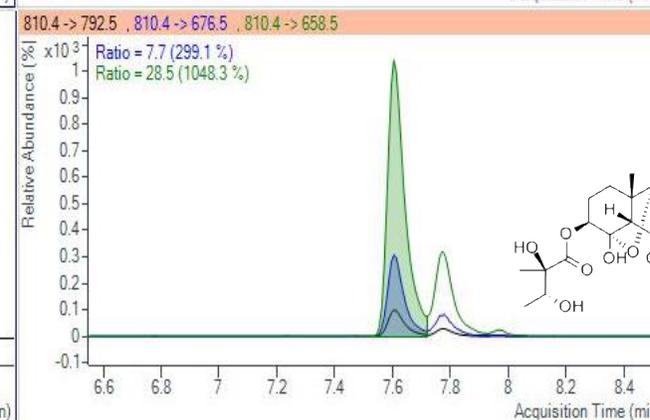
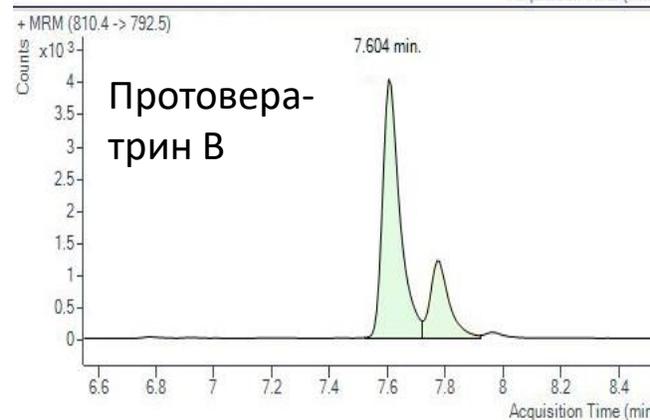
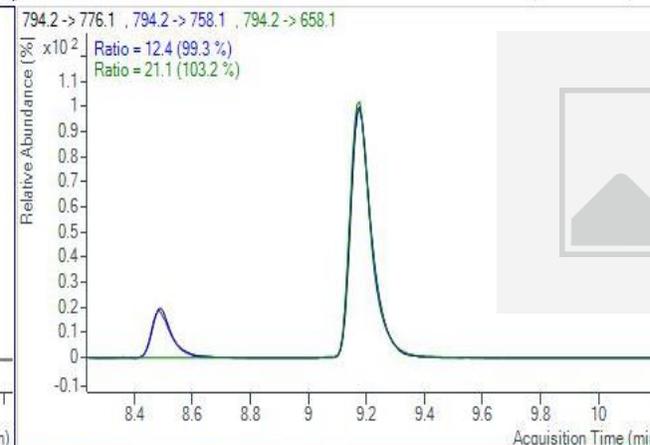
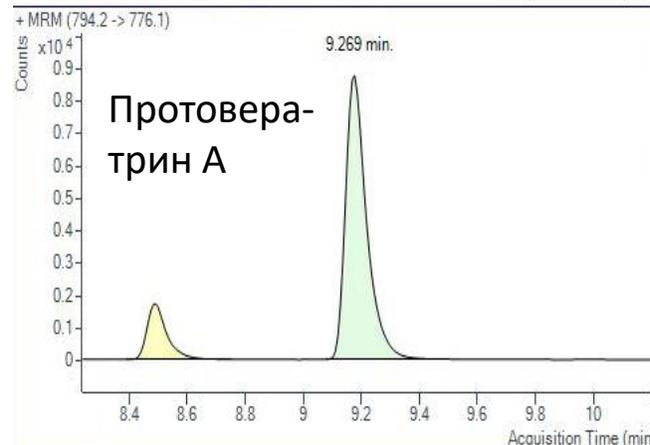
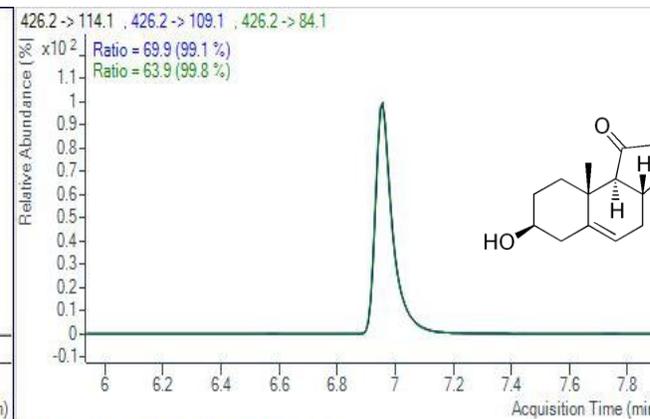
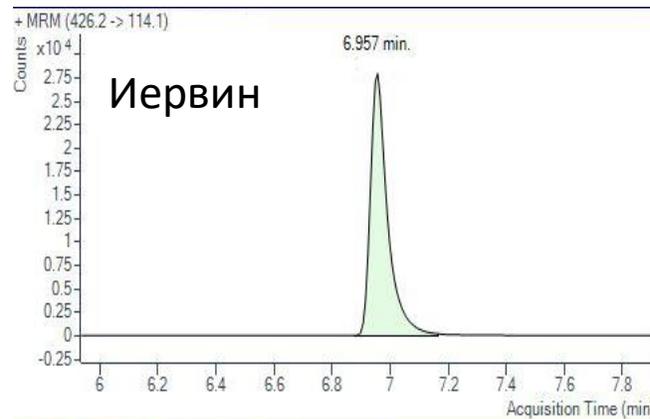
Цель исследования

Разработка и валидация высокочувствительной методики определения алкалоидов чемерицы в биологических жидкостях человека (плазма крови, моча) методом ВЭЖХ-МС/МС с последующей апробацией методики на биологических образцах, полученных от пациентов с отравлениями чемерицей



Разработка методики определения алкалоидов чемерицы методом ВЭЖХ-МС/МС

- В составе ЧВ (разбавление 1:10) были идентифицированы иервин, протOVERATрин А и протOVERATрин В
- Вератридин, цевадин, псевдоиервин, вератрозин и вератрамин обнаружены не были
- Хинидин был выбран в качестве внутреннего стандарта (ВС)



Хроматограммы основных алкалоидов чемерицы в составе ЧВ



Условия ВЭЖХ-МС/МС анализа

- Подвижная фаза: элюент А (5 мМ формиат аммония в 0,1% муравьиной кислоте в воде) и элюент В (0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле),
- неподвижная фаза: Agilent Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 100 мм, 2,7 мкм),
- скорость потока – 0,8 мл/мин,
- температура термостата колонки – 45°С,
- объем вводимой пробы – 2 мкл;
- общее время хроматографирования – 14 минут.

Параметры МС/МС детектирования

Аналит	Ион-прекурсор (m/z)	Напряжение фрагментатора (В)	Дочерние ионы (m/z)	Энергия соударений (В)
Иервин	426,2	217	114,1/ 109,1/ 84,1	36/ 36/ 44
Протовератрин А	794,2	250	776,1/ 758,1/ 658,1	44/ 44/ 56
Протовератрин В	810,4	190	792,5/ 676,5/ 658,5	40/ 70/ 60
Хинидин (ВС)	325,2	164	172,0/ 160,0/ 81,2	36/ 28/ 36

Режим градиентного элюирования

Время, мин.	Элюент А, %	Элюент В, %
0:00	90	10
1:00	90	10
1:10	75	25
1:50	75	25
9:50	50	50
9:60	10	90
11:00	10	90
11:10	90	10
14:00	90	10



Пробоподготовка образцов плазмы крови и мочи

500 мкл биологического образца (плазма крови /моча) вносили в стеклянный флакон объемом 4 мл. Во флакон добавляли 25 мкл рабочего раствора ВС, доводили рН до 10 аммония гидроксидом и вносили 1 мл метил-трет-бутилового эфира (МТВЕ). Полученную смесь встряхивали на шейкере 10 мин, затем центрифугировали при 3500 об/мин 10 мин. Органический слой отбирали, переливали в виалу для хроматографирования и упаривали в токе азота при комнатной температуре. Полученный сухой остаток реконструировали в 200 мкл ацетонитрила и переносили в стеклянную вставку.



Валидация методики количественного определения иервина и протOVERATРИНА А в плазме крови и моче

Валидацию разработанной методики проводили согласно следующим руководствам:

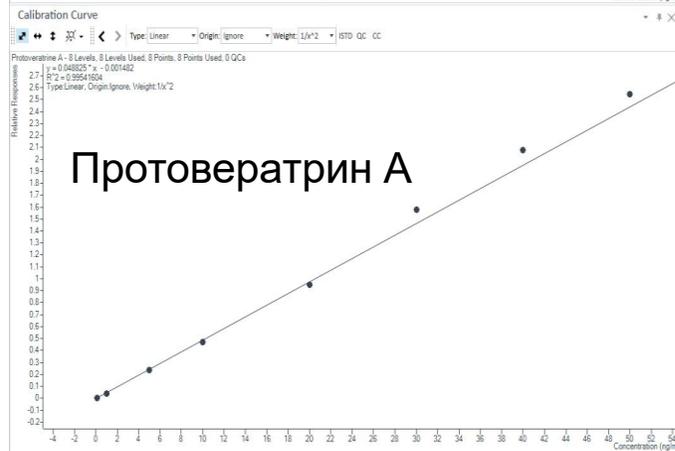
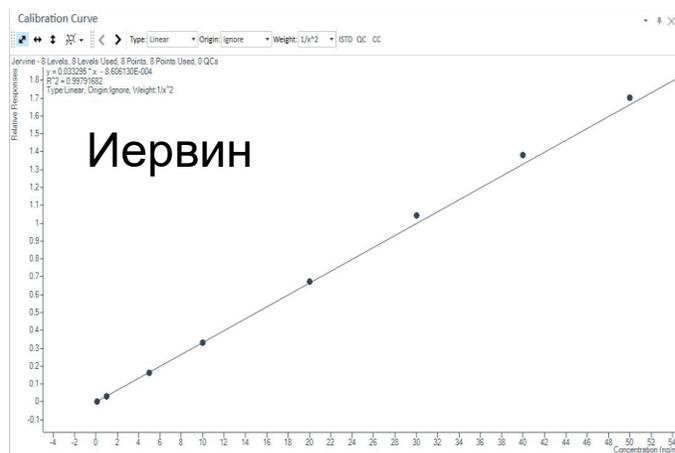
- Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018.
- Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала / М.: Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Российский Центр Судебно-Медицинской Экспертизы» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 2014. 52 с.

Оценивались следующие параметры: селективность; нижний предел количественного определения (НПКО); линейность; перенос пробы; точность; прецизионность; эффект матрицы; степень извлечения; стабильность.

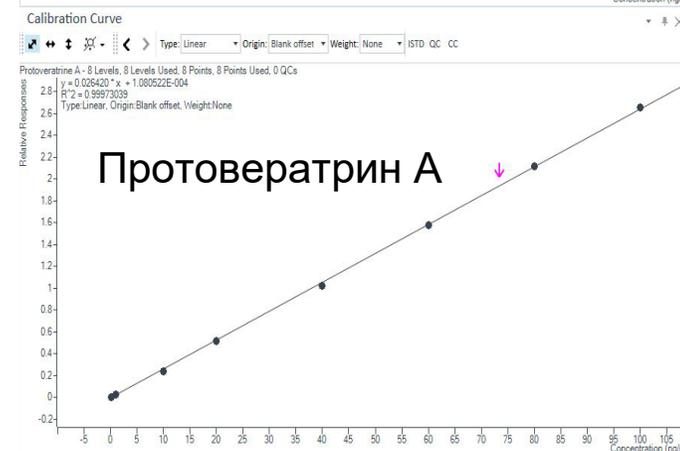
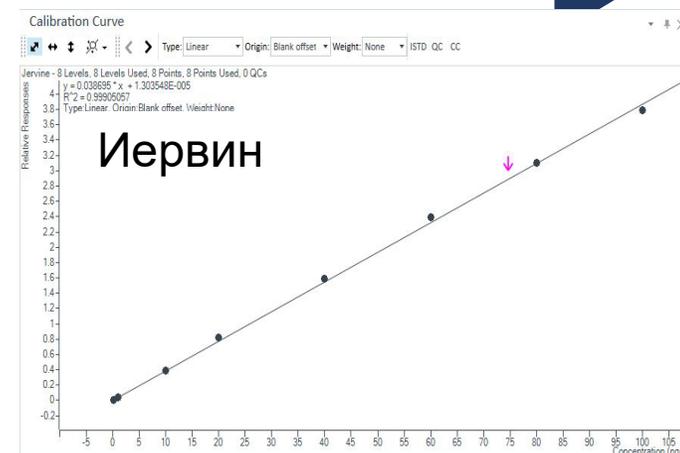


Валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче

- Селективность была подтверждена путем сравнения хроматограмм образцов интактной биологической матрицы (плазмы крови и мочи) с хроматограммами образцов, содержащих иервин и протовератрин А на уровне НПКО методики
- Линейность оценивалась в диапазоне определяемых концентраций иервина и протовератрина А **0,1 – 50 нг/мл** (плазма крови), **0,1 – 100 нг/мл** (моча)



Плазма крови



Моча



Валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче

- НПКО составил 0,1 нг/мл для двух аналитов в обеих матрицах
- Перенос пробы отсутствовал
- Показатели точности и прецизионности соответствовали критериям приемлемости:

Плазма крови

Аналит	Концентрация номинальная, нг/мл	Внутри серии (n=5)		Между сериями (n=15)	
		E, %	RSD, %	E, %	RSD, %
Иервин	0,1	1,2	5,7	4,0	10,4
	0,3	-9,7	7,9	-6,4	8,9
	25,0	2,8	9,9	3,2	7,3
	37,5	4,8	3,2	2,9	6,0
Протовератрин А	0,1	2,6	4,6	5,1	6,8
	0,3	-6,8	8,2	-5,5	10,2
	25,0	8,3	4,9	5,2	6,4
	37,5	-1,3	5,5	1,3	7,0

Моча

Аналит	Концентрация номинальная, нг/мл	Внутри серии (n=5)		Между сериями (n=15)	
		E, %	RSD, %	E, %	RSD, %
Иервин	0,1	-6,0	8,5	-2,9	12,0
	0,3	-7,6	8,1	-4,3	9,6
	50,0	4,5	5,9	2,6	5,1
	75,0	6,2	3,9	3,8	4,1
Протовератрин А	0,1	-10,5	7,4	-7,8	10,3
	0,3	-9,7	3,7	-4,7	9,9
	50,0	1,8	4,4	0,2	5,0
	75,0	3,4	5,7	4,1	6,7



Валидация методики количественного определения иервина и протовератрина А в плазме крови и моче

- НПКО составил 0,1 нг/мл для двух аналитов в обеих матрицах
- Перенос пробы отсутствовал
- Показатели точности и прецизионности соответствовали критериям приемлемости
- Степень извлечения из плазмы крови составила $65,2 \pm 0,5\%$ (иервин) и $56,3 \pm 4,2\%$ (протовератрин А), из мочи – $54,9 \pm 0,8\%$ (иервин) и $67,8 \pm 2,9\%$ (протовератрин А)
- Значения матричного эффекта в плазме крови составили $95,8 \pm 2,1\%$ (иервин) и $94,1 \pm 2,8\%$ (протовератрин А), в моче – $100,0 \pm 0,4\%$ (иервин) и $101,1 \pm 0,8\%$ (протовератрин А)
- Была подтверждена стабильность аналитов в обеих биологических матрицах при условиях хранения в течение 6 часов при комнатной температуре, в течение 8 часов после завершения стадии пробоподготовки в автосамплере, при температуре -20°C в течение 4 недель, после 3 циклов замораживания и размораживания



Апробация валидированной методики

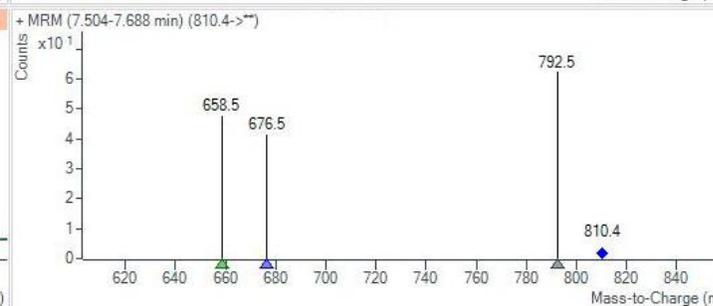
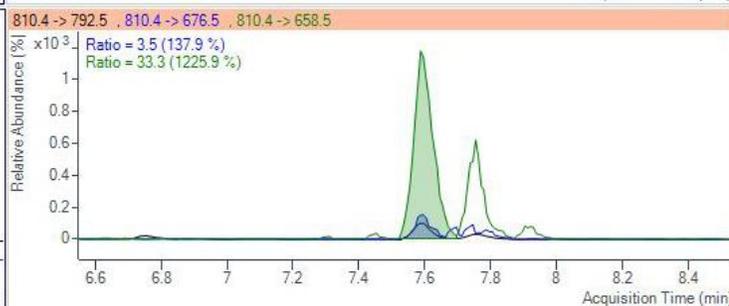
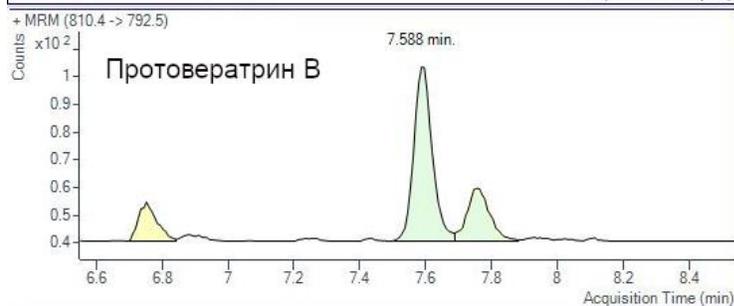
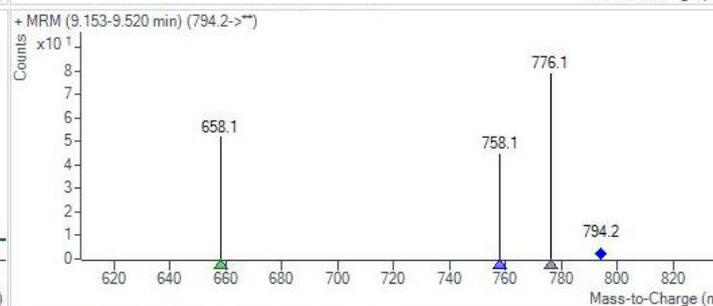
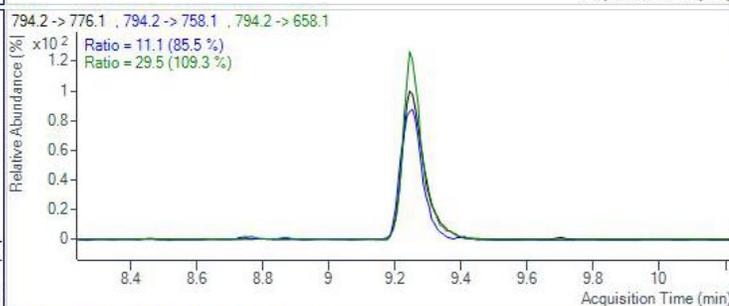
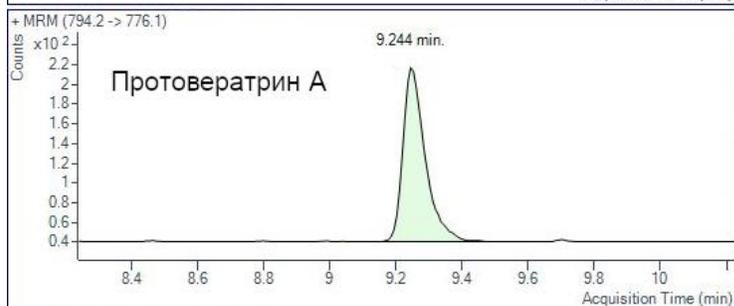
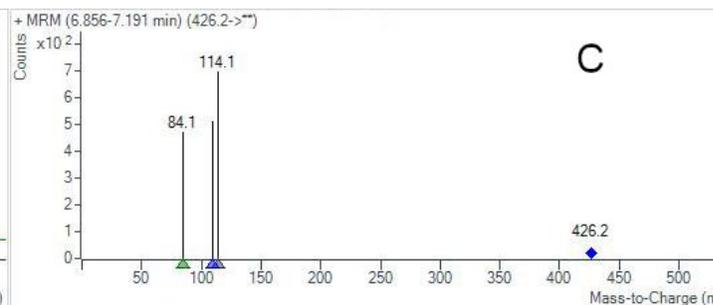
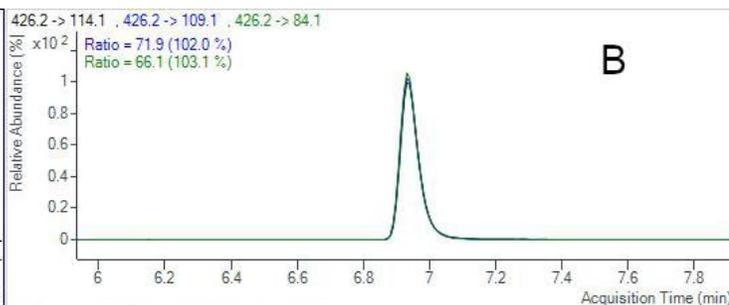
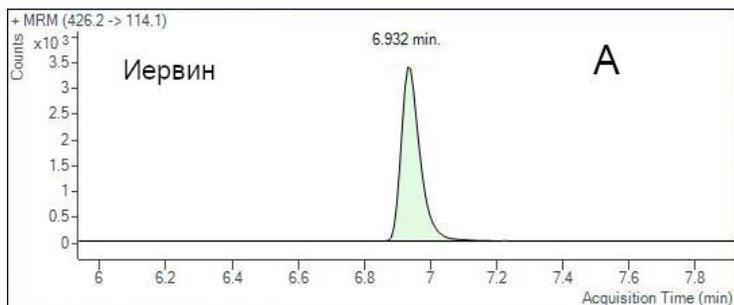
(8 случаев острого
отравления
алкалоидами чемерицы
в г. Москве)

	Возраст	Пол	Наличие этанола в биосредах	Предполагаемая причина приема
Пациент №1	20	М	нет	суицид
Пациент №2	47	М	да	состояние алкогольного опьянения
Пациент №3	45	Ж	да	состояние алкогольного опьянения
Пациент №4	74	Ж	нет	ошибочный прием
Пациент №5	46	М	да	состояние алкогольного опьянения
Пациент №6	56	М	да	состояние алкогольного опьянения
Пациент №7	8	М	нет	ошибочный прием
Пациент №8	35	Ж		

За период с октября 2020 года по февраль 2021 года



Инструментальное подтверждение всех случаев отравления



Хроматограмма алкалоидов чемерицы в образце плазмы крови одного из пациентов



Концентрации иервина и протовератрина А в образцах плазмы крови и мочи пациентов

	Иервин, нг/мл					Протовератрин А, нг/мл				
	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч
Пациент 1	0,52	0,14				0,20	0			
Пациент 2	0,35	0,10	0			0,11	0	0		
Пациент 3	5,01	0,72	0,48	0,33	0,18	0,67	0	0	0	0
Пациент 4	0,10	0				0	0			
Пациент 5	0,15	0				0,1	0			
Пациент 6	0,11					0				
Пациент 8	0,13					0,12				

Плазма крови

	Иервин, нг/мл					Протовератрин А, нг/мл				
	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч	При поступлении	24 ч	36 ч	48 ч	60 ч
Пациент 1	0,58	9,55				37,70	1,01			
Пациент 2	0,24	1,15	0			6,13	8,14	0,19		
Пациент 3	1,71	5,19	1,85	1,07	0,23	4,87	2,81	0,87	0,46	0
Пациент 4	0,23	0,10				0,15	0			
Пациент 5	0,21	1,47				11,96	1,66			
Пациент 6	0,46					0,13				
Пациент 7	0,37					54,41				
Пациент 8	1,39					52,16				

Моча

Возможность применения методики для проведения судебно-химической экспертизы

- Публикация Gaillard et al. (doi 10.1093/jat/25.6.481): в образцах крови двух трупов были обнаружены вератридин (0,17 нг/мл, 0,4 нг/мл) и цевадин (0,32 нг/мл, 0,48 нг/мл)
- Разработанная и валидированная методика может быть предложена для целей судебно-химического анализа вследствие высокой чувствительности
- Однако требуется проведение отдельной процедуры валидации методики



Спасибо за внимание!

