

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
(Минздрав России)

**Федеральное медико-биологическое агентство  
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

**ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ  
ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ  
НА ПРЕДМЕТ ВЫЯВЛЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ  
ПОЛИПЕПТИДНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Методические рекомендации  
МР ФМБА России 12.08-14

**Москва 2014**

## ПРЕДИСЛОВИЕ

1 Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н. Е.Ю. Бонитенко,  
заместитель директора – д.м.н. М.Б. Иванов.

2 Исполнители: к.х.н. И.К. Журкович, д.х.н. Б.Л. Мильман, к.х.н. А.О.Руденко, Н.В. Луговкина, В.Д. Гладилович, В.В. Человечкова, И.А. Меркушева.

3 В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:  
– от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»;

– от 30.03.1999 г. №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– от 21.12.1994 № 68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

4 Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агенством «25» февраля 2014 года.

5 Введены впервые.

**СОДЕРЖАНИЕ**

ПРЕДИСЛОВИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
1 Область применения	6
2 Нормативные ссылки	7
3 Обозначения и сокращения	7
4 Описание метода	7
4.1 Материально-техническое обеспечение	7
4.2 Основные этапы выполнения экспертизы	9
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	18
ПРИЛОЖЕНИЕ А Наиболее распространенные и (или) токсичные циклопептиды. Массы ионов	19
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Основные характеристики библиотеки масс-спектров	22
ПРИЛОЖЕНИЕ В Библиотека масс-спектров токсичных пептидов и родственных соединений	24
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Пример идентификации микроцистина-LR в водном экстракте культуры <i>Microcystis aeruginosa</i>	52

## ВВЕДЕНИЕ

В биоорганическом анализе значительное место занимает определение токсичных циклических пептидов. Среди них особое внимание уделяется двум классам: циклическим гепта- и октапептидам, продуцируемым некоторыми видами грибов рода *Amanita*, и гептапептидам – микроцистинам токсичных метаболитов цианобактерий (сине-зеленых водорослей).

Актуальность первой из аналитических задач определяется частыми отравлениями грибами. Основной причиной смертельных отравлений (90-95% случаев) является употребление грибов рода *Amanita* (*A. Phalloides* и *A. Virosa*). Эти виды макромицетов продуцируют множество циклических пептидов, среди которых наиболее токсичными являются фалло- и аматоксины: фаллоидин,  $\alpha$ -аманитин и  $\beta$ -аманитин. Методики определения указанных соединений необходимы при проведении клинических и экспертных исследований биологических жидкостей (кровь, моча).

Актуальность исследований токсичных цианобактериальных пептидов обусловлена риском потребления зараженной питьевой воды, представляющей угрозу для здоровья человека и животных. В настоящее время обнаружено не менее 300 соединений этого класса, однако идентифицировано всего 89 микроцистинов. Наиболее распространенным и токсичным в гидросфере является микроцистин-LR (рисунок 1), однако близкими характеристиками токсичности обладают и некоторые другие, хотя и не все, соединения этого класса. Это обстоятельство определяет важность правильной идентификации индивидуальных микроцистинов.

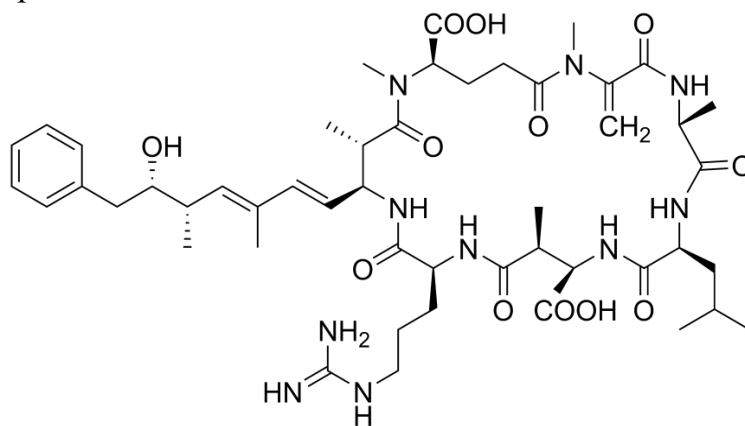


Рисунок 1 – Структура микроцистина-LR

В настоящем проекте методических рекомендаций описаны этапы химико-аналитической экспертизы, имеющей своей основной целью обнаружение токсичных циклических пептидов и идентификацию токсичных соединений в объектах окружающей среды (микроцистины в пресноводных водоемах) и биологических жидкостях (аманитины в плазме крови и моче). Применяемые аналитические методы – тандемная масс-спектрометрия и масс-спектрометрия высокого разрешения, а также их сочетание с ВЭЖХ.

При этом подробно описаны сами процедуры обнаружения и идентификации, а также этапы отбора и подготовки проб; указаны используемые реактивы и аппаратура.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя  
Федерального медико-биологического  
агентства

М.Ф. Киселев

«25» февраля 2014 г.



Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации  
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от  
повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-  
социальной помощи

**Порядок проведения химико-аналитической экспертизы объектов окружающей  
среды и биологических жидкостей на предмет выявления токсичных  
полипептидных веществ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 12. 08-14

---

**1 Область применения**

Настоящие методические рекомендации распространяются на судебно-химические и клинические исследования по определению природных токсичных циклопептидов, прежде всего в пресноводных водоемах при их загрязнении продуктами жизнедеятельности сине-зеленых водорослей, и при диагностике отравлений грибами.

Документ устанавливает процедуру обнаружения и идентификации микроцистинов в воде и аманицинов в плазме крови и моче с помощью тандемной масс-спектрометрии и масс-спектрометрии высокого разрешения, в том числе в сочетании с ВЭЖХ.

Методические рекомендации предназначены для сотрудников центров индикации и диагностики опасных инфекционных заболеваний и отравлений химическими веществами, создаваемых в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем документе использована ссылка на нормативный документ:

– Постановление Правительства РФ от 27 октября 2008 г. № 791 о федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»

## 3 Обозначения и сокращения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия

МС – масс-спектрометрия с одним масс-анализатором

МС<sup>2</sup> – тандемная масс-спектрометрия

## 4 Описание метода

### 4.1 Материально-техническое обеспечение

#### 4.1.1 Химические реактивы

Стандартный образец  $\alpha$ -аманитина (Sigma)

Стандартный образец  $\beta$ -аманитина (Sigma)

Стандартный образец фаллоидина (Sigma)

Стандартный образец микроцистин LR (Braxis)

Стандартный образец миктоцистин RR (Braxis)

Биомасса *Microcystis aeruginosa* 973 (ЦЭБ РАН)

Формиат аммония, 5М (Supelco)

Муравьиная кислота (Agilent)

Кислота фосфорная, осч

Калия гидроксид, хч

Ацетонитрил, сорт 0 (Криохром)

Метанол (Burdlich & Jackson)

Вода деионизованная

Плазма крови человека

Аргон баллонный

#### 4.1.2 Растворы

4.1.2.1 Подвижная фаза для определения аматоксинов. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 1 мл 5 М раствора формиата аммония, доводят объем до метки деионизованной водой и перемешивают. Полученный раствор смешивают с ацетонитрилом в соотношении 95:5.

4.1.2.2 Подвижная фаза для определения микроцистинов. В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 0,1 мл муравьиной кислоты, растворяют в 100 мл деионизованной воды и доводят объем до метки тем же растворителем. Перемешивают. Полученный раствор смешивают с ацетонитрилом в соотношении 40:60.

4.1.2.3 Фосфатный буфер (рН 5,5). В мерную колбу вместимостью 1 л помещают 6,85 мл фосфорной кислоты, растворяют в 500 мл деионизованной воды и доводят рН раствора до величины 5,5 1 М раствором гидроксида калия (потенциометрически). Объем доводят до метки деионизованной водой. Перемешивают.

#### 4.1.3 Материалы

Автоматические пипетки 5000, 1000 и 100 мкл	(Biohit)
Вакуумные пробирки для взятия венозной крови Vacuette 9 мл с натрий-гепарином	
Вакуумные пробирки Vacuette 9 мл без добавок	(Greiner bio-one)
Колбы мерные, 10, 50, 100 и 1000 мл	
Колонка хроматографическая Ultrasphere ODS (250 x 2,0)мм, 5 мкм	(Beckman)
Колонка хроматографическая Zorbax SB-C18 (150 x 0,5)мм, 5 мкм	(Agilent)
Одноразовые концентрирующие колпачки, 3 мл	(Varian)
Патроны концентрирующие OASIS HLB, 500 мг	(Waters)
Патроны концентрирующие Evolute ABN, 200 мг	(Biotage)
Полипропиленовые вials для хроматографии, 250 мкл	(Dionex)
Пробирки Эппендорфа 1,5 мл	
Штатив лабораторный	
Штативы для пробирок Эппендорфа	
Цилиндр мерный 100 мл	

#### 4.1.4 Приборы

Жидкостный хроматограф с масс-детектором	(Agilent)
Весы аналитические	(Ohaus)
рН-метр	(Hanna)
Центрифуга лабораторная	
Установка для встряхивания образцов	(Hirana)
Насос водоструйный	
Холодильник бытовой с морозильной камерой	(Samsung)

## 4.2 Основные этапы выполнения экспертизы

Химико-аналитическая экспертиза объектов окружающей среды и биологических жидкостей с целью изучения токсичных полипептидных веществ разбивается на следующие основные этапы:

- отбор и подготовка проб;



- анализ проб методом масс-спектрометрии высокого разрешения, в том числе в сочетании с ВЭЖХ;
- анализ проб методом тандемной масс-спектрометрии в том числе в сочетании с ВЭЖХ;
- совместный анализ проб и аналитических стандартов методами ВЭЖХ и МС;
- обнаружение и идентификация токсичных полипептидов.

#### 4.2.1 Отбор и подготовка проб

##### 4.2.1.1 Определение микроцистинов в воде

###### 4.2.1.1.1 Подготовка патрона для твердофазной экстракции

Патрон подсоединяют к вакууму водоструйного насоса и кондиционируют, последовательно пропуская через него по 3 мл метанола и воды.

###### 4.2.1.1.2 Выделение микроцистинов из воды

100 мл исследуемого образца воды пропускают через патрон для твердофазной экстракции, подсоединенный к вакууму, со скоростью 1 капля/сек. Фильтрат отбрасывают. Микроцистины элюируют 5 мл метанола.

##### 4.2.1.2 Определения аматоксинов в плазме крови

###### 4.2.1.2.1 Подготовка патрона для твердофазной экстракции

Патрон подсоединяют к вакууму водоструйного насоса и кондиционируют, последовательно пропуская через него по 3 мл метанола и воды.

###### 4.2.1.2.2 Подготовка биопроб к хроматографическому анализу

###### 4.2.1.2.2.1 Осаждение белков

1 мл плазмы помещают в вакуумные пробирки Vacuette, 9 мл и прибавляют 1 мл метанола. Пробу встряхивают на аппарате в течение 10 минут при скорости 400 движений в минуту и центрифугируют в течение 5 минут при скорости 5000 об/мин. Супернатант декантируют в другую пробирку Vacuette, 9 мл.

###### 4.2.1.2.2.2 Твердофазная экстракция аматоксинов

К супернатанту прибавляют 3 мл воды и 1 мл фосфатного буфера, приготовленного по п. 4.1.2.3. Пробу пропускают через предварительно откондиционированный патрон, подсоединенный к вакууму, со скоростью 1 капля/сек. Фильтрат отбрасывают. Патрон промывают 2 мл воды и промывку отбрасывают. Аматоксины элюируют 3 мл метанола.

###### 4.2.1.2.2.3 Концентрирование проб

Элюат, полученный по п. 4.2.1.2.2.2, переносят в одноразовые колпачки для концентрирования и упаривают досуха в токе инертного газа. Сухой остаток растворяют в 0,2 мл подвижной фазы, приготовленной по п. 4.1.2.1. Испытуемый раствор переносят в пробирку Эппендорфа и центрифугируют при скорости 7 000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносят в хроматографическую вials.

### 4.2.1.3 Определения аматоксинов в моче

#### 4.2.1.3.1 Подготовка патрона для твердофазной экстракции

Патрон для твердофазной экстракции устанавливают в штатив и последовательно пропускают через него по 2 мл метилового спирта и бидистиллированной (деионизованной) воды.

#### 4.2.1.3.2 Подготовка биопроб к хроматографическому анализу

##### 4.2.1.3.2.1 Удаление неорганических солей из мочи.

Мочу в пробирке Vacuette, 9 мл, помещают в морозильник (температура – 20 °С) и выдерживают до полного замерзания образца. Затем пробирку вынимают из морозильника и оставляют при комнатной температуре до полной разморозки надосадочной жидкости. Далее содержимое фильтруют через бумажный фильтр в чистую пробирку Vacuette. Образовавшийся в процессе цикла вымораживания-оттаивания осадок отбрасывают.

##### 4.2.1.3.2.2 Твердофазная экстракция аманитинов

В пластиковую пробирку Vacuette механическим дозатором последовательно помещают 1 мл мочи, подготовленной по п. 4.2.1.3.2.1, 3 мл бидистиллированной (деионизованной) воды и 1 мл фосфатного буферного раствора, приготовленного по п. 4.1.2.3. Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

Полученный раствор пропускают через патрон для твердофазной экстракции, подготовленный по п. 4.2.1.3.1. Фильтрат отбрасывают. Патрон последовательно промывают 2 мл бидистиллированной (деионизованной) воды и 1 мл метанола. Промывки отбрасывают. Аматоксины элюируют 3 мл метанола, который пропускают со скоростью около 1 мл/мин.

##### 4.2.1.3.2.3 Концентрирование проб

Элюат, полученный по п. 4.2.1.3.2.2, переносят в одноразовые колпачки для концентрирования и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 100 мкл подвижной фазы, подготовленной по п. 4.1.2.1. Испытуемый раствор переносят в пробирку Эппендорфа и центрифугируют при скорости 7000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переносят в хроматографическую вialу.

### 4.2.2 Анализ методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Тип и марки аналитических приборов указаны в п. 4.1.4. Применение масс-спектрометров и хроматомасс-спектрометров других конфигураций и фирм-производителей возможно, если они обеспечивают массовое разрешение не менее 10000.

Анализ проводится в режиме хроматомасс-спектрометрии или прямой инъекции растворов в масс-спектрометр. Полученные аналитические данные представляют собой масс-спектры, причем в первом случае они соответствуют хроматографическим пикам или областям на хроматограмме, включающим ожидаемое время выхода аналитов. Для каждой пробы необходимо записать два спектра (две хроматограммы) в условиях повторяемости.

Критерий обнаружения аналитов – присутствие массового пика с отношением сигнал шум не менее 3:1 и значением  $m/z$ , отличающимся от теоретического значения не



4.2.2.1.2 Условия МС-детектирования

Тип ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении (ESI)
Режим детектирования	Детектирование в режиме полного ионного тока от 100 до 1100 Да
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов в режиме высокого разрешения
Масс-спектральное разрешение	16900-17300
Температура распылителя	350°C
Напряжение на распылителе	3,5 кВ
Напряжение на капилляре	80 В
Скорость потока газа-осушителя	8 л/мин
Скорость потока газа на распылителе	7,5 л/мин
Скорость потока вспомогательного газа	7,5 л/мин
Температура капилляра	325°C

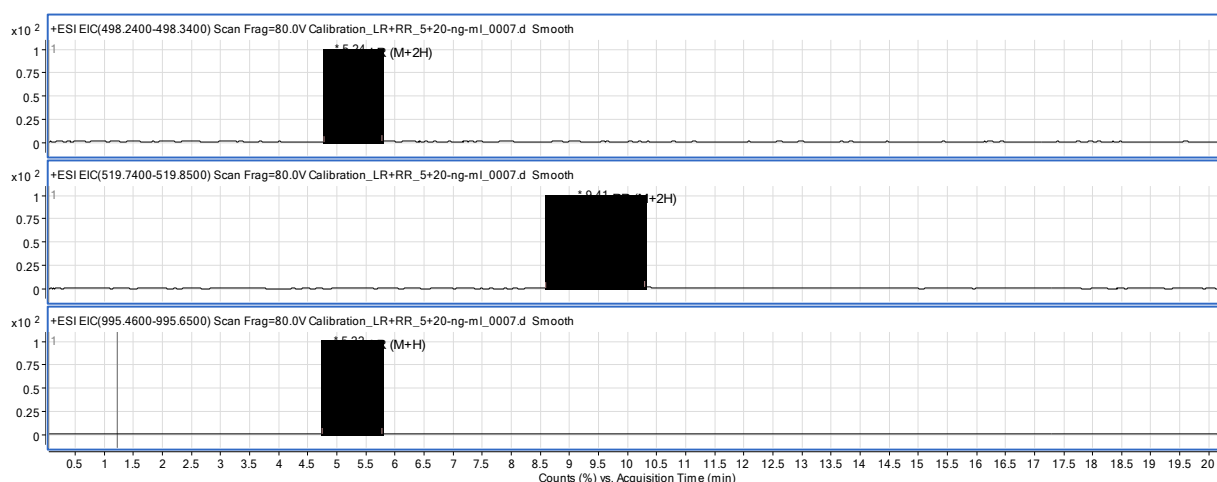


Рисунок 2 – Обнаружение микроцистинов LR и RR в воде методом ВЭЖХ-МС

4.2.2.2 Хромато-масс-спектрометрический анализ аматоксинов

4.2.2.2.1 Условия хроматографирования

Колонка	Zorbax SB-C18 (150 x 0,5) мм, 5 мкм															
Подвижная фаза	Компонент А — 0,005 М раствор формиата аммония в воде Компонент В — ацетонитрил.															
Режим хроматографического элюирования	Градиентный: <table border="1" style="margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>Время (мин)</th> <th>% А</th> <th>% В</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Время (мин)	% А	% В	0	95	5	15	50	50	20	95	5	26	95	5
Время (мин)	% А	% В														
0	95	5														
15	50	50														
20	95	5														
26	95	5														
Скорость потока элюента	15 мкл/мин															

Температура термостата колонки	25°C
Температура термостата отделения для проб	5°C
Объем ввода пробы	5 мкл
Время анализа	23 мин

#### 4.2.2.2.2 Условия МС-детектирования

Тип ионизации	Ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении (ESI)
Режим детектирования	Детектирование в режиме полного ионного тока от 100 до 1000 Да
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов в режиме высокого разрешения
Масс-спектральное разрешение	15500–18200
Температура распылителя	350°C
Напряжение на распылителе	3,5 кВ
Напряжение на капилляре	80 В
Скорость потока газа-осушителя	8 л/мин.
Скорость потока газа на распылителе	11 л/мин
Скорость потока вспомогательного газа	11 л/мин
Температура капилляра	325°C

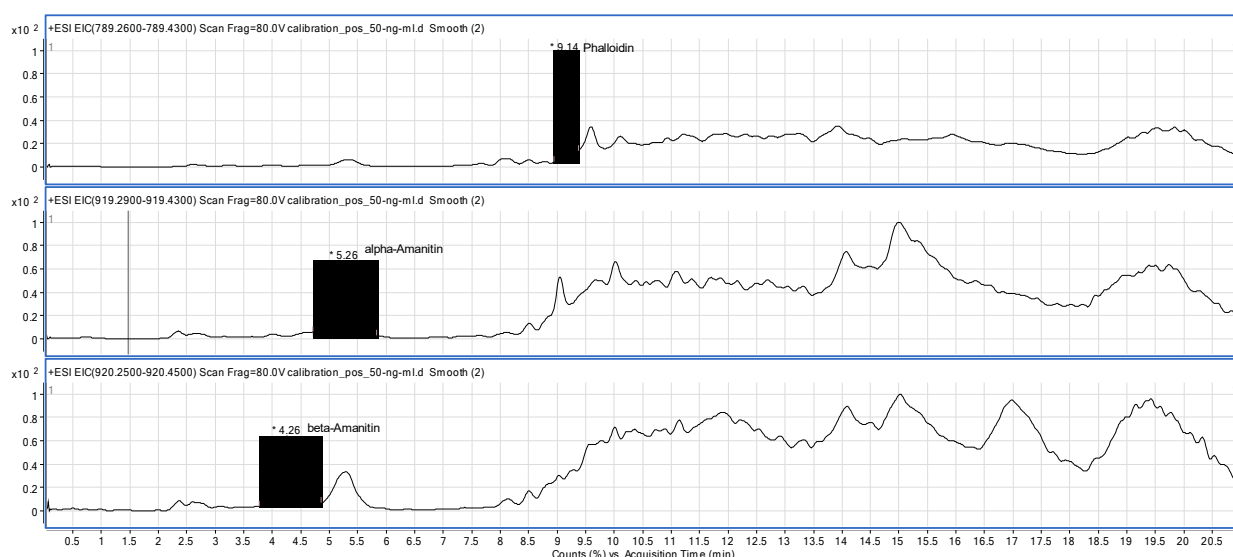


Рисунок 3 – Обнаружение аматоксинов и фаллоидина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС

#### 4.2.3 Анализ методом тандемной масс-спектрометрии

Кроме аналитических приборов, указанных в п. 4.1.4, могут применяться другие тандемные масс-спектрометры и хроматомасс-спектрометры различных фирм-производителей на основе квадрупольных и времяпролетных масс-анализаторов и орбитальных ловушек.

На первой стадии анализа регистрируют простые масс-спектры ( $MS^1$ ). Анализ может быть проведен в режиме хроматомасс-спектрометрии или прямой инъекции испытуемых растворов (экстрактов) в масс-спектрометр. Полученные аналитические данные представляют собой масс-спектры, причем в первом случае они соответствуют хроматографическим пикам или областям на хроматограмме, включающим ожидаемое время выхода аналитов.

В зависимости от разрешения масс-спектрометра предусматривается два варианта дальнейших операций.

1 Используется масс-спектрометрия высокого разрешения. Обнаружение искоемых соединений в анализируемом образце производят по массовым пикам, для которых значения  $m/z$  указаны в приложении А. Если соответствующие пики не найдены, то делается вывод об отсутствии этих соединений в образце. В том случае, когда массовые пики обнаружены в спектре  $MS^1$ , для них регистрируют соответствующие тандемные спектры как ионов-предшественников при трех энергиях столкновений, выбранных в диапазоне 10-50 эВ, например 20, 35 и 50 эВ.

2 Используется масс-спектрометрия обычного разрешения (точность  $m/z$  не превышает десятых долей Да). Сначала устанавливают наличие массовых пиков, соответствующих округленным значениям  $m/z$  (округляются числа в колонке « $m/z$  иона  $[M+H]^+$ » в приложении А). При отсутствии таких пиков делается вывод об отсутствии искоемых соединений в образце. Если искоемые пики присутствуют в спектре  $MS^1$ , то для них регистрируют соответствующие тандемные спектры как ионов-предшественников при трех энергиях столкновений, выбранных в диапазоне 10-50 эВ, например 20, 35 и 50 эВ.

В обоих случаях экспериментальные тандемные масс-спектры сравнивают с библиотечными, проводя поиски так, как это описано ниже, и изучают ответы компьютера.

#### 4.2.4 Поиски в библиотеке масс-спектров

4.2.4.1 Экспериментальные масс-спектры, зарегистрированные по процедуре, описанной в п. 4.2.3, сравнивают со справочными тандемными масс-спектрами, помещенными в специально созданную библиотеку «Токсичные пептиды» (директория “toxic peptides”), используя программу NIST MS Search в версии 2005 г. или более поздней версии [4].

В данной библиотеке, впервые описанной в работе [5], представлено 263 экспериментальных и литературных масс-спектра 59 соединений. Другие характеристики библиотеки приведены в приложении Б, сама библиотека (печатная версия) – в приложении В.

4.2.4.2 Перед проведением библиотечных поисков директорию “toxic peptides” копируют в директорию “MSSEARCH”, которая является составной частью указанной

программы. Если на компьютере используемого масс-спектрометра эта программа отсутствует, ее предварительно устанавливают.

Для сравнения с библиотечными масс-спектрами зарегистрированные экспериментальные масс-спектры импортируют в программу MS Search. Эти спектры появляются в окне Librarian. Далее, в окне Lib. Search находят кнопку Library Search Options. При ее нажатии появляется соответствующее окно, в котором последовательно находят вкладку Search и группу Spectrum Search Type. Выбирают опцию Similarity, MS/MS. В группе Precursor Ion в правое поле вводят массовое число иона-предшественника. Открывают вкладку Libraries; в поле Included Libs. должна присутствовать библиотека «toxic peptides».

Библиотечные поиски инициируют кликом по каждому из экспериментальных масс-спектров. Результаты появляются в окне Lib. Search. Фиксируют название (Name) соединения, указанного на первой строке результатов, и соответствующий показатель сходства спектров Match. Если значение этого показателя равно 250 или выше, соответствующее соединение считают идентифицированным (правильный положительный результат). Пример такой идентификации приведен в приложении Г. Если значение показателя Match ниже 250, определяемое соединение считают неидентифицированным и применяют другие способы идентификации.

Наиболее надежной следует считать идентификацию тех пептидов, масс-спектры которых представлены в библиотеке наибольшим количеством спектров, зарегистрированных в различных условиях: микроцистинов-LR, -RR, -LA, -YR,  $\alpha$ - и  $\beta$ -аманитина, фаллоидина.

Масс-спектрометры некоторых фирм-производителей снабжены собственными программами сравнения экспериментальных и справочных масс-спектров. В этом случае библиотеку «toxic peptides» используют в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к коммерческим программам. Эти же инструкции следует применять для сравнения спектров. Граничное значение показателя сходства масс-спектров как критерий идентификации выбирают, используя статистический метод ROC curve [5].

#### 4.2.5 Идентификация с использованием аналитического стандарта

Этот способ идентификации используют в тех случаях, когда:

- идентификация с применением масс-спектральных библиотек невозможна из-за отсутствия или малого числа соответствующих спектров в библиотеке;
- в лаборатории отсутствует масс-спектрометр высокого разрешения;
- отсутствует опыт аналитической работы с токсичными циклопептидами.

Аналитический стандарт выбирают исходя из идентификационной гипотезы (предположения о вероятном присутствии того или иного соединения в анализируемом образце, основанном на наблюдениях) и готовят его раствор. Массовую концентрацию стандартного образца подбирают таким образом, чтобы его аналитический сигнал – хроматографический или массовый пик – был сопоставим по амплитуде (площади) с

сигналом идентифицируемого компонента в исследуемом образце. Затем смешивают равные объемы стандартного и испытуемого растворов и сравнивают хроматограммы и масс-спектры полученной смеси и анализируемого образца.

Неизвестное соединение считают идентифицированным как основное (номинальное) вещество стандарта, если его добавление к анализируемому образцу не дает новых аналитических сигналов – (а) хроматографических и (б) массовых пиков, а также (в) нового МС<sup>2</sup> спектра. Последнее означает, что отличие двух сравниваемых масс-спектров не выходит за границы их вариаций в условиях повторяемости. В отсутствие хроматографии необходимо выполнение обоих масс-спектрометрических критериев (б и в), причем рекомендуется применение масс-спектрометрии высокого разрешения.

#### 4.2.6 Общие результаты идентификации

Возможны следующие результаты качественного определения рассматриваемых соединений:

- надежная идентификация (правильный положительный результат);
- предварительная (скрининговая) идентификация;
- отсутствие идентификации (отрицательный результат идентификации).

4.2.6.1 Наиболее надежной считают идентификацию в следующих случаях, когда она проведена:

- с использованием аналитического стандарта (п. 4.2.5);
- совместно методами масс-спектрометрии высокого разрешения (п. 4.2.2) и тандемной масс-спектрометрии (п. 4.2.3);
- методом тандемной масс-спектрометрии, результат относится к семи наиболее распространенным пептидам (п. 4.2.4);
- методом масс-спектрометрии высокого разрешения или тандемной масс-спектрометрии, при условии, что некоторые из серии однотипных проб анализируют совместно обоими методами или с использованием аналитического стандарта.

В других случаях, например при идентификации редких микроцистинов только одним из масс-спектрометрических методов, результат считают предварительным (скрининговым).

4.2.6.2 Если не выполняется ни один из критериев идентификации, перечисленных в п. 4.2.2-4.2.5 в отношении рассмотренных соединений, итог качественного определения рассматривают как отрицательный результат.

#### 4.2.7 Эффективность применения методических рекомендаций

Эффективность использования настоящих методических рекомендаций сопряжена с их внедрением в практику организаций, осуществляющих мониторинг воздействия химического фактора на здоровье населения. К их числу относятся клинично-диагностические центры, бюро судебно-химической экспертизы, а также лаборатории,



осуществляющие контроль качества воды и охрану природных ресурсов. Успешная реализация предложенных подходов зависит от оснащенности испытательных лабораторий современным аналитическим оборудованием и компьютерной программой NIST MS Search, а также от квалификации персонала.

Экспрессность описанной химико-аналитической экспертизы определяется в первую очередь временем подготовки проб к хроматомасс-спектрометрическому анализу и может быть увеличена за счет использования многоячейковых или автоматизированных вспомогательных устройств.

Проект методических рекомендаций был направлен на рецензию в Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ) и Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский центр экологической безопасности» Российской академии наук. На разработанный проект методических рекомендаций были получены положительные отзывы.

Самостоятельная копия библиотеки масс-спектров в электронном виде (директория “toxic peptides”) записана на компакт-диск (CD-ROM).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Ed. by I. Chorus, J. Bartram. WHO: London, New York. 1999.
- 2 The Exact Mass Calculator; [www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm](http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm).
- 3 Adduct Calculator; [www.lc-ms.nl/ESI-MS-adducts.xls](http://www.lc-ms.nl/ESI-MS-adducts.xls).
- 4 NIST Mass Spectral Search Program; [www.nist.gov/srd/upload/Ver20Man.pdf](http://www.nist.gov/srd/upload/Ver20Man.pdf).
- 5 Мильман Б.Л., Журкович И.К. Библиотека тандемных масс-спектров микроцистинов и родственных соединений // Масс-спектрометрия – 2013. – Т. 10, № 1. – С. 11-18.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Наиболее распространенные и (или) токсичные циклопептиды. Массы ионов

Таблица А.1 – наиболее распространенные и (или) токсичные циклопептиды. Массы ионов\*

Циклопептид	Округлен-ная моно-изотопная молекуляр-ная масса	Брутто-формула	LD <sub>50</sub> , мкг/кг [1]	m/z иона [M+H] <sup>+</sup>	Идентификационная граница m/z	
					нижняя	верхняя
Микроцистин-LA	909	C <sub>46</sub> H <sub>67</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	50	910,4921	910,4893	910,4948
[DMAdda5] Микроцистин-LR	980	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	90-100	981,5404	981,5375	981,5433
Микроцистин-LR	994	C <sub>49</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	50	995,5561 [M+2H] <sup>2+</sup> 498,2817	995,5531 [M+2H] <sup>2+</sup> 498,2802	995,5590 [M+2H] <sup>2+</sup> 498,2832
Микроцистин-LY	1001	C <sub>52</sub> H <sub>71</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	90	1002,5183	1002,5153	1002,5213
Микроцистин-HilR	1008	C <sub>50</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>	100	1009,5717	1009,5687	1009,5747
[ADMAdda5] Микроцистин-LR	1022	C <sub>50</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	60	1023,5510	1023,5479	1023,5540
Микроцистин-YM(O)	1035	C <sub>51</sub> H <sub>69</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub> S	56	1036,4696	1036,4665	1036,4727
[ADMAdda5] Микроцистин-LHar	1036	C <sub>51</sub> H <sub>76</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	60	1037,5666	1037,5635	1037,5697
Микроцистин-RR	1037	C <sub>49</sub> H <sub>75</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	600	1038,5731 [M+2H] <sup>2+</sup> 519,7902	1038,5700 [M+2H] <sup>2+</sup> 519,7886	1038,5762 [M+2H] <sup>2+</sup> 519,7917
Микроцистин-YR	1044	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	70	1045,5353 [M+2H] <sup>2+</sup> 523,2713	1045,5322 [M+2H] <sup>2+</sup> 523,2697	1045,5384 [M+2H] <sup>2+</sup> 523,2729

Продолжение таблицы А.1

Циклопептид	Округлен- ная моно- изотопная молекуляр- ная масса	Брутто- формула	LD <sub>50</sub> , мкг/кг [1]	m/z иона [M+H] <sup>+</sup>	Идентификационная граница m/z	
					нижняя	верхняя
Микроцистин -HtyR	1058	C <sub>53</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>13</sub>	80-100	1059,5510	1059,5478	1059,5541
α-Аманитин	918	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S	100	919,3615	919,3587	919,3642
				[M+2H] <sup>2+</sup> 460,1844	[M+2H] <sup>2+</sup> 460,1830	[M+2H] <sup>2+</sup> 460,1857
β-Аманитин	919	C <sub>39</sub> H <sub>53</sub> N <sub>9</sub> O <sub>15</sub> S	≥ 200	920,3455	920,3427	920,3482
				[M+2H] <sup>2+</sup> 460,6764	[M+2H] <sup>2+</sup> 460,6750	[M+2H] <sup>2+</sup> 460,6778
Фаллоидин	788	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> N <sub>8</sub> O <sub>11</sub> S		789,3236	789,3212	789,3260
Примечание – * – Расчет масс по программам [2,3]						

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Основные характеристики библиотеки масс-спектров

Таблица Б.1 – Основные характеристики библиотеки масс-спектров

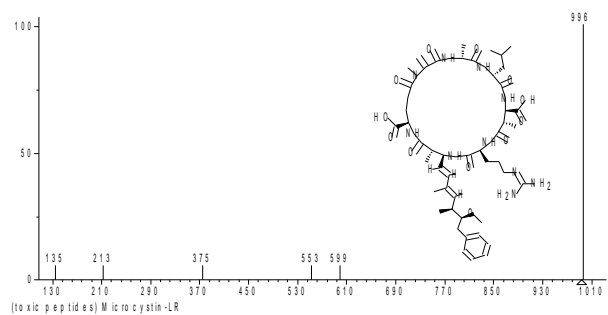
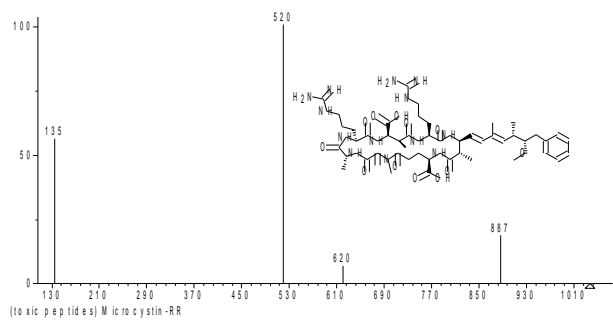
Характеристика	Значение, величина
Источники спектров	47 научных статей и оригинальные экспериментальные данные
Соединения	59
Спектры	263
Основные соединения (количество спектров)	микроцистин-LR (46) микроцистин-YR (21) микроцистин-RR (19) микроцистин-LA (15) β-аманитин (15) микроцистин-LF (12) α-аманитин (10) фаллоидин (8) микроцистин-LW (6) [Dha7]микроцистин-RR (6) [ADMAdda5]микроцистин-Lhar (5) [ADMAdda5]микроцистин-LR (5) микроцистилид А (5) микроцистилид С (5) нодуларин (5)
Доля правильных положительных результатов	≥ 70%
Доля правильных отрицательных результатов	≥ 77%
Значимый уровень показателя сходства (Match) масс-спектров	≥ 250

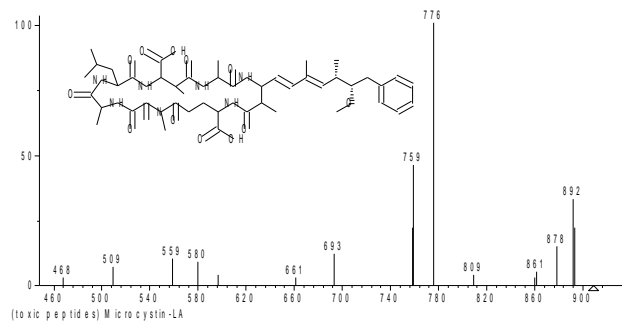
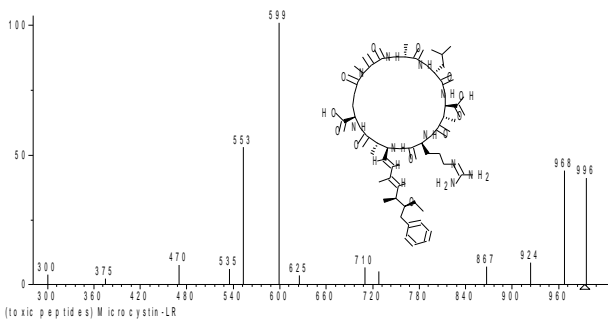
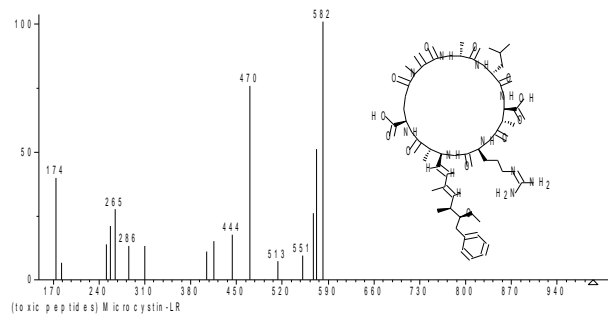
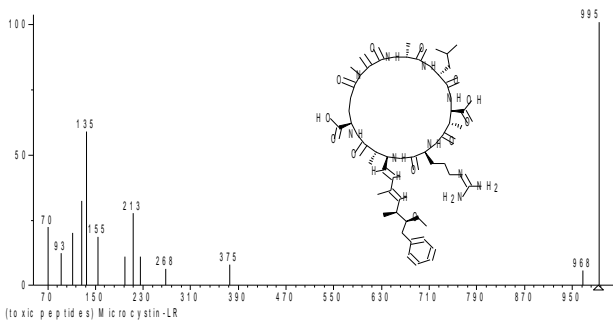
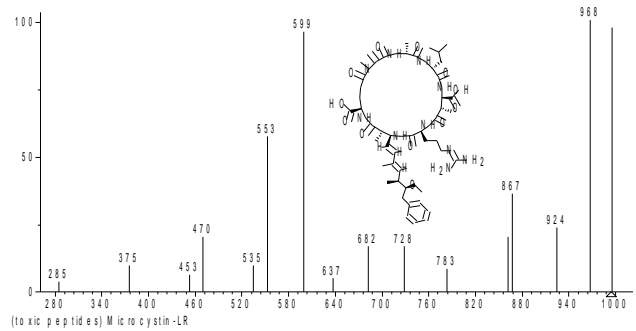
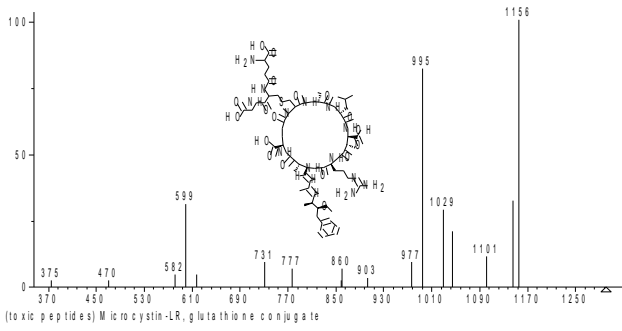
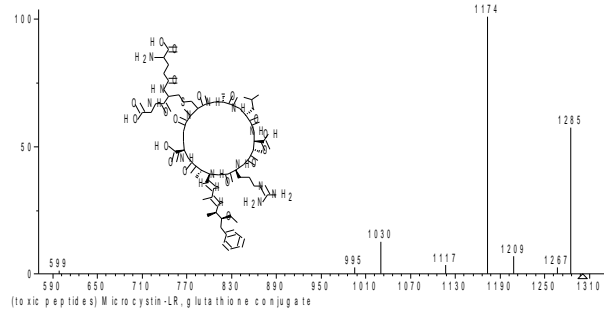
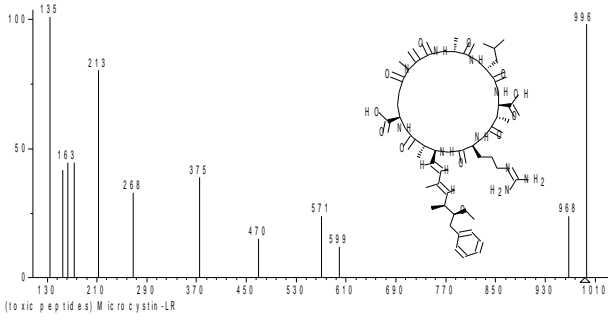
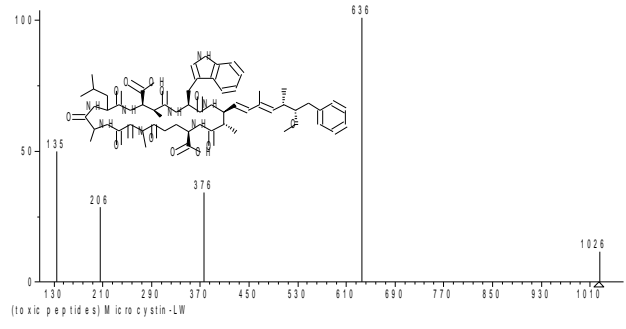
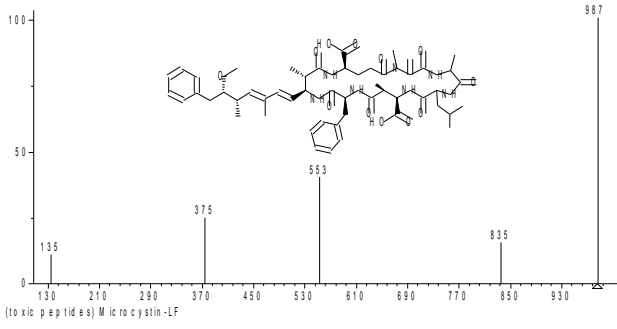
ПРИЛОЖЕНИЕ В

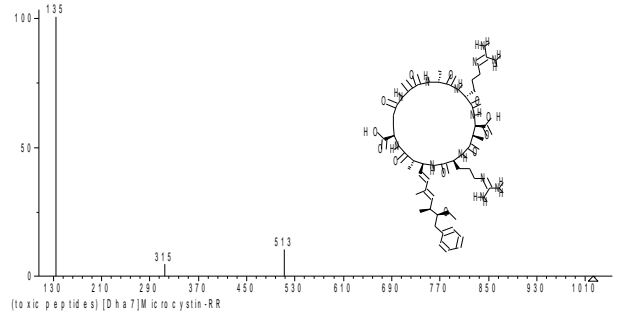
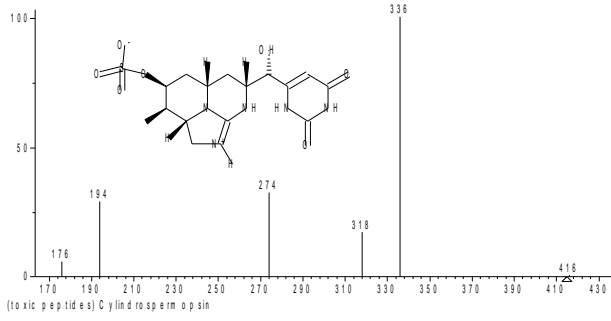
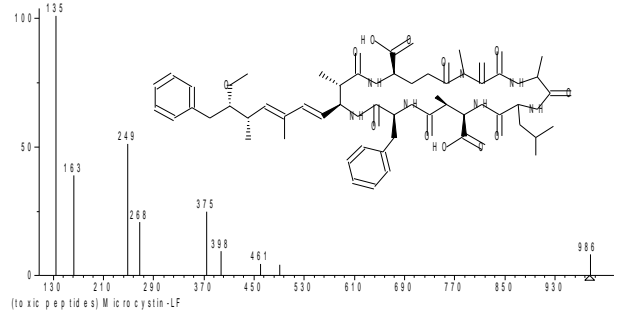
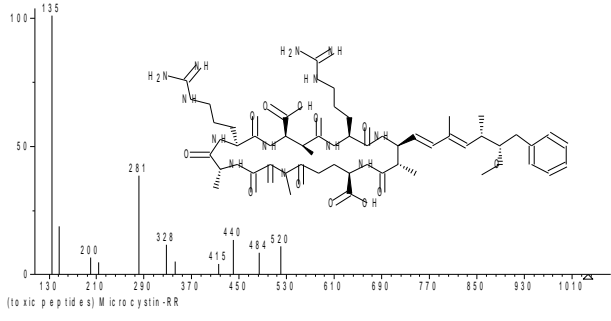
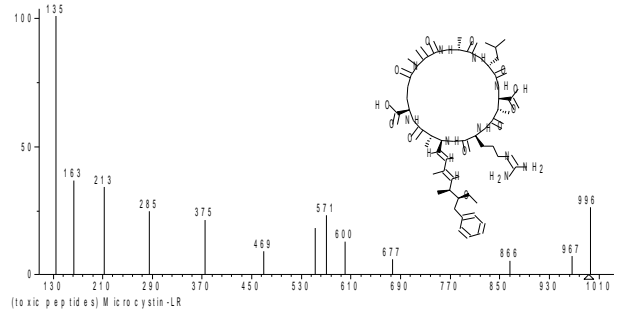
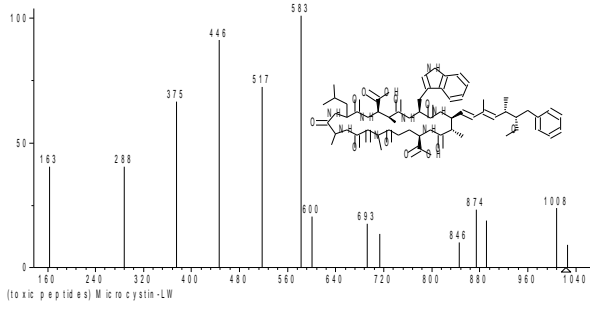
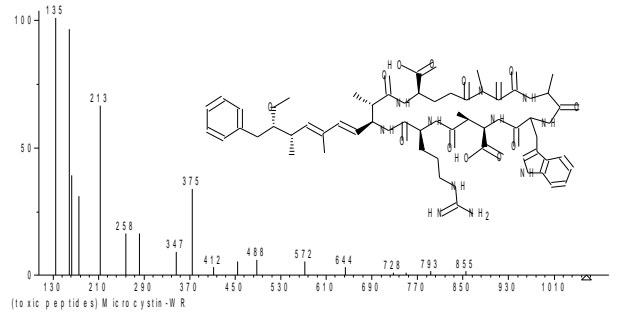
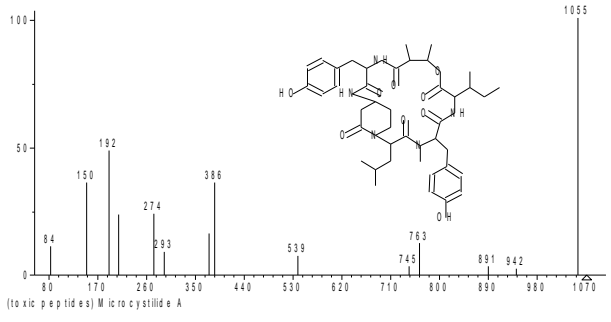
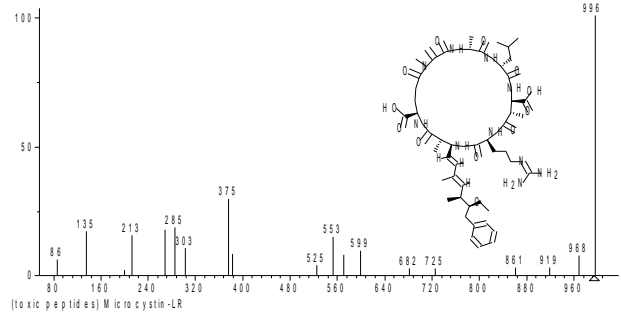
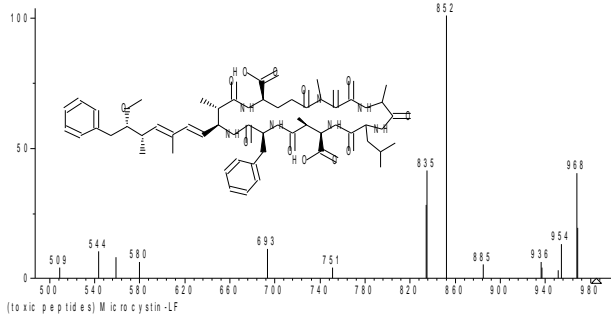
(обязательное)

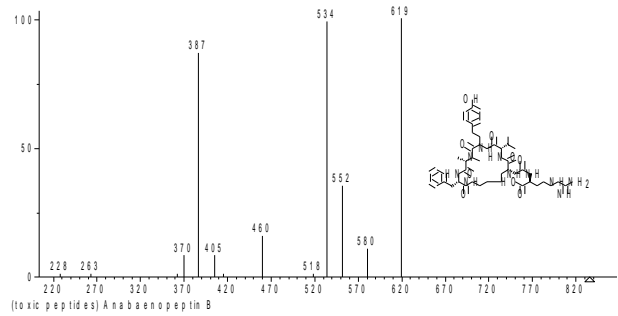
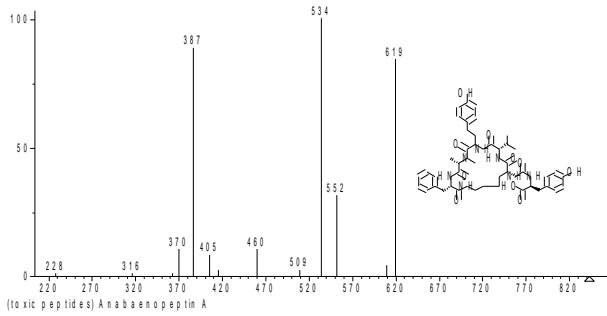
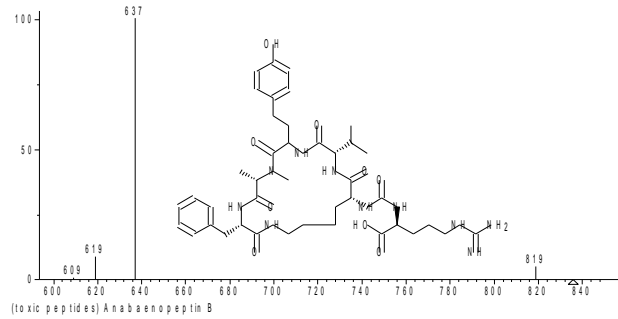
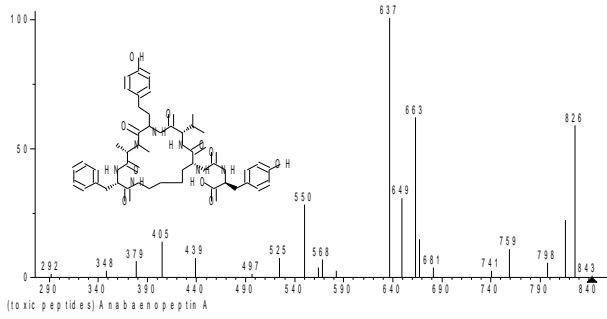
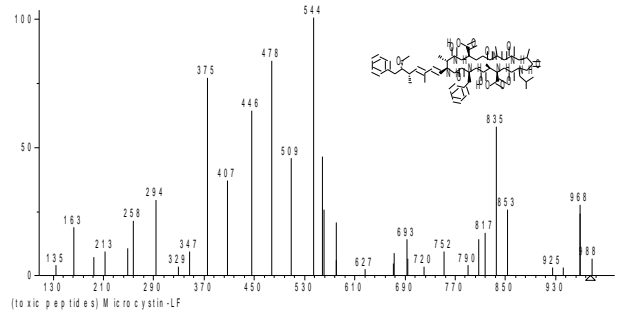
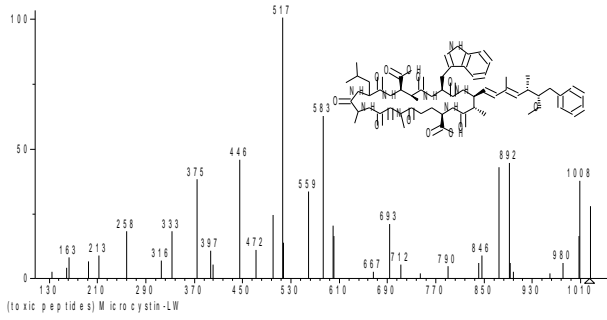
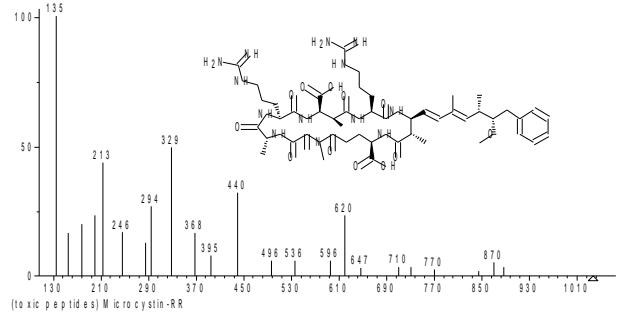
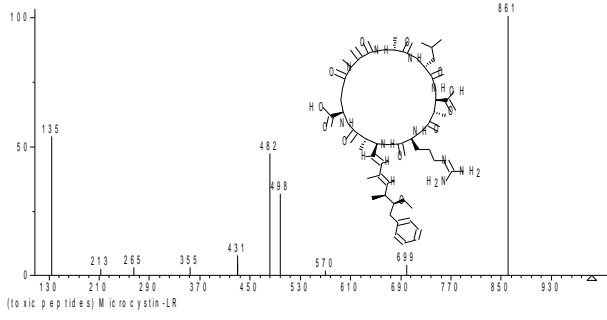
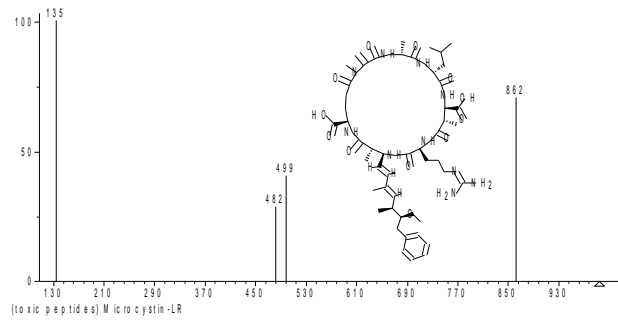
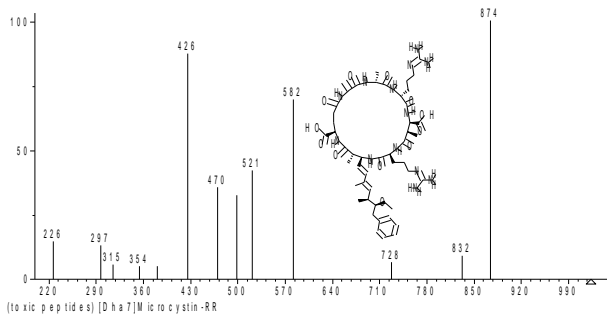
Библиотека масс-спектров токсичных пептидов и родственных соединений

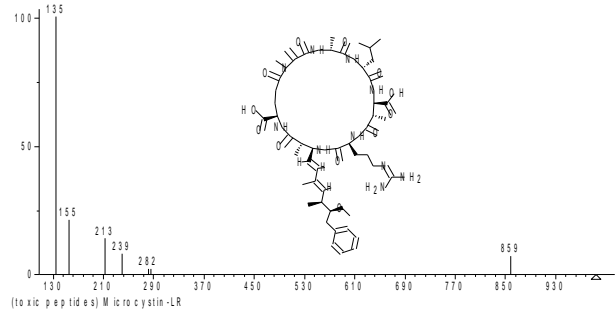
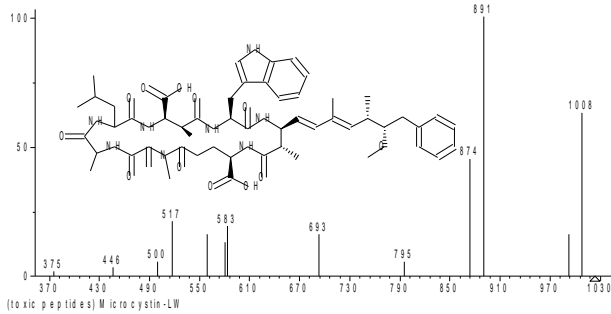
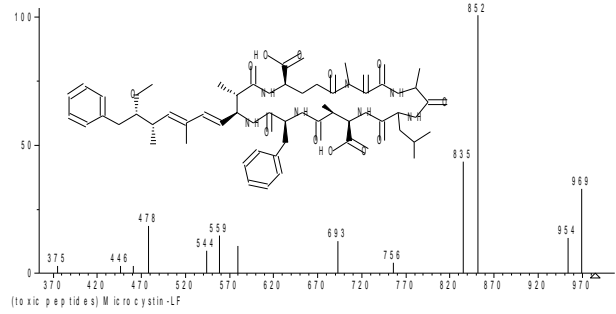
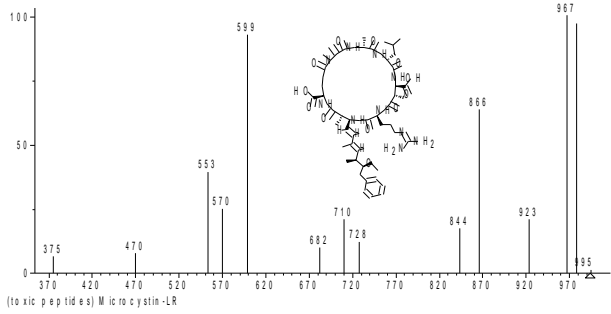
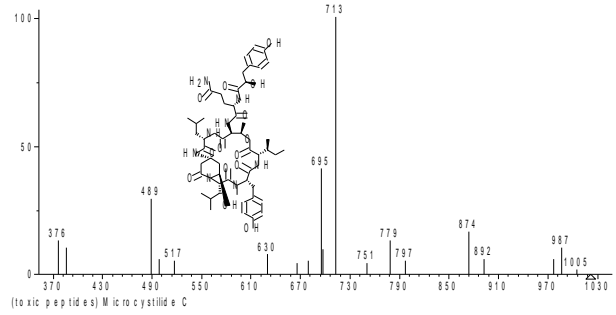
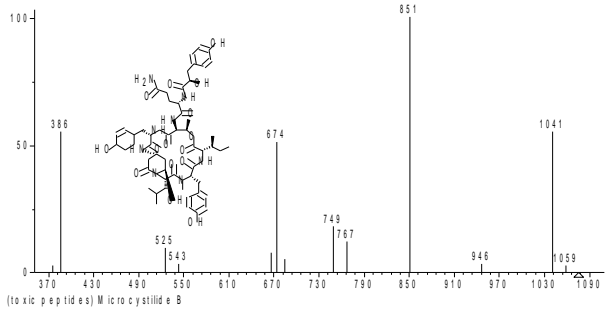
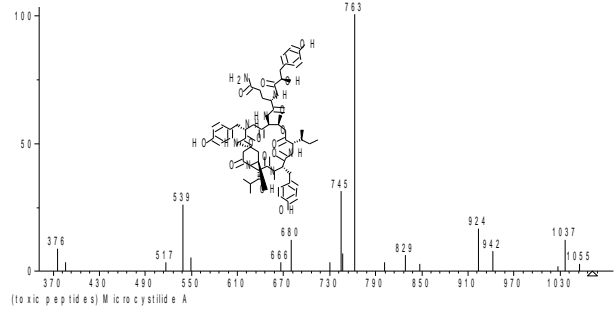
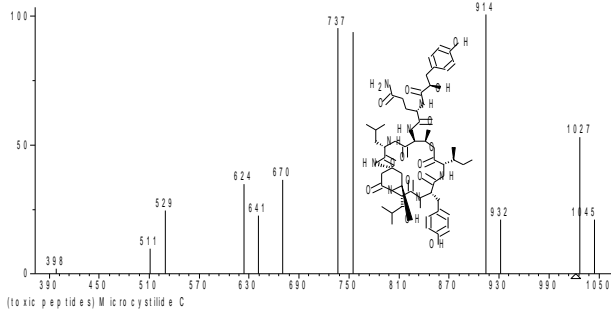
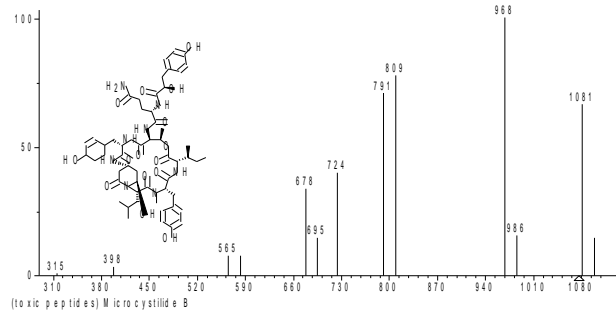
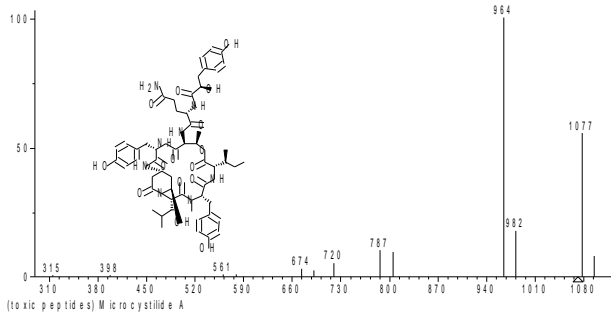


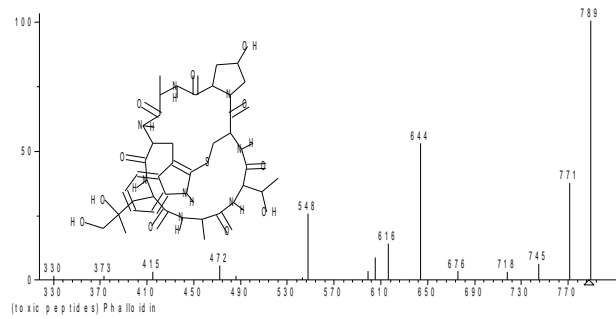
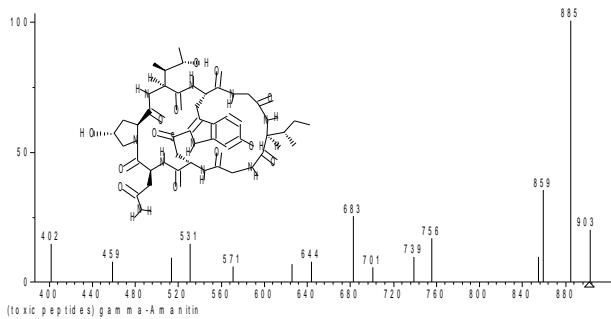
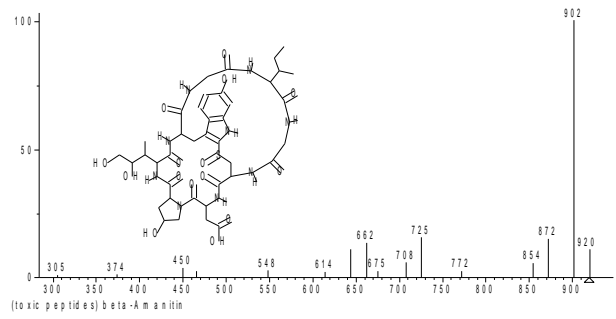
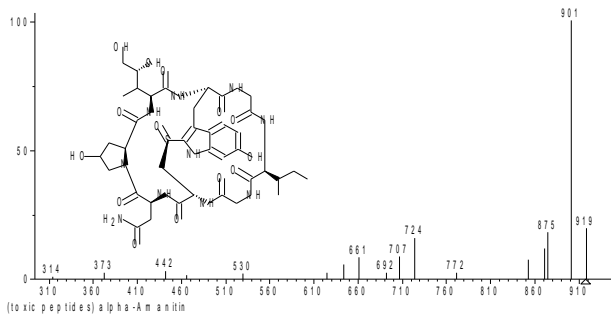
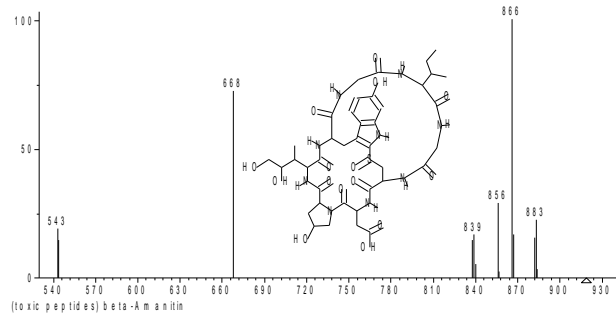
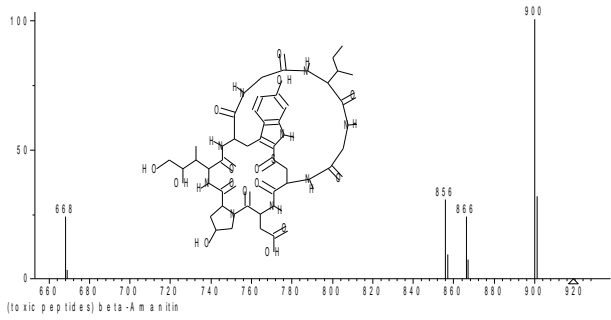
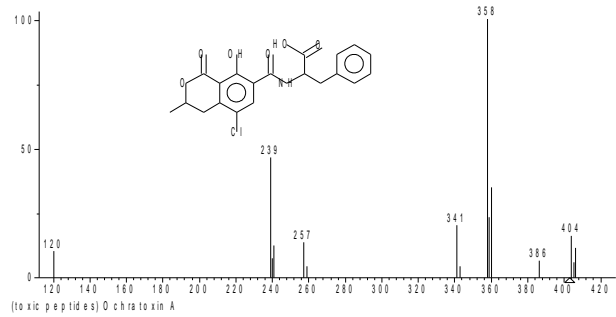
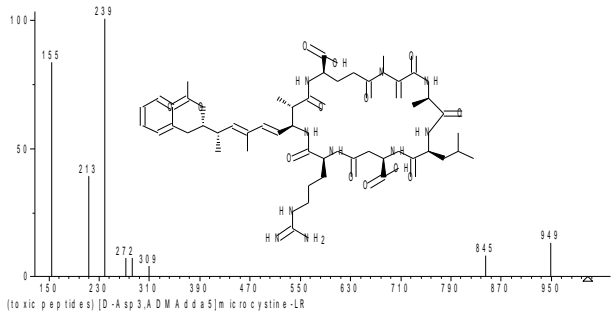
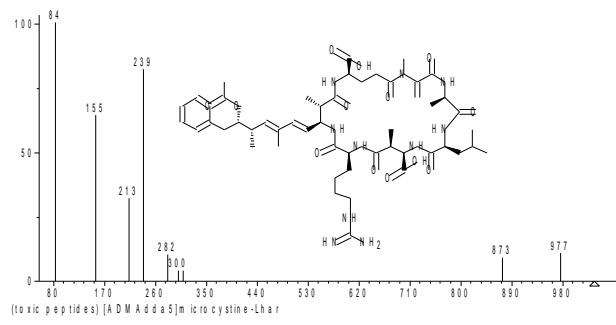
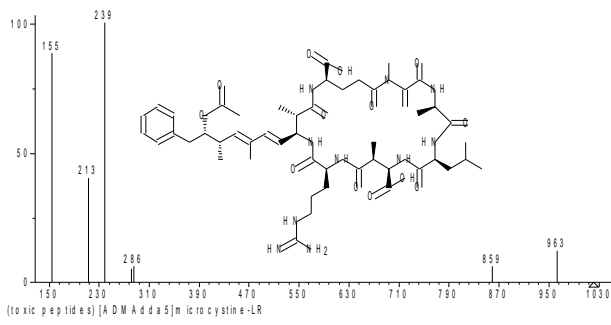


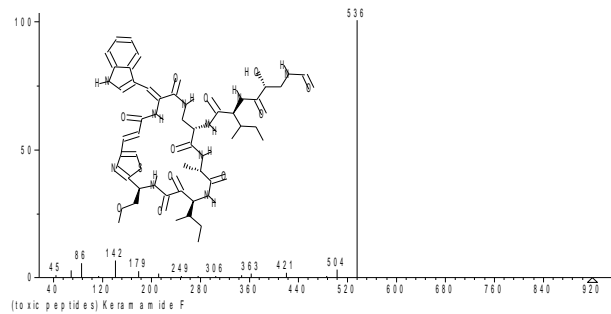
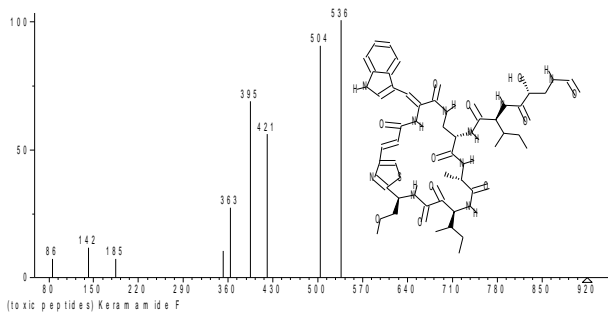
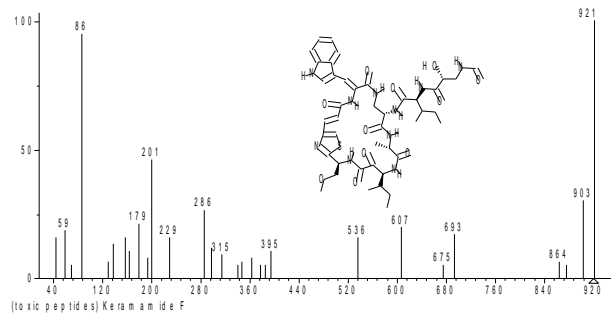
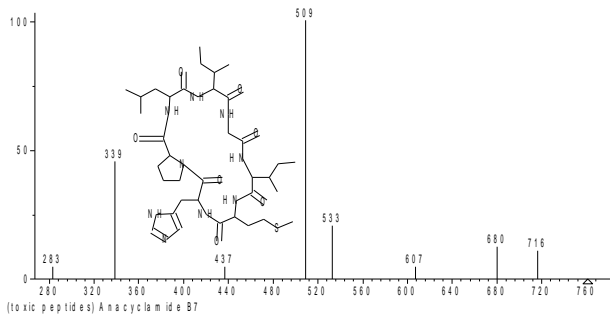
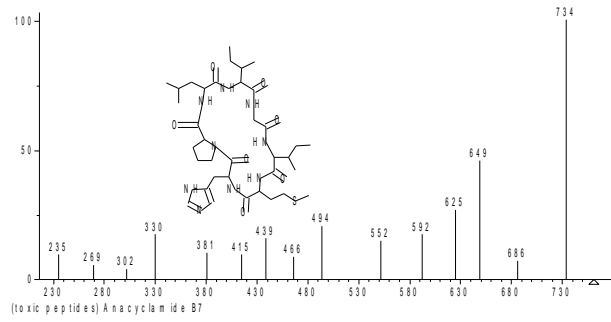
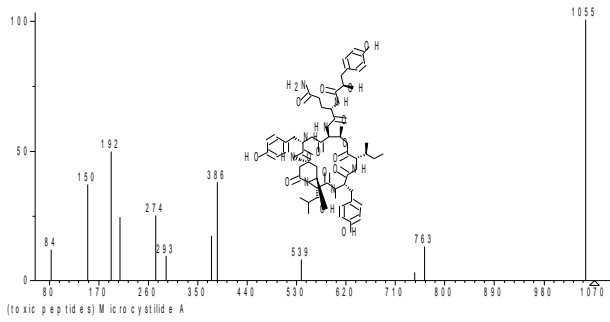
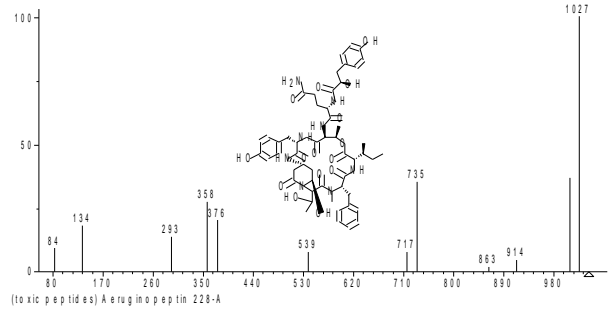
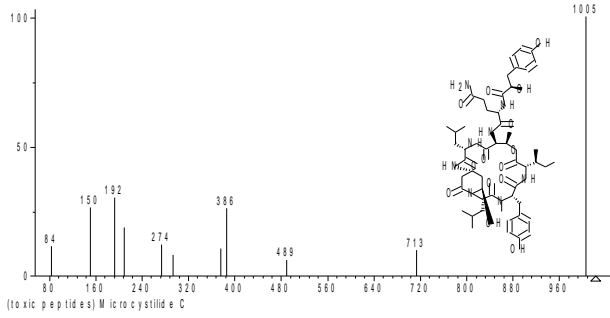
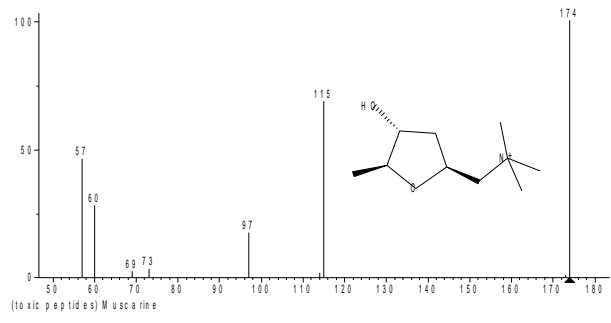
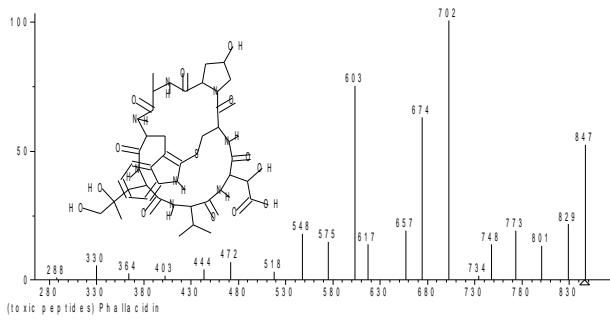


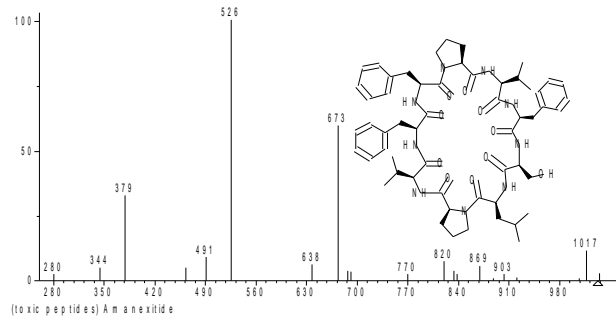
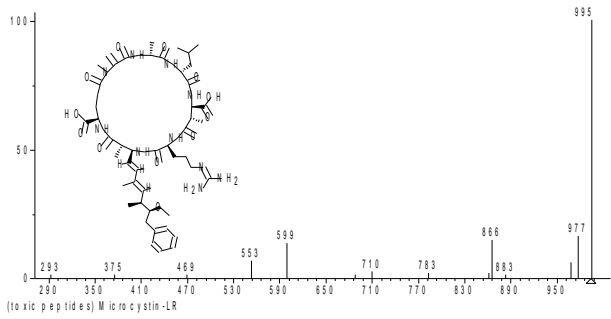
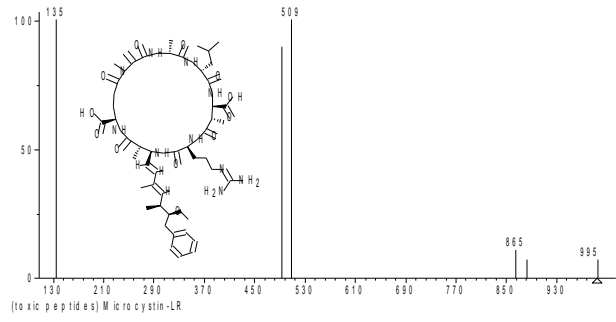
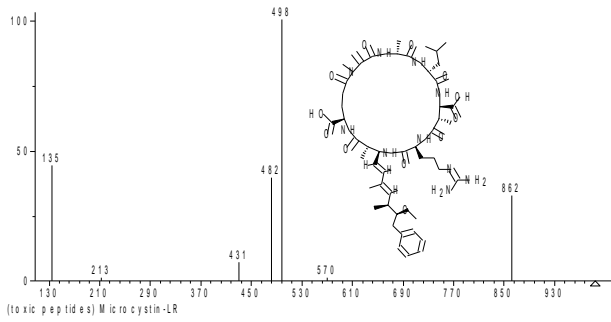
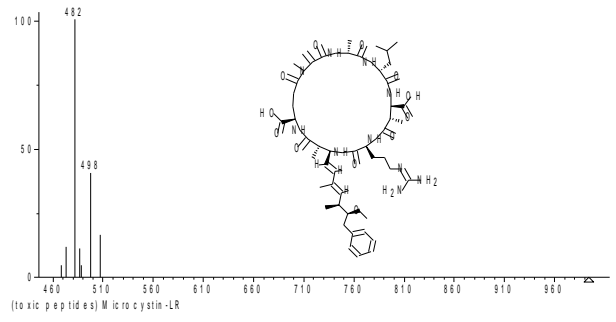
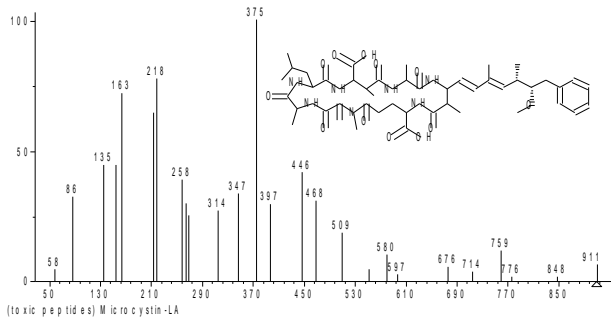
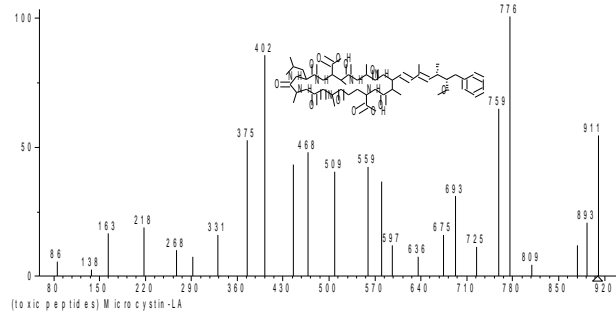
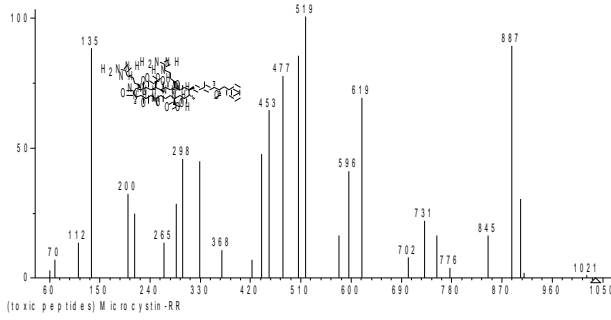
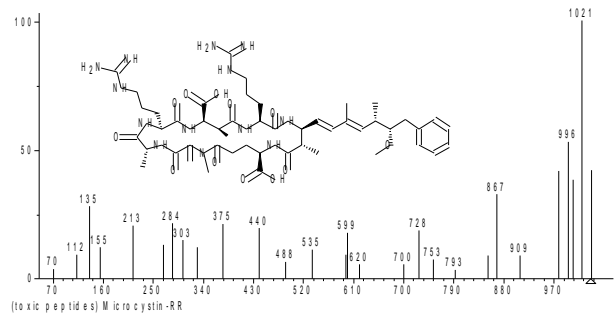
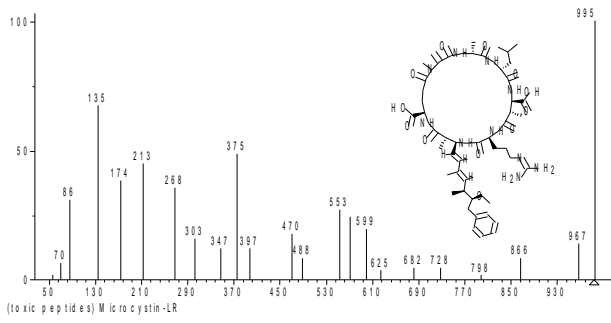




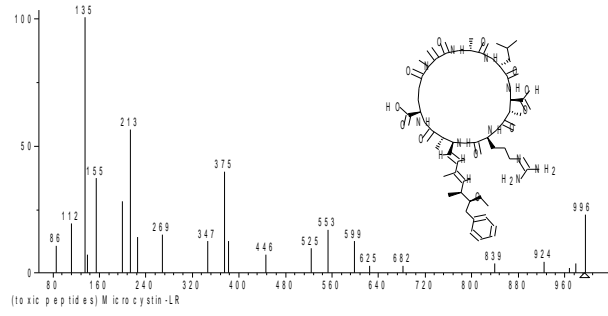
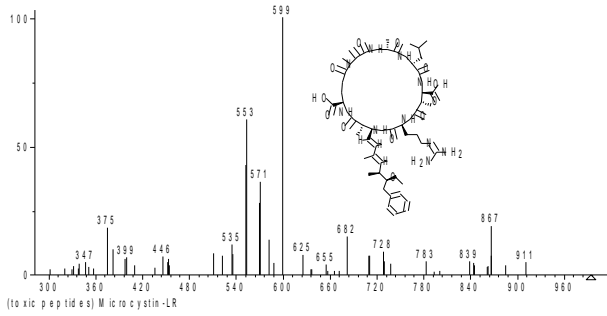
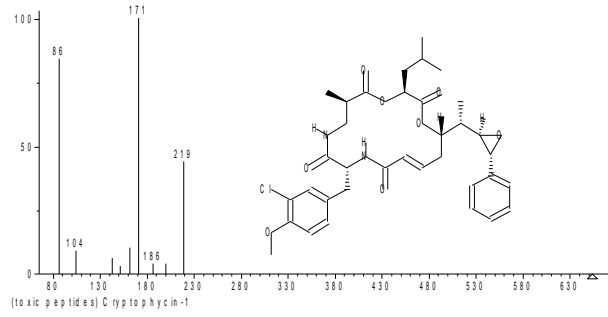
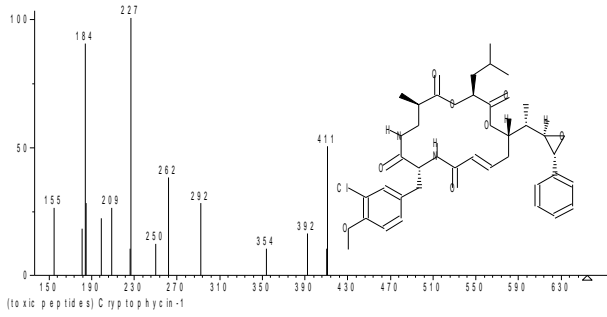
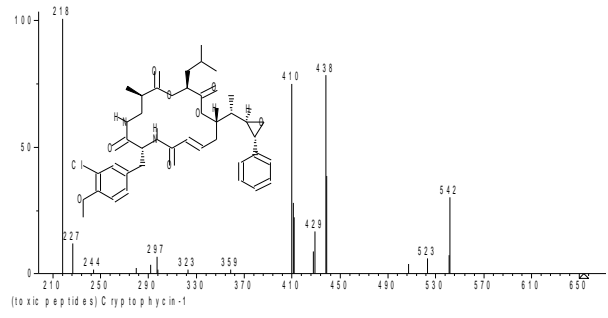
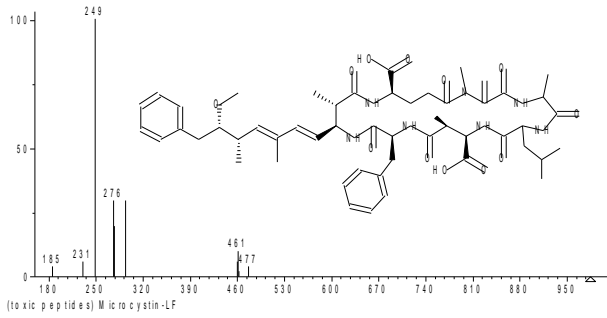
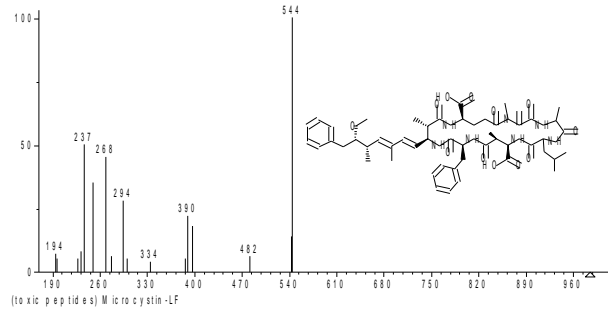
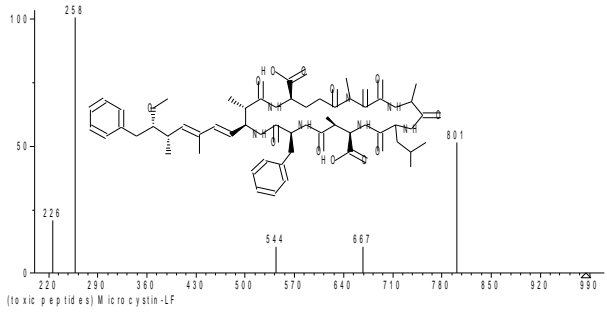
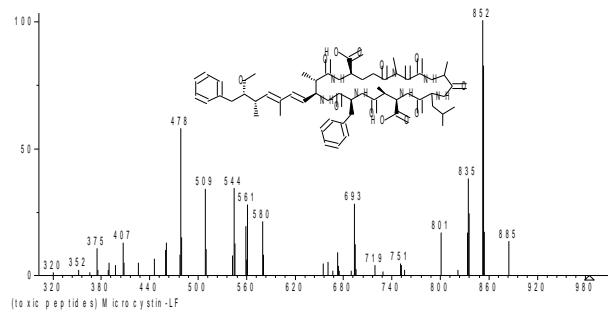
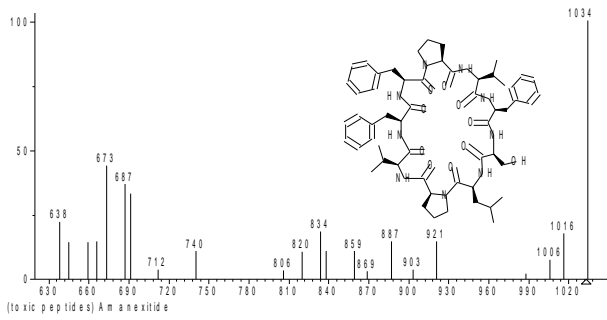


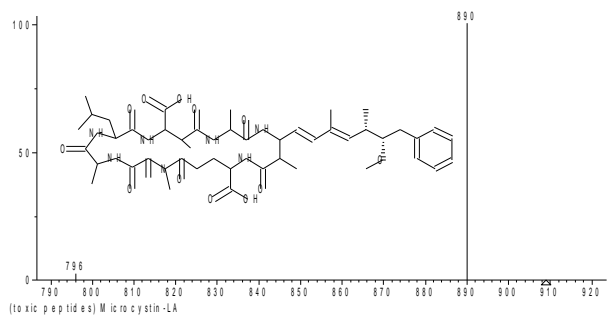
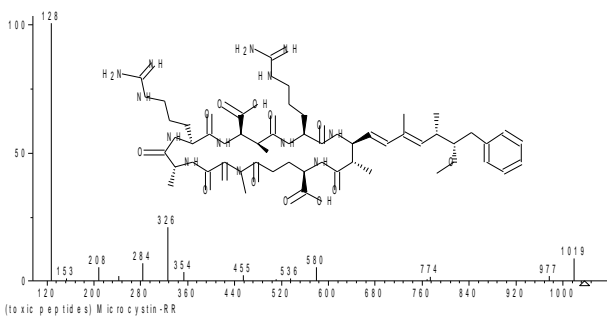
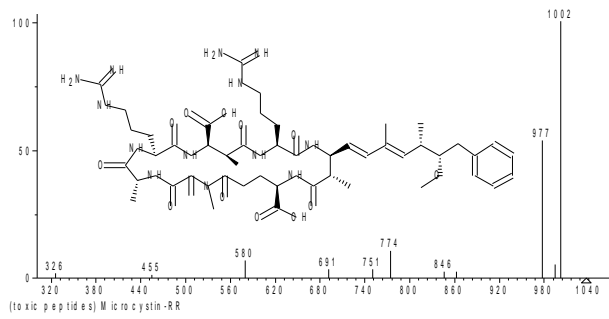
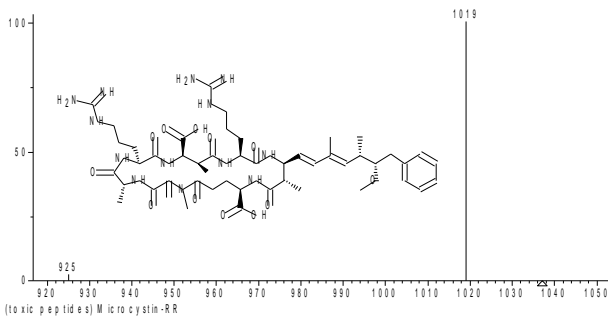
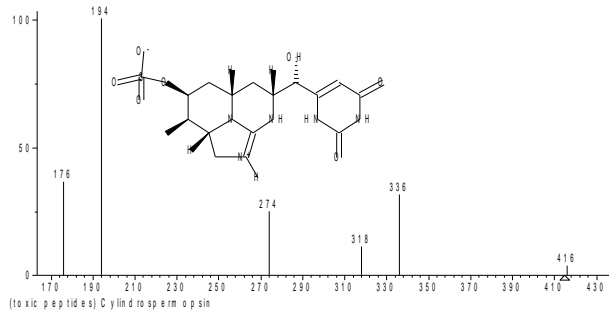
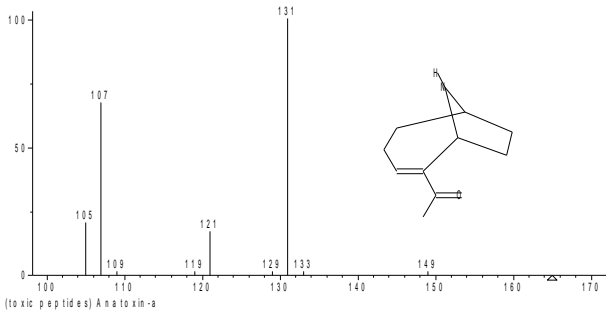
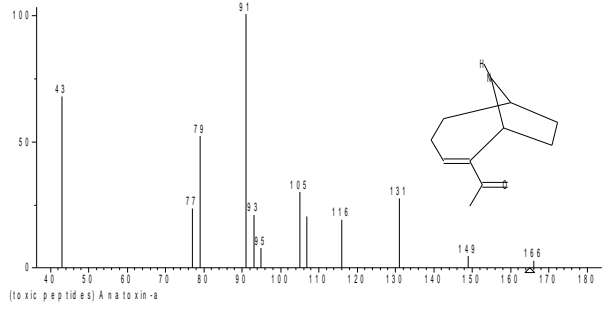
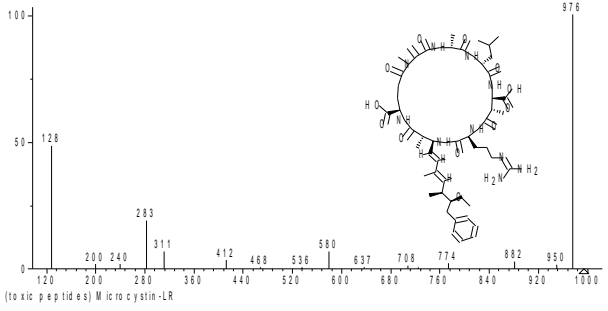
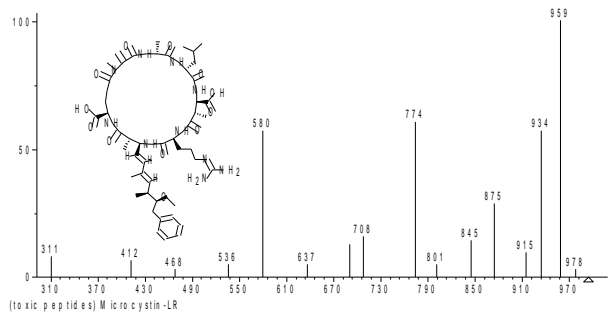
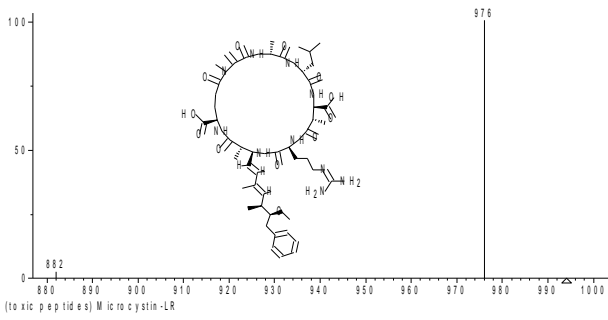


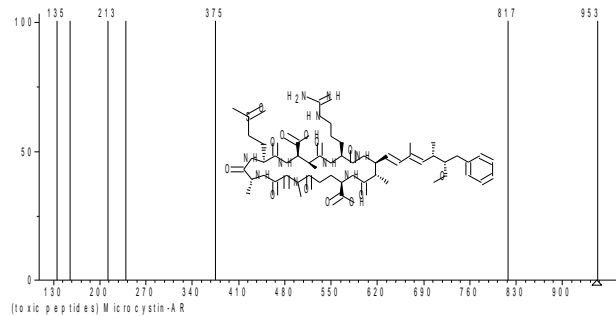
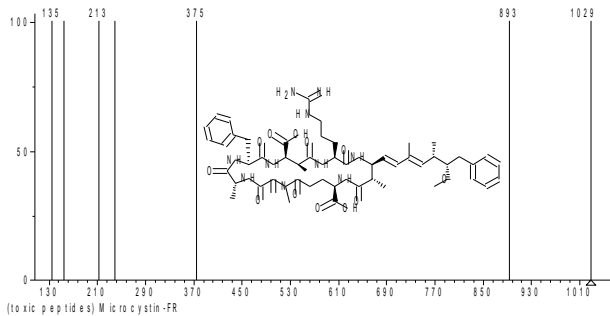
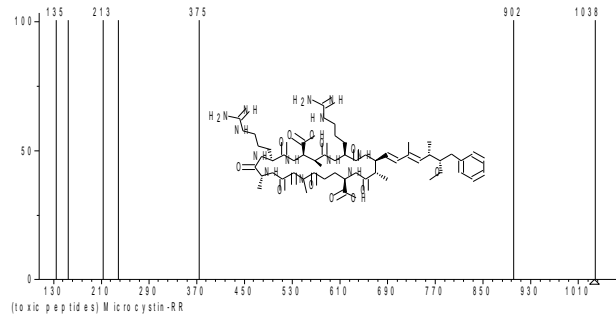
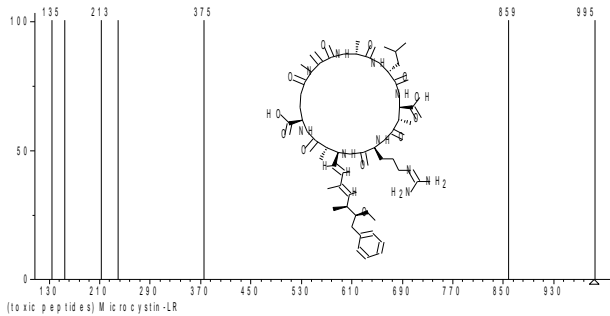
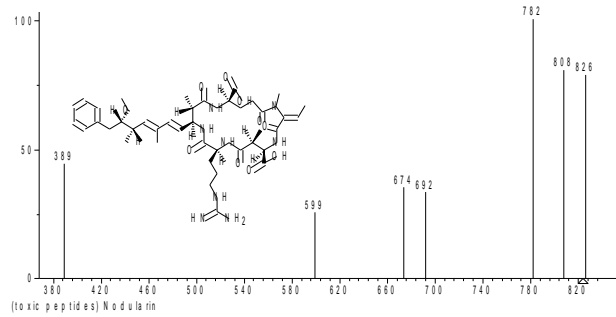
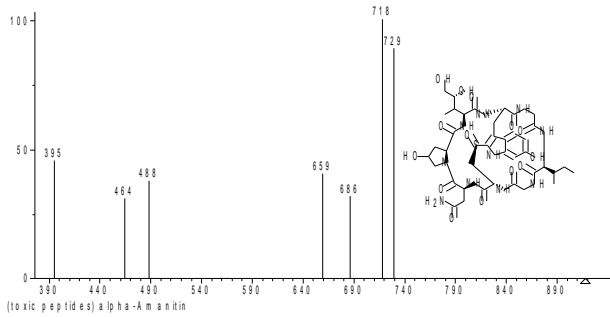
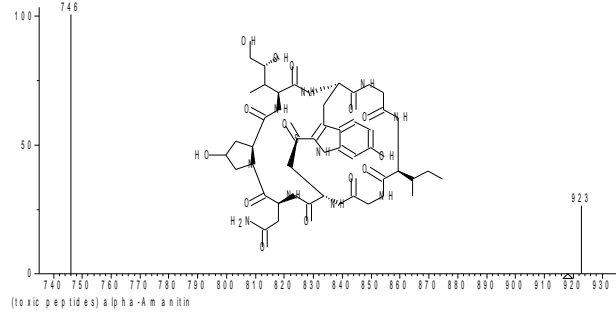
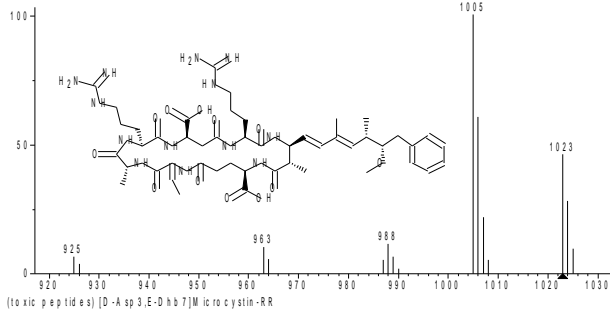
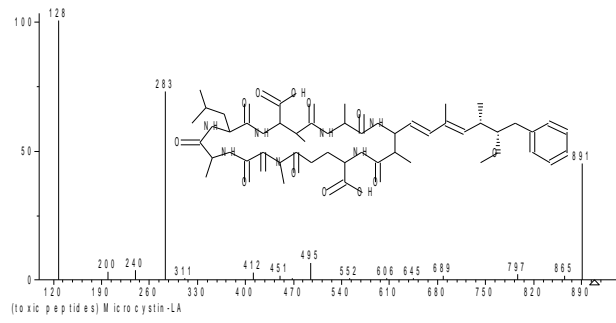
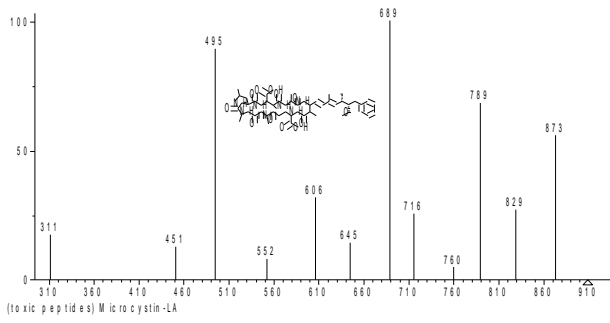


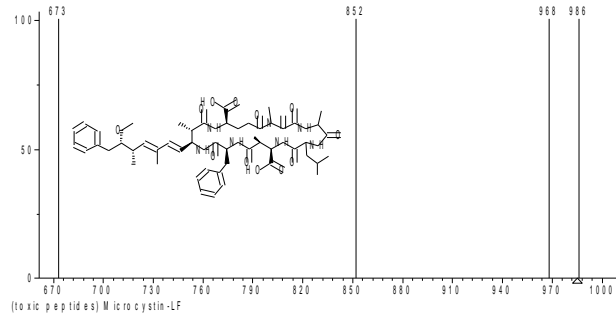
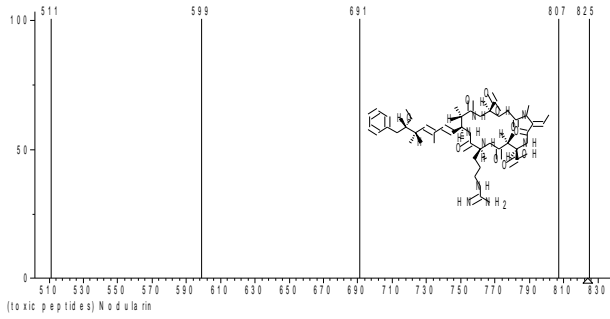
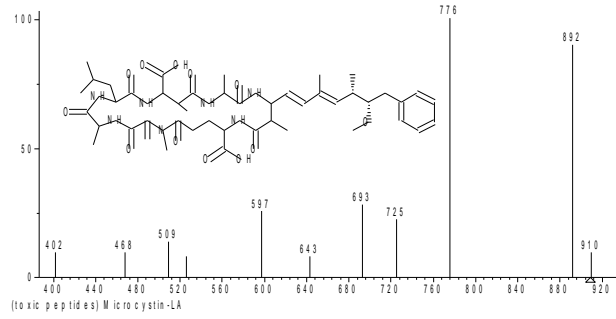
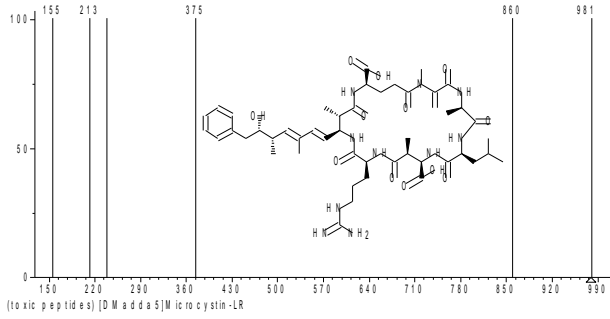
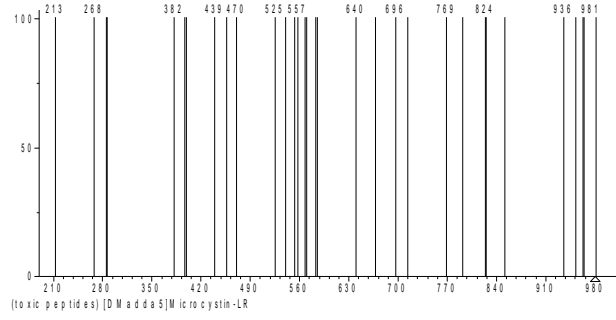
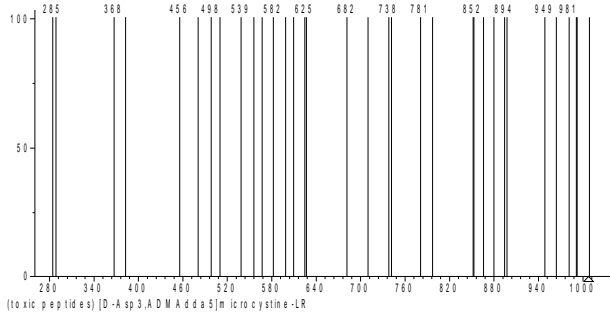
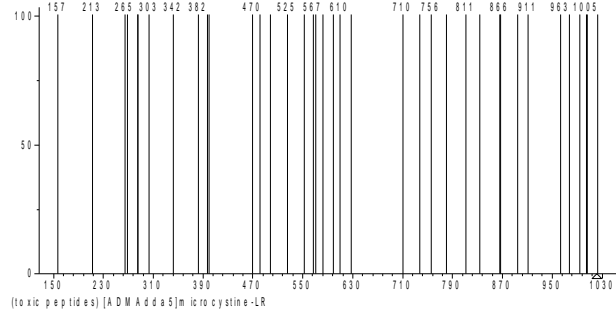
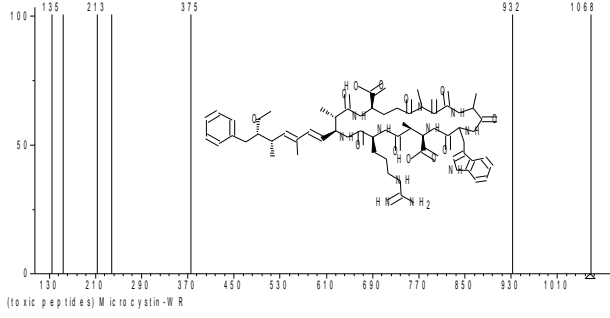
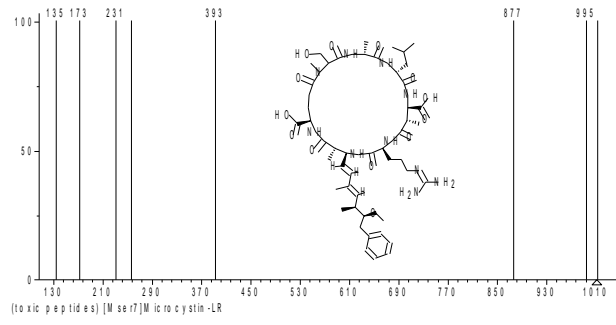
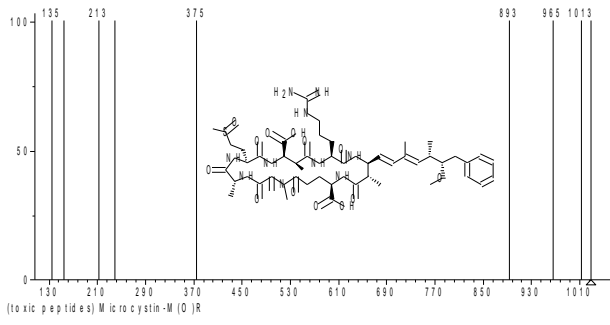


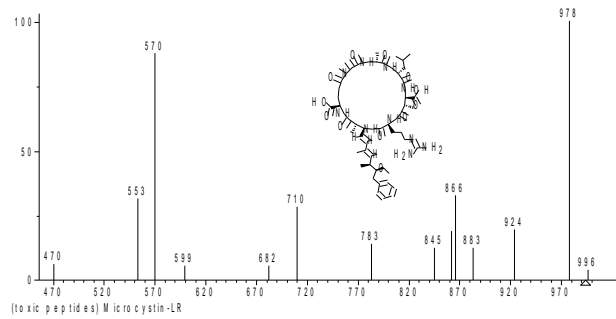
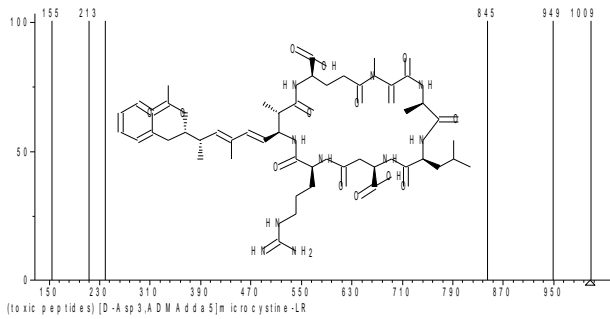
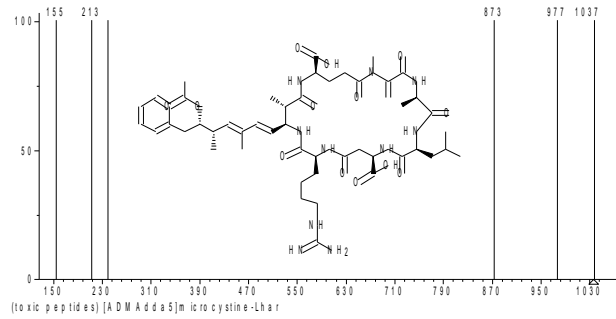
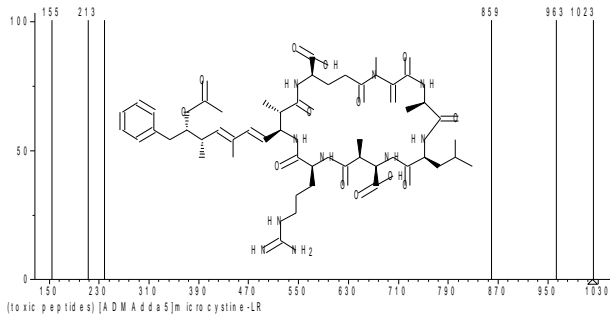
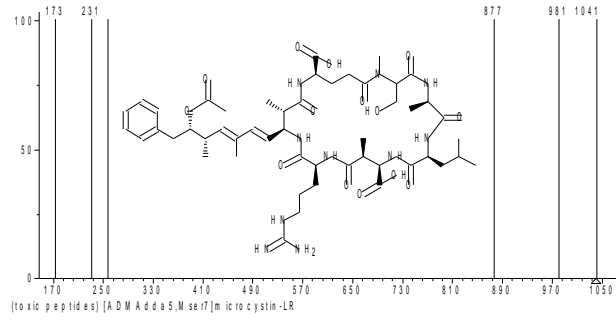
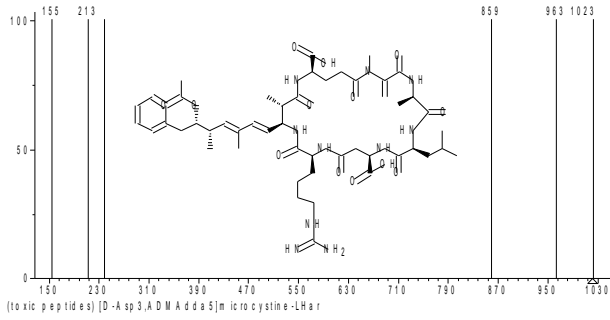
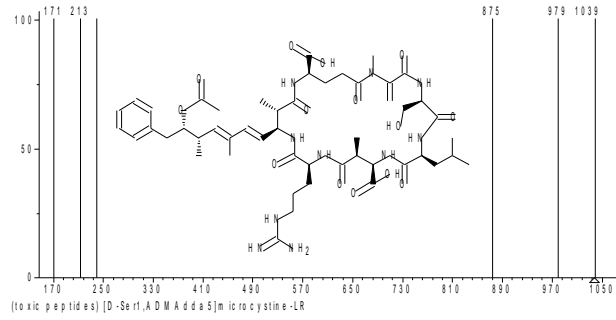
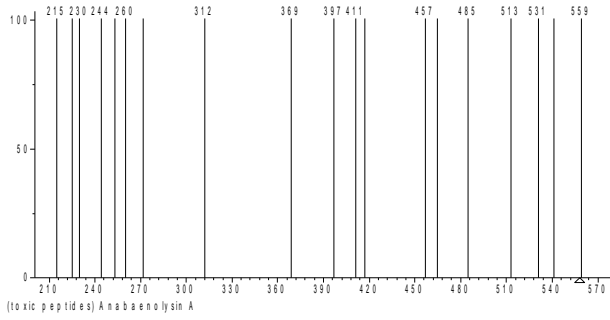
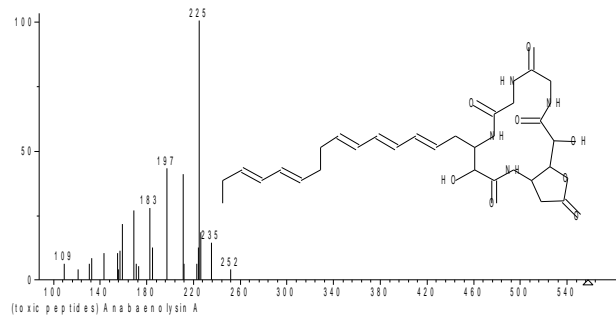
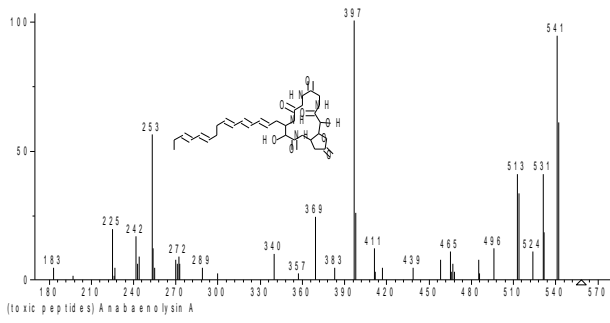


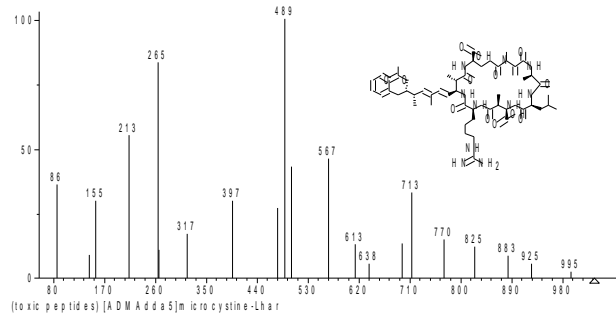
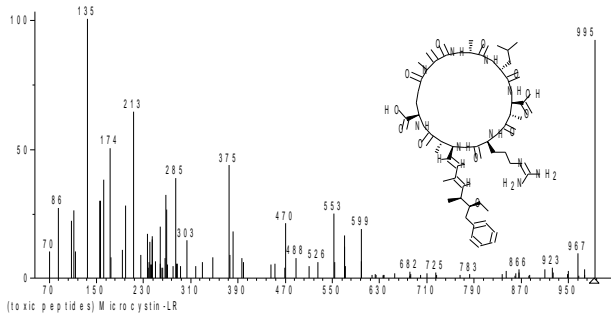
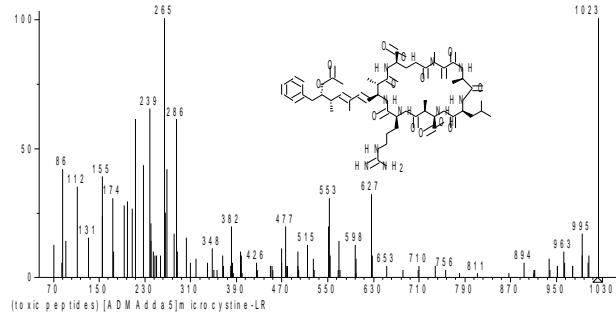
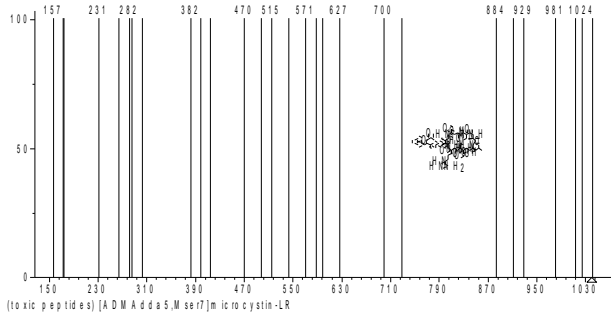
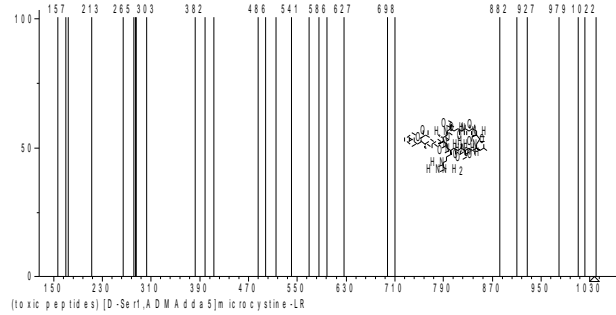
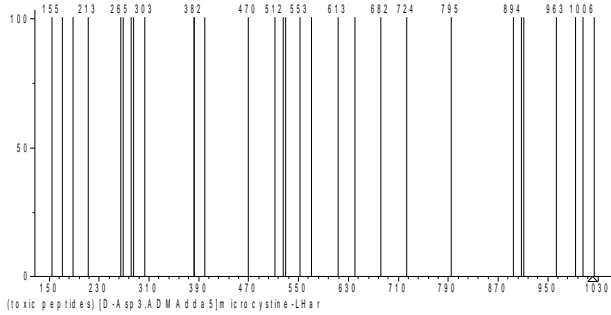
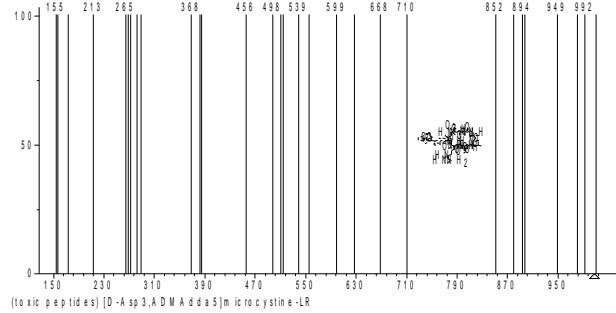
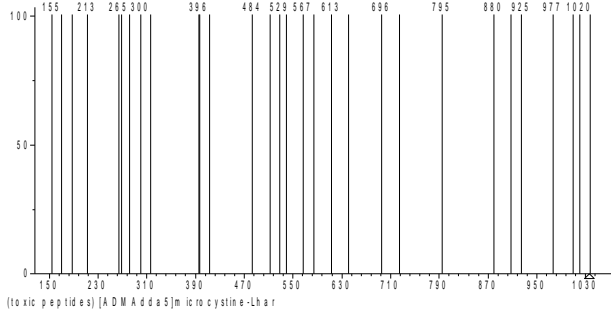
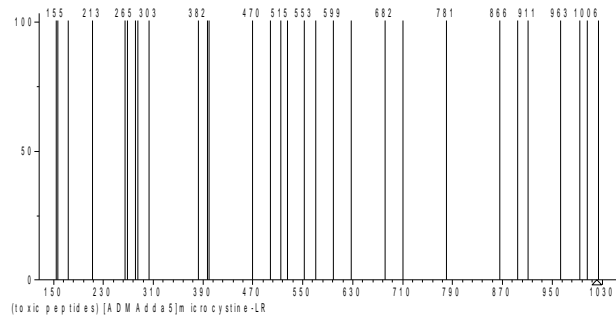
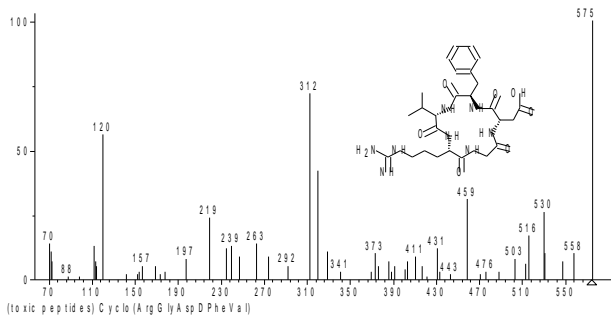


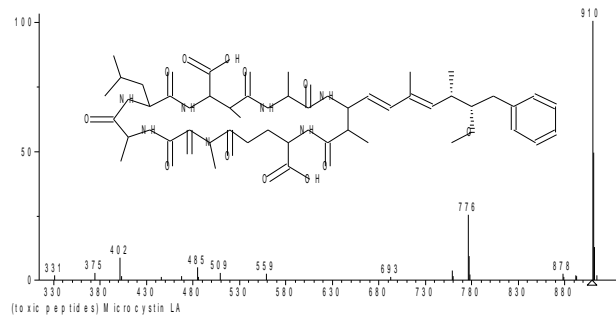
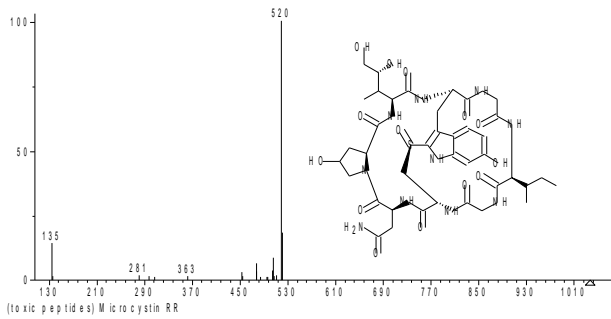
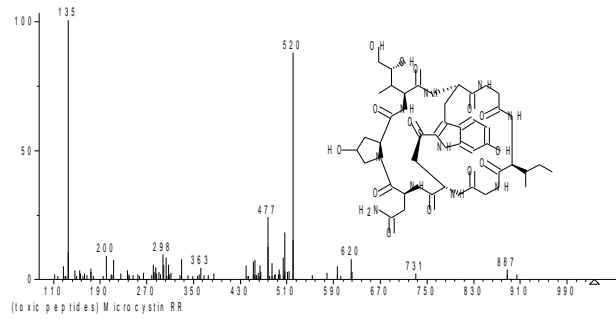
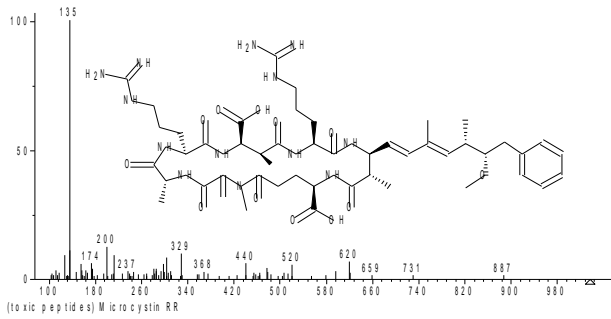
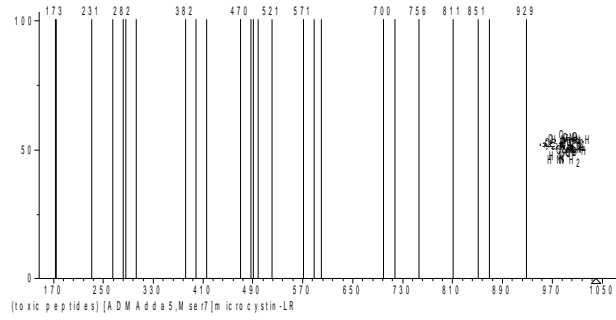
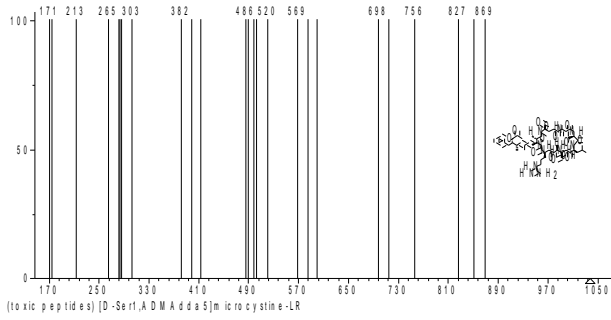
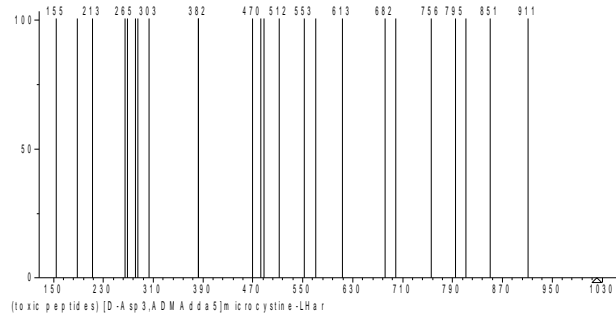
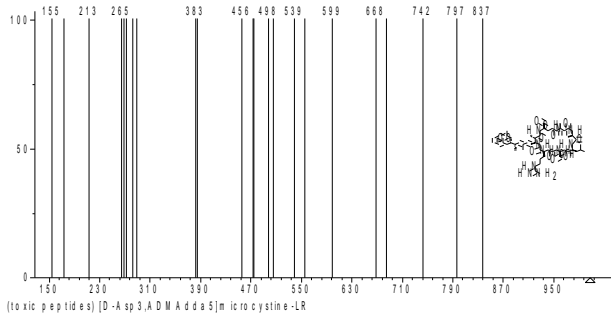
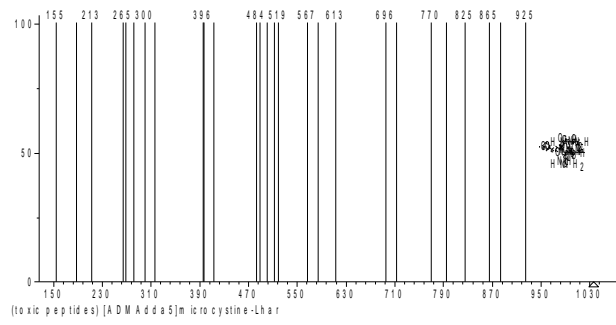
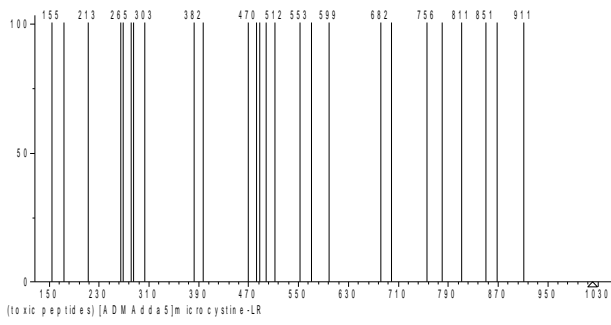


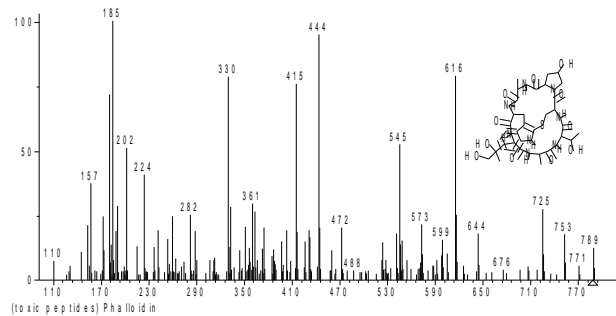
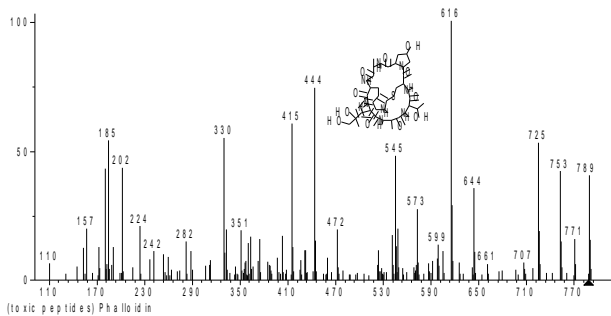
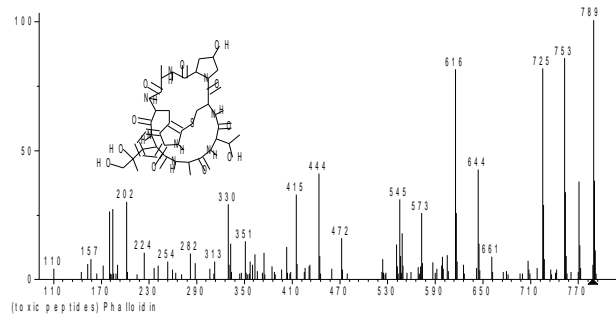
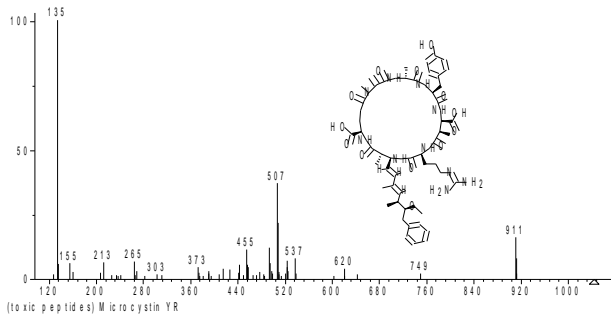
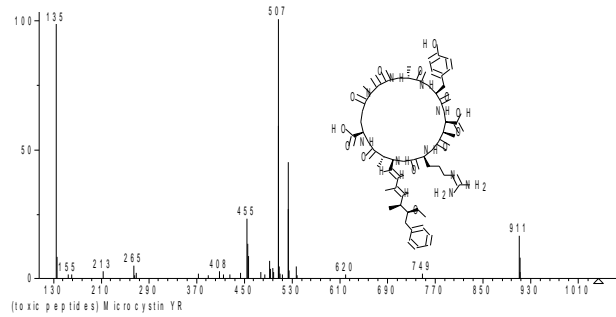
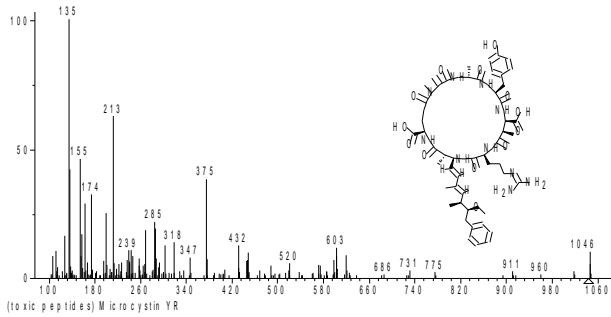
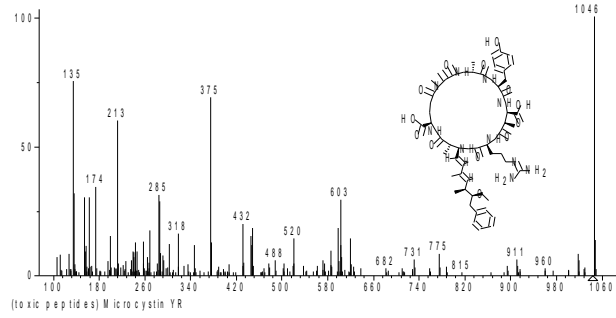
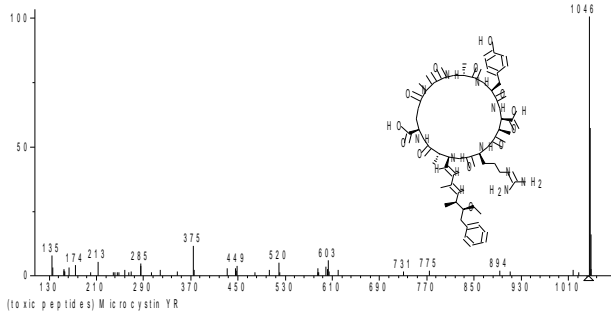
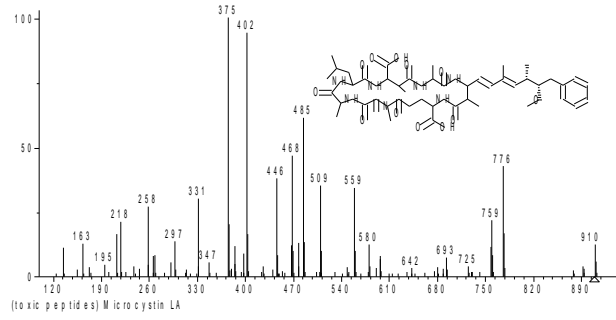
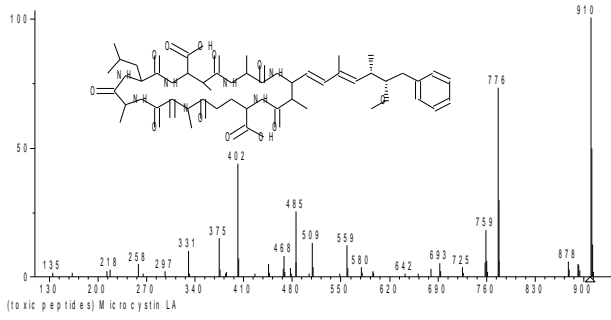




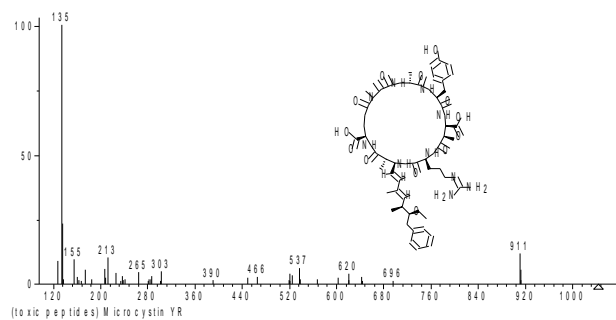
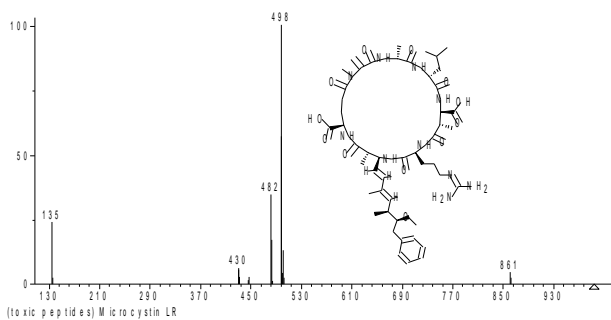
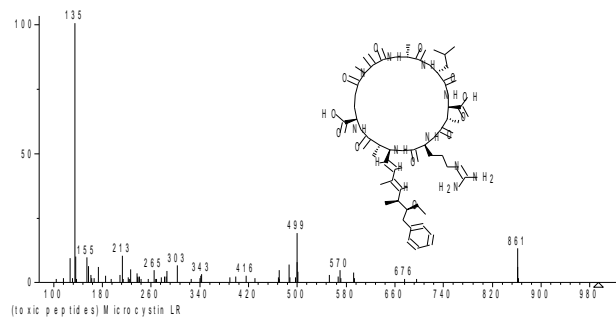
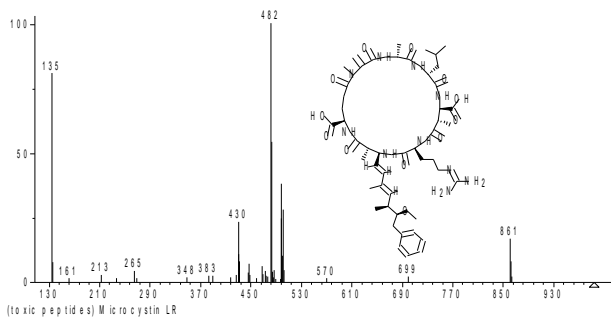
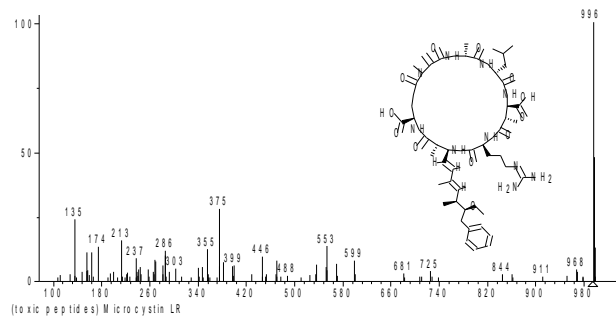
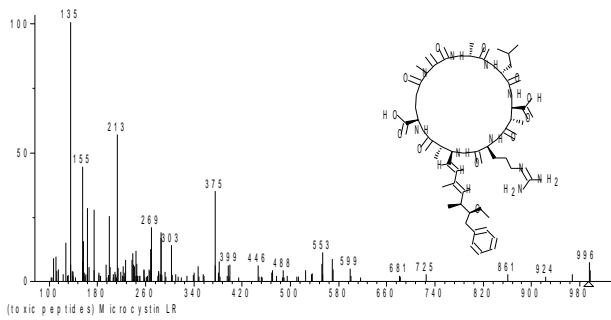
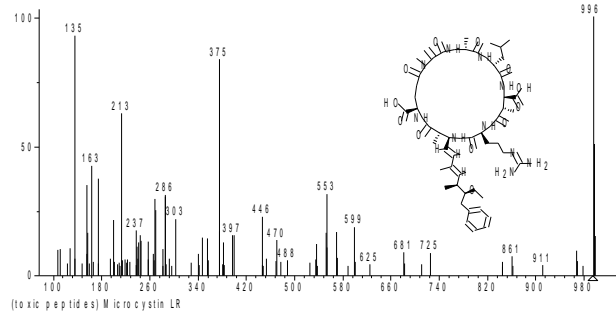
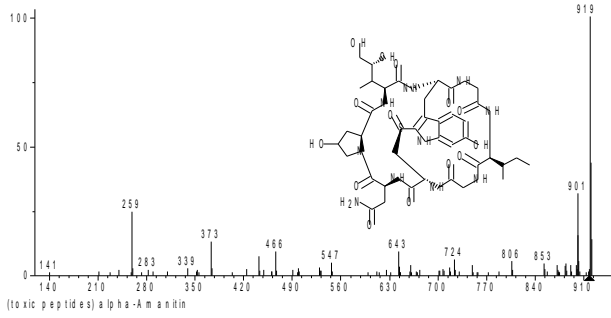
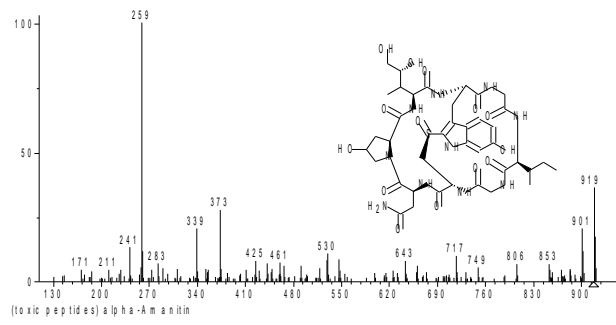
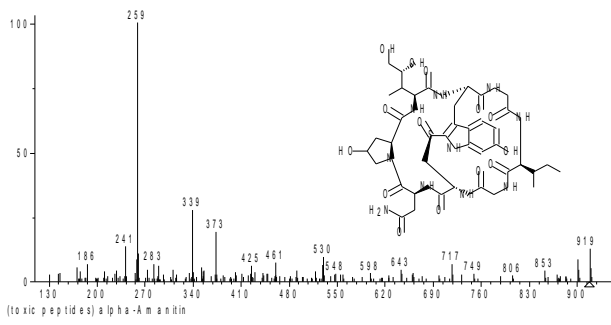


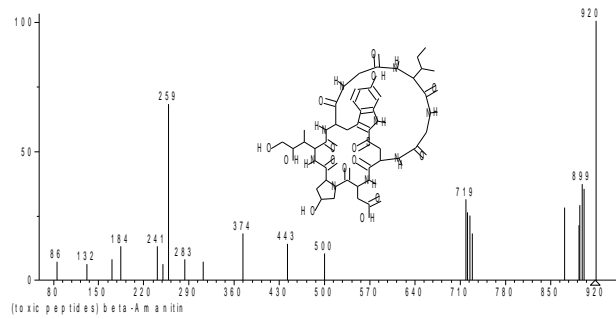
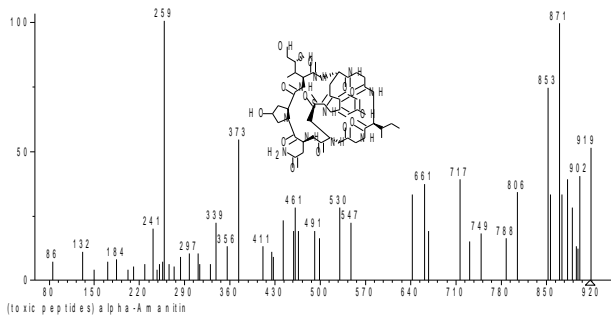
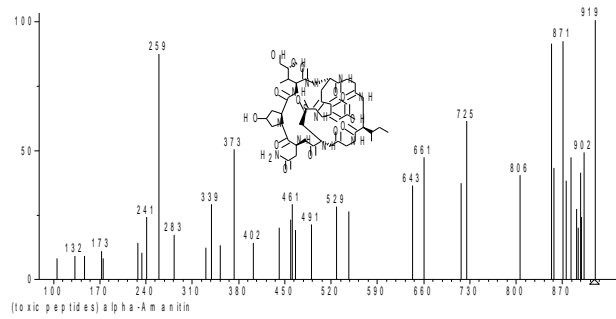
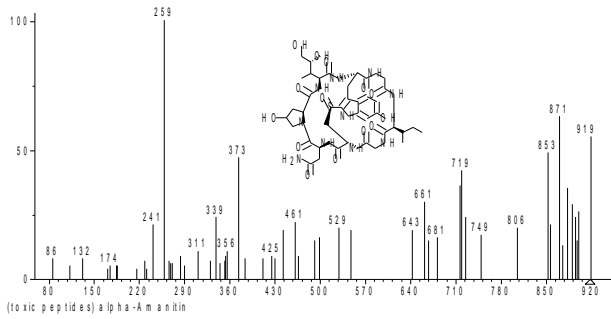
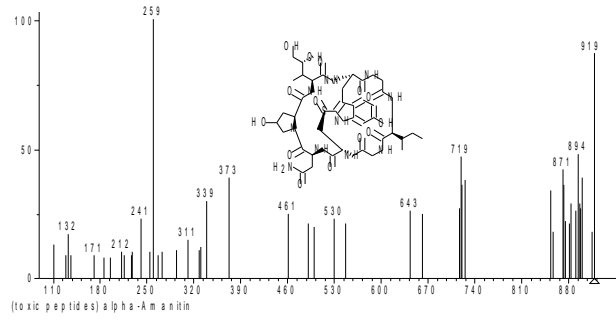
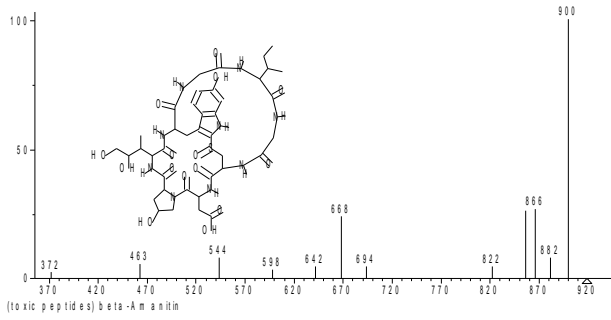
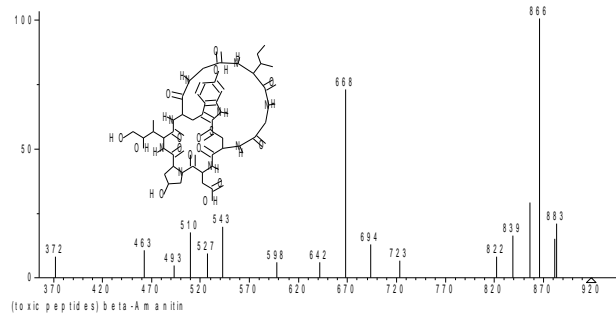
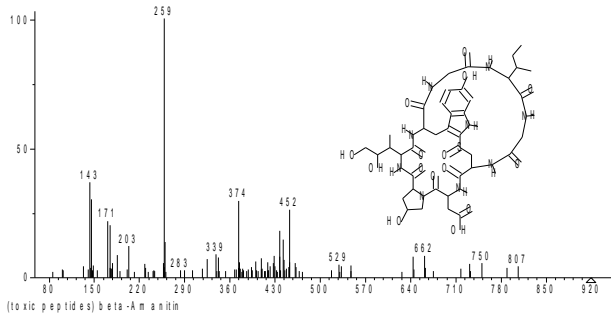
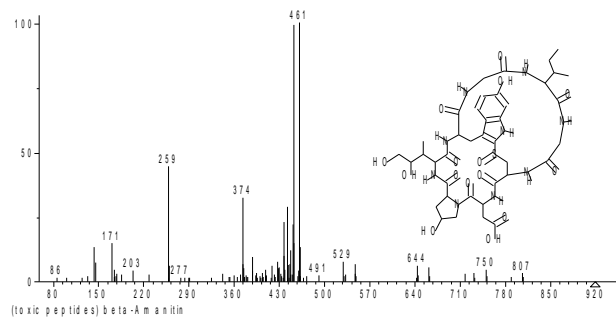
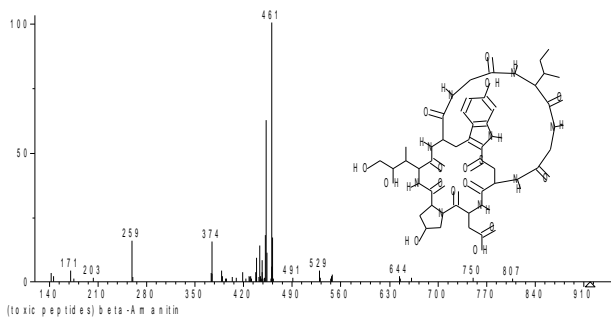


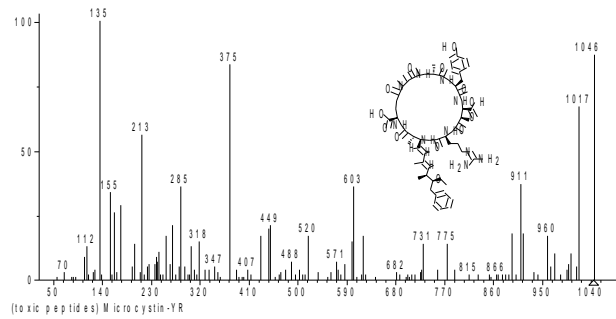
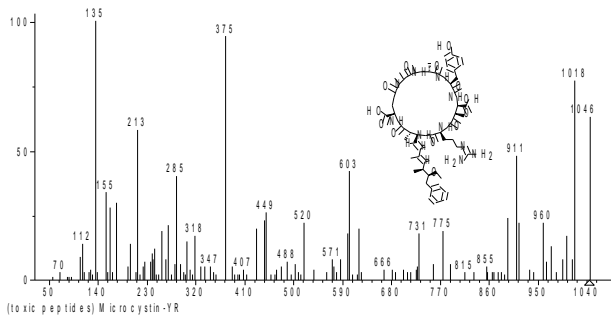
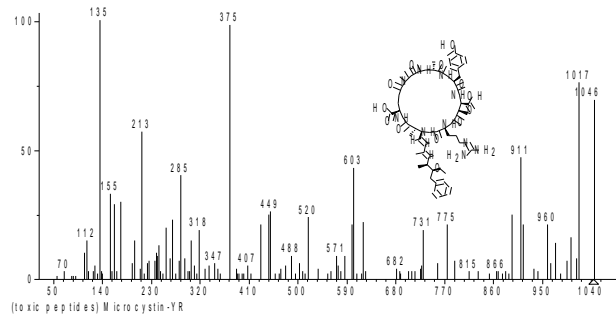
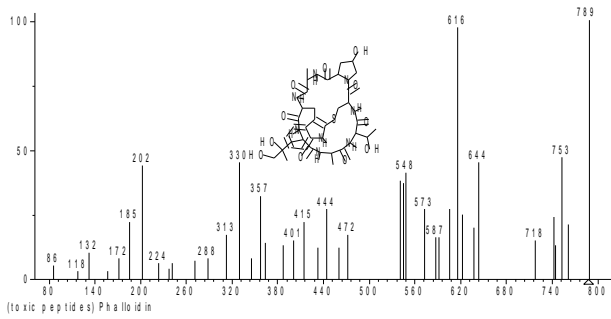
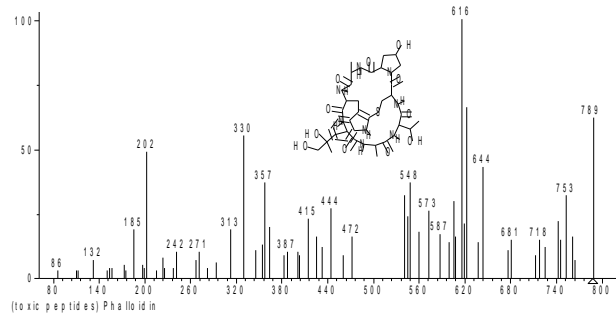
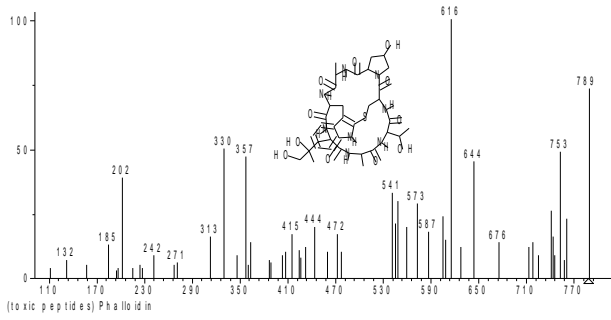
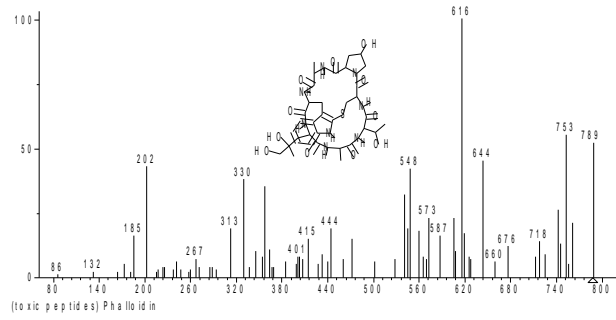
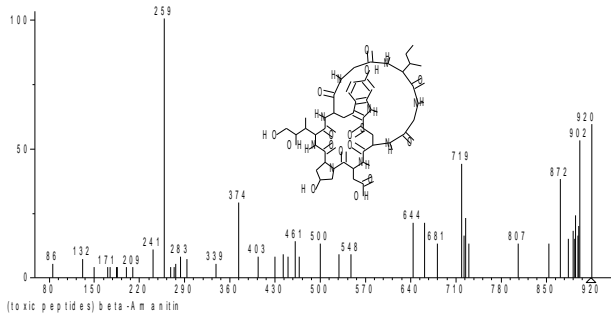
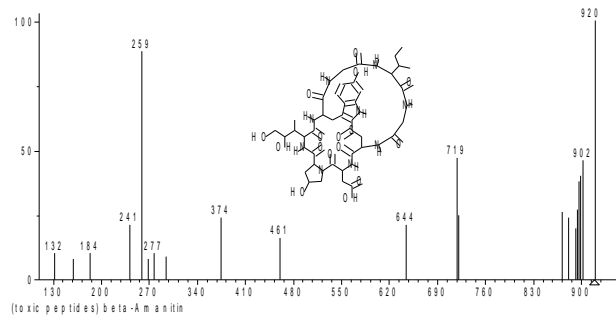
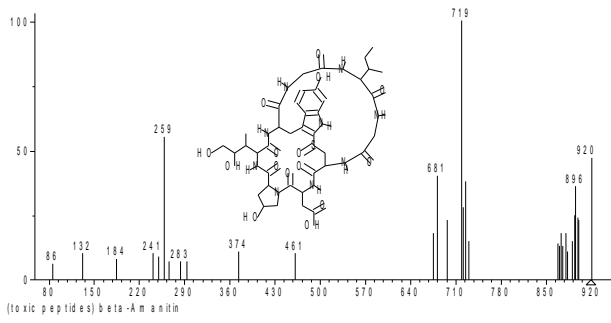


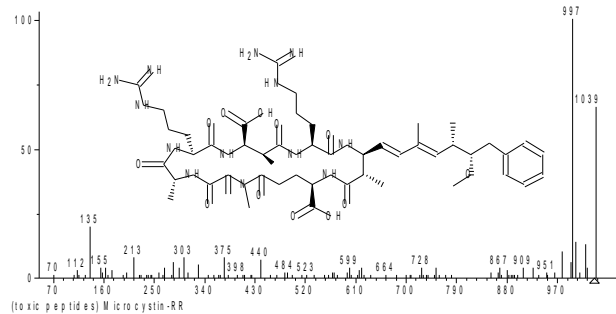
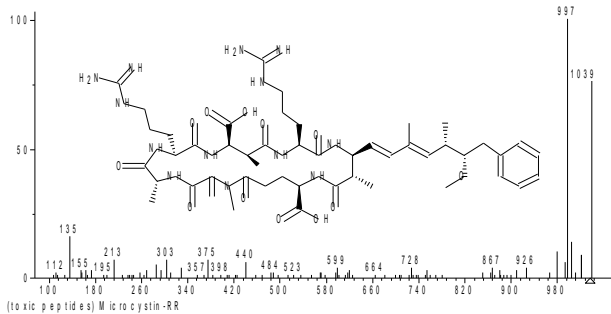
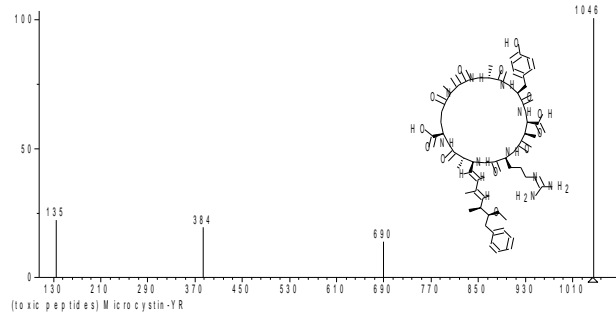
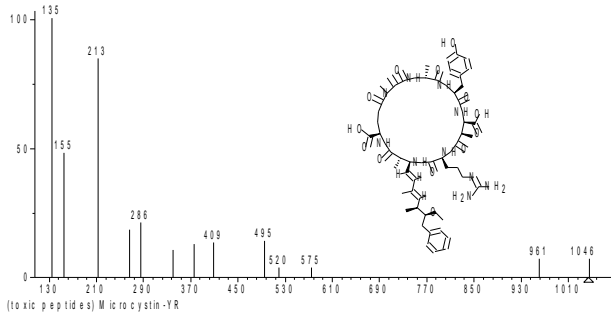
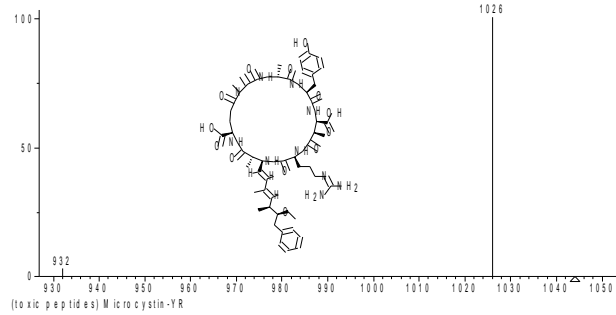
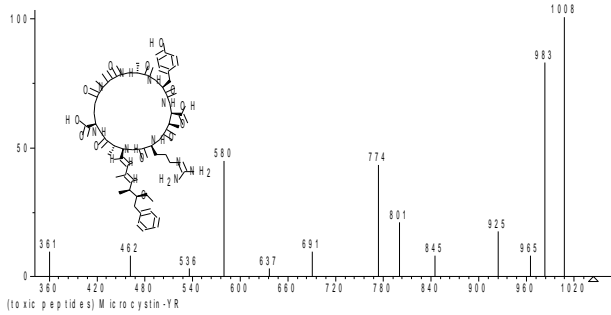
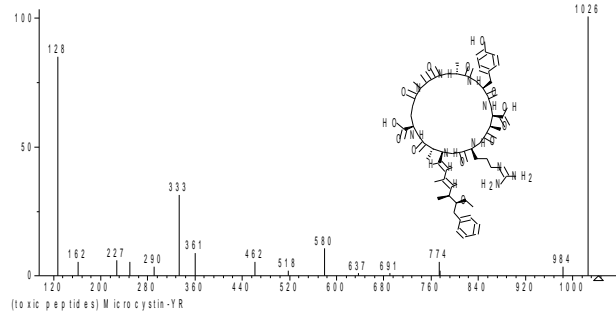
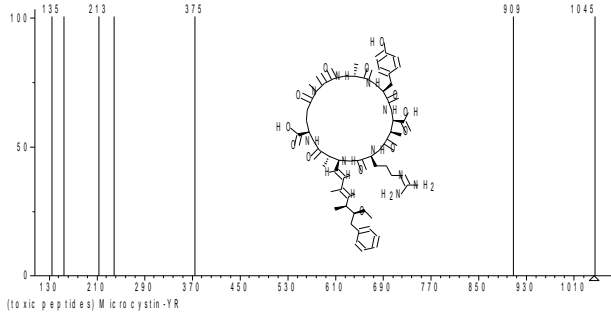
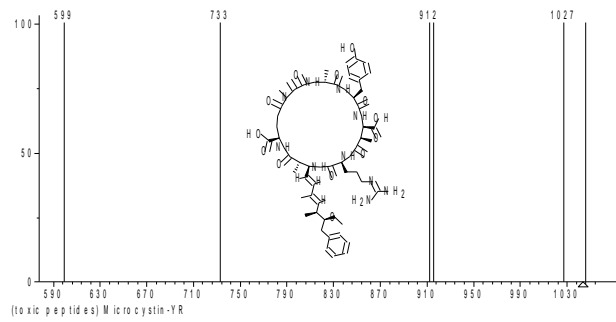
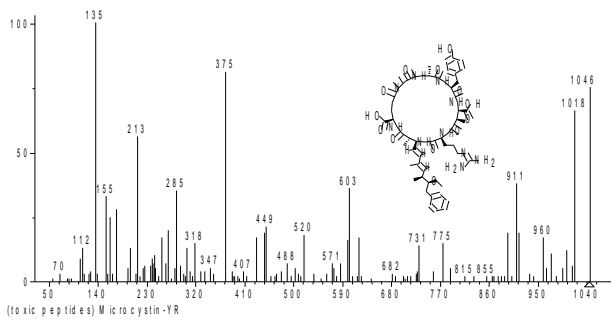


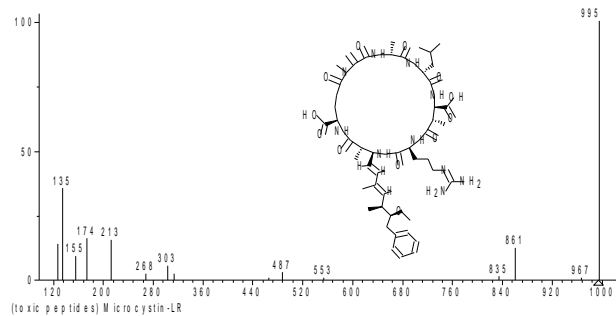
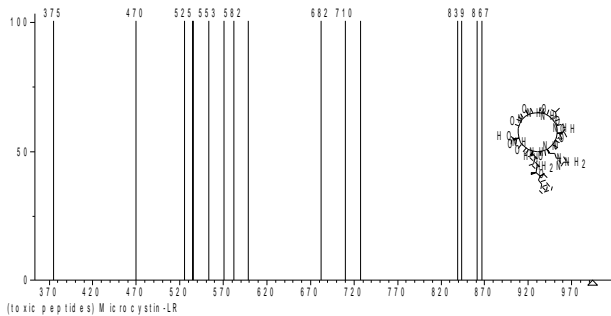
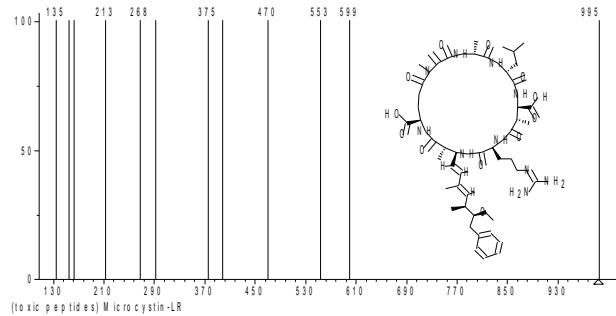
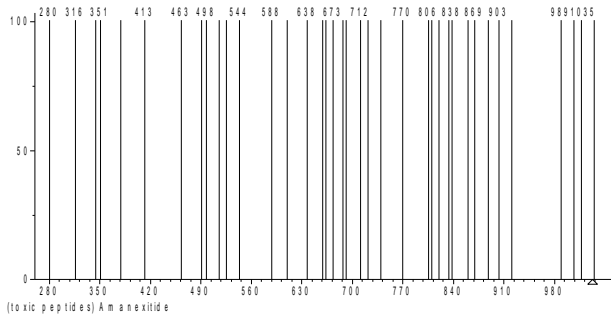
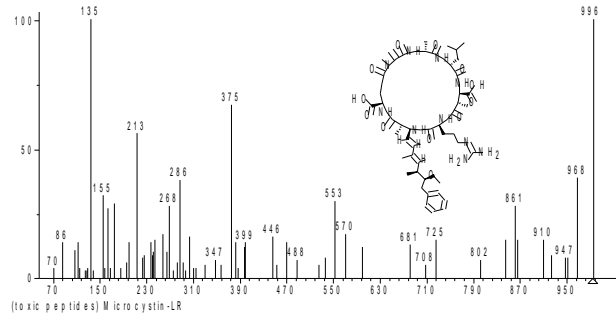
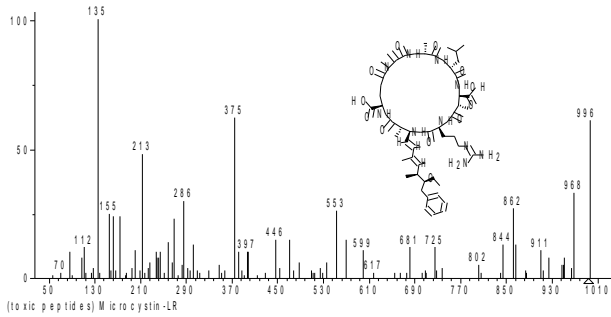
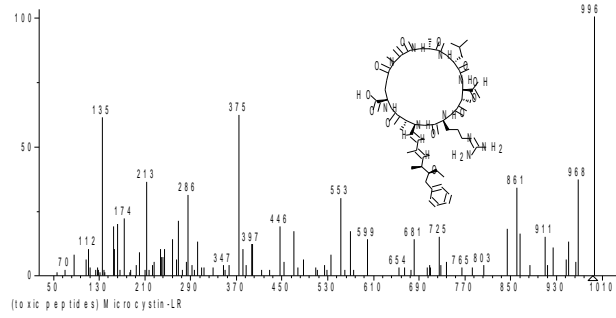
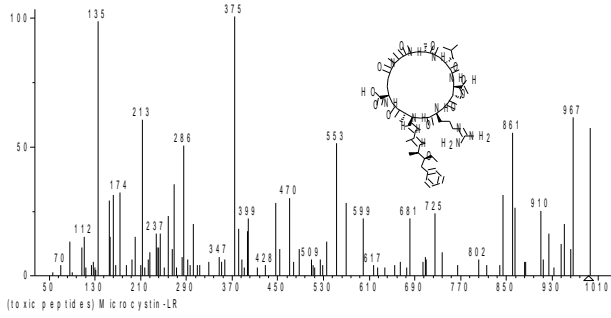
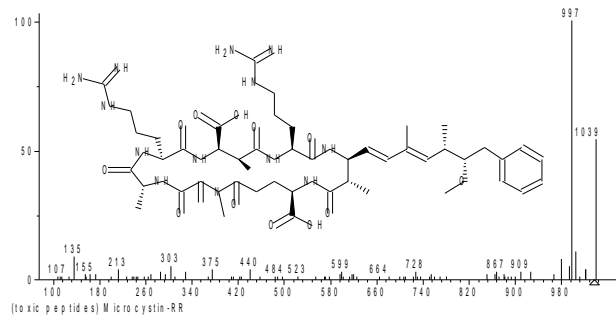
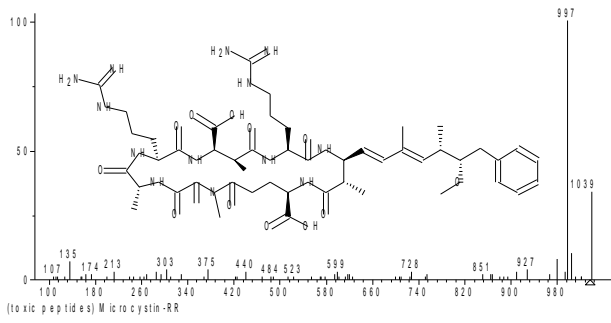


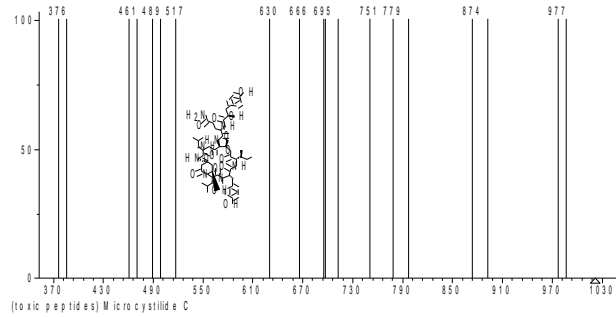
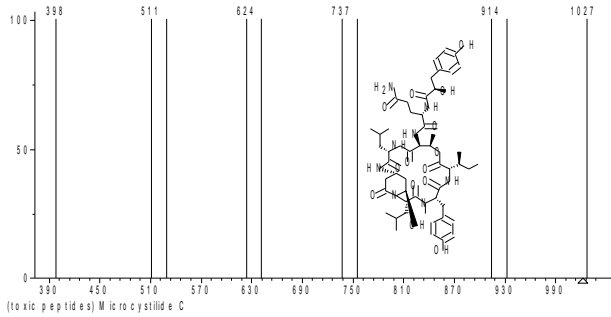
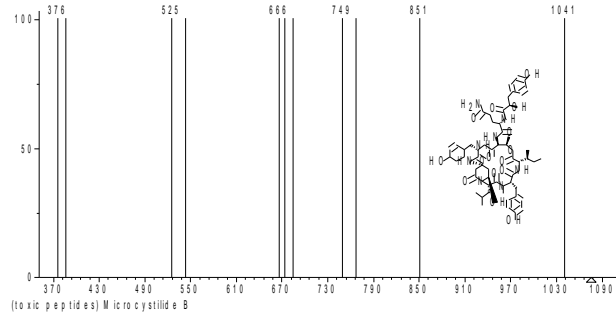
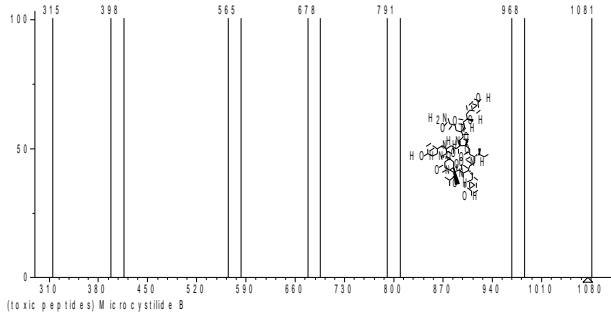
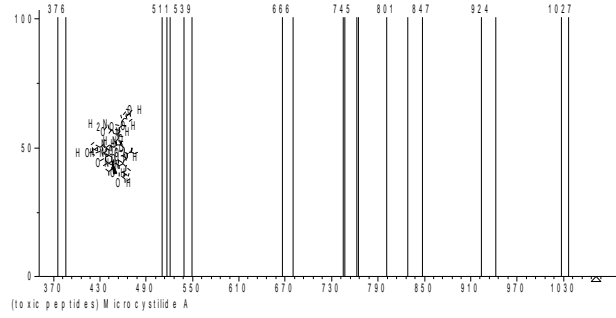
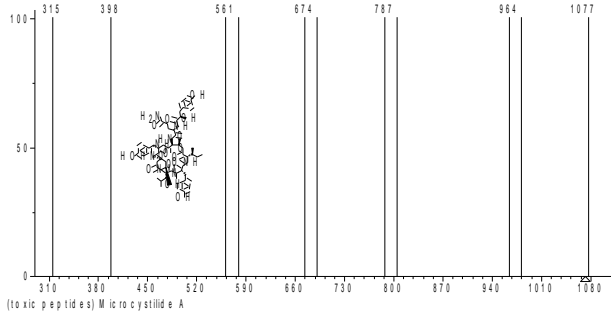
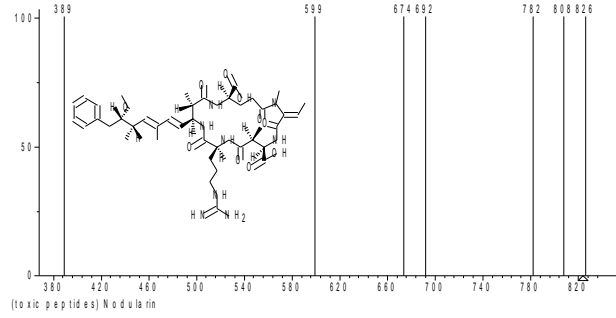
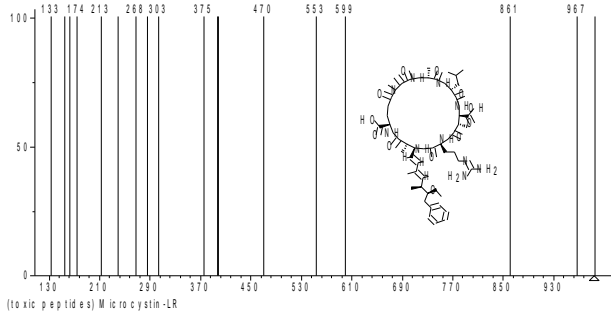
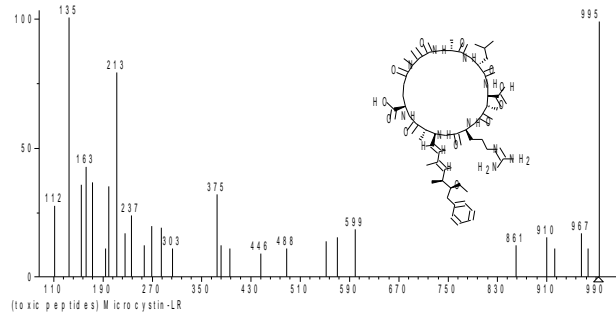
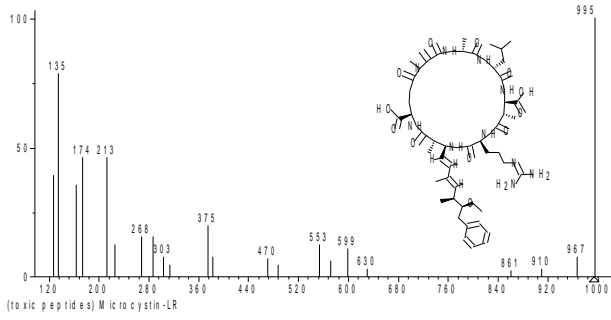


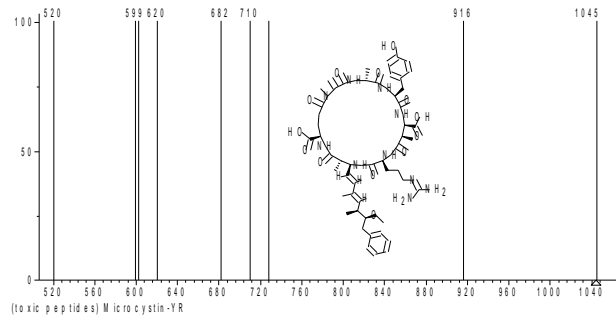
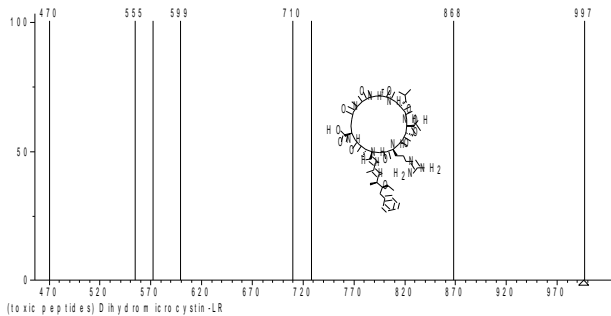
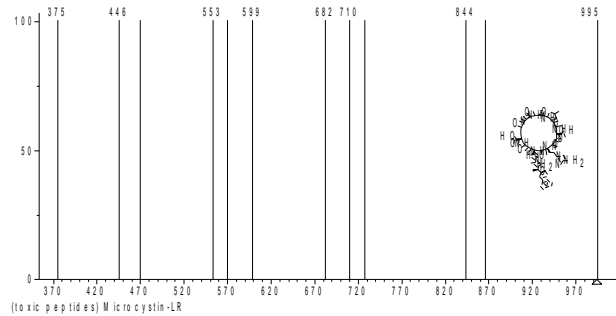
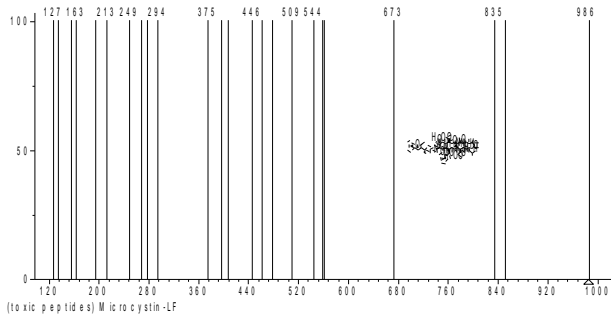
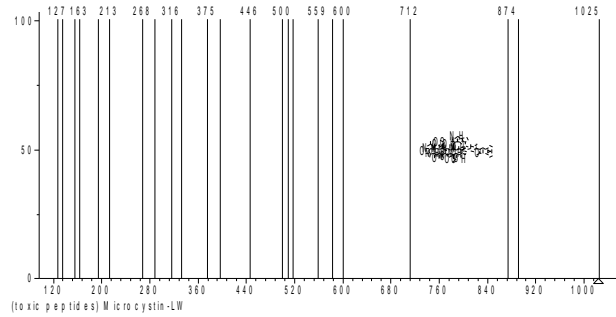
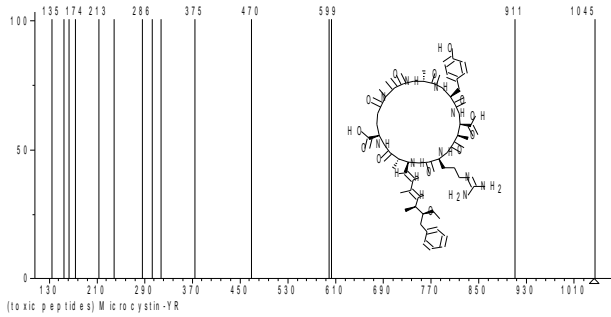
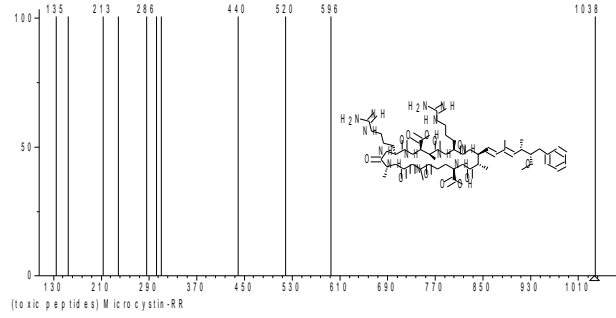
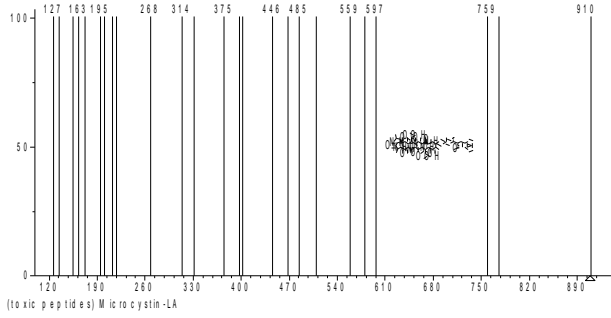
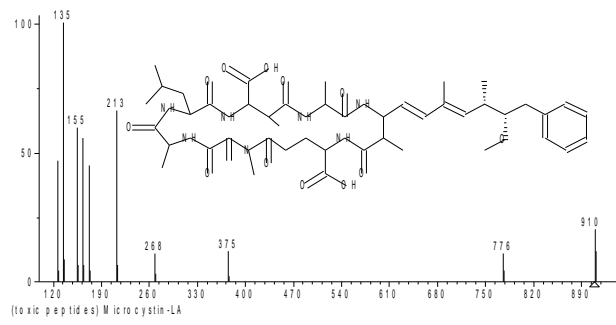
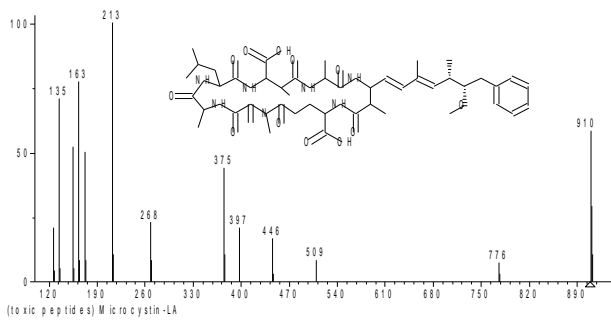


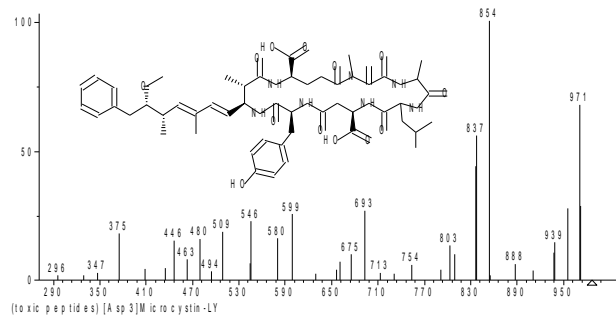
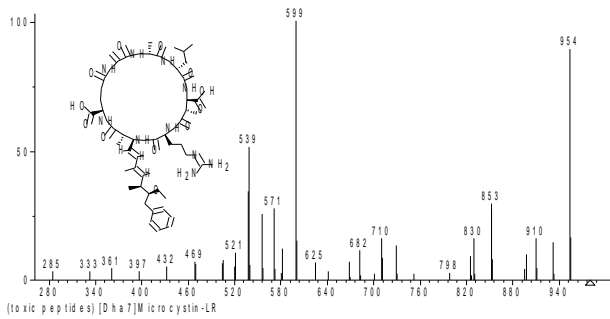
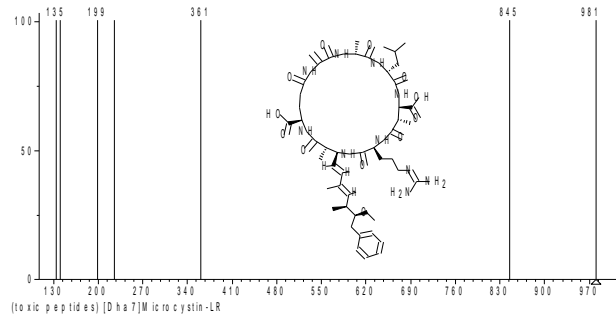
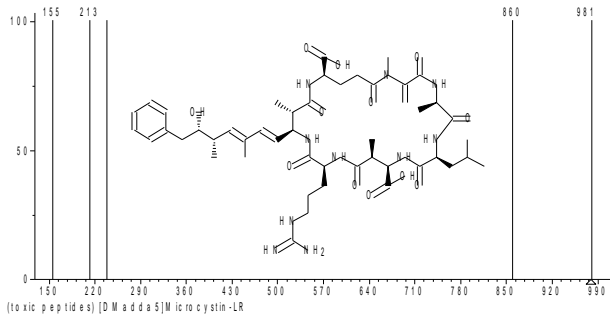
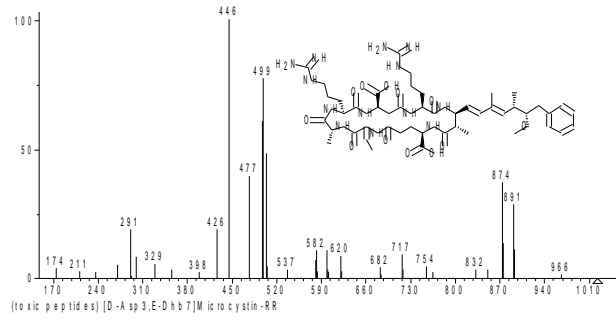
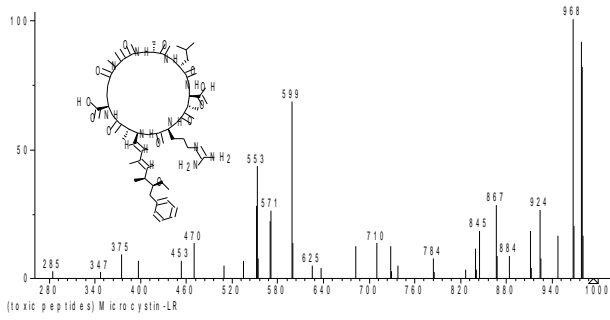
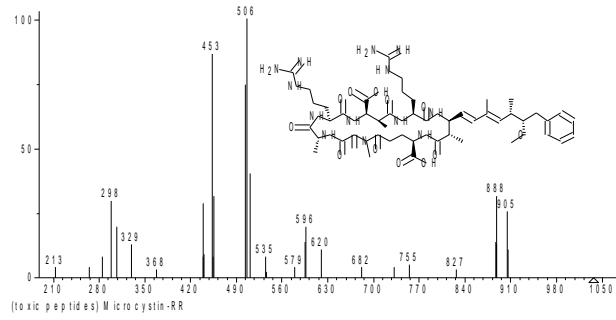
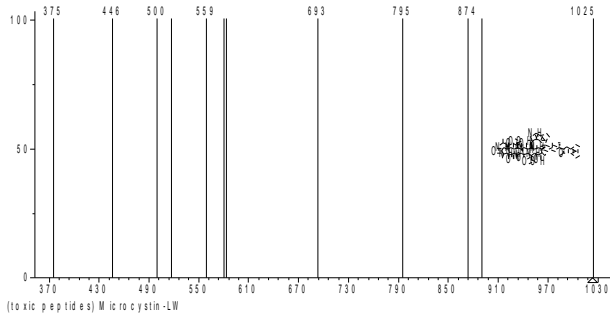
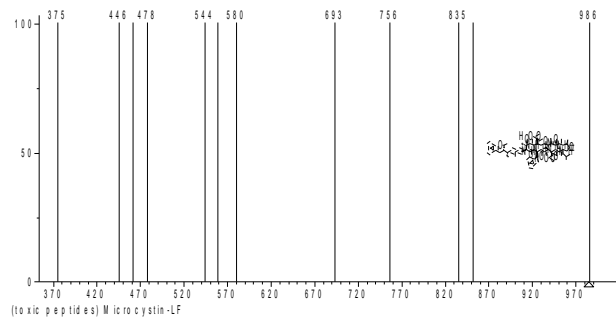
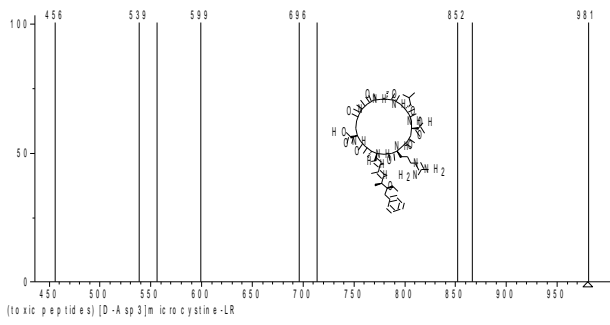




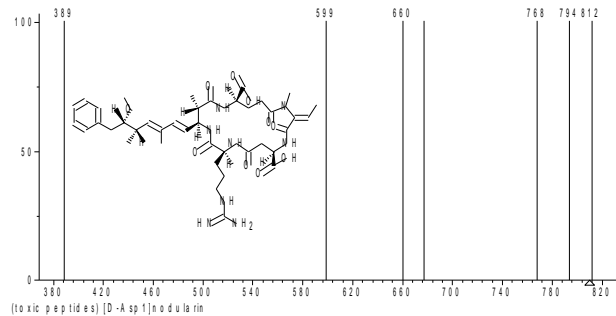
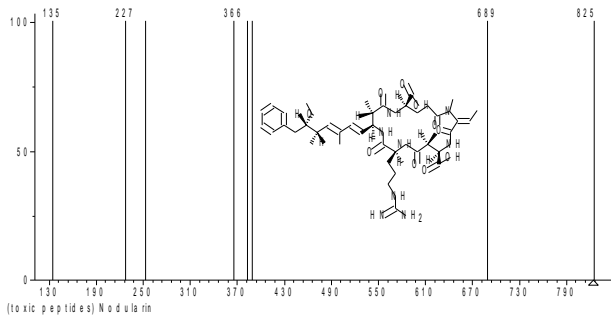
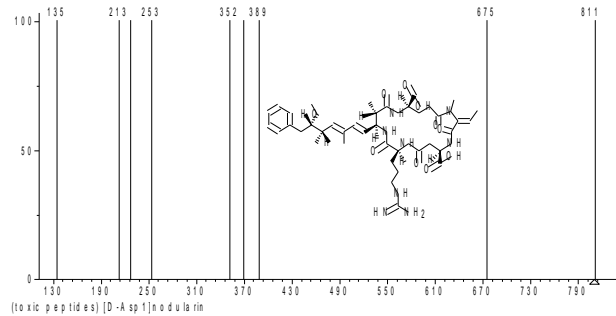
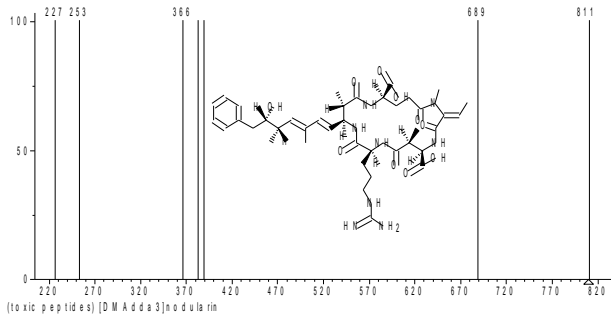
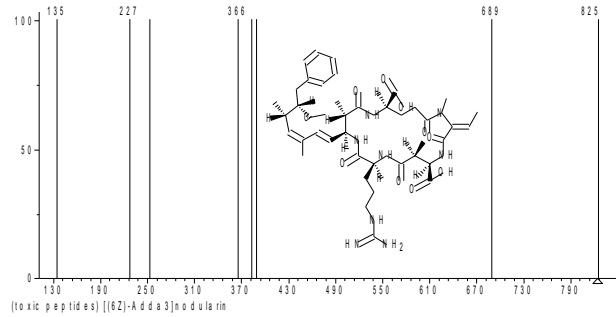
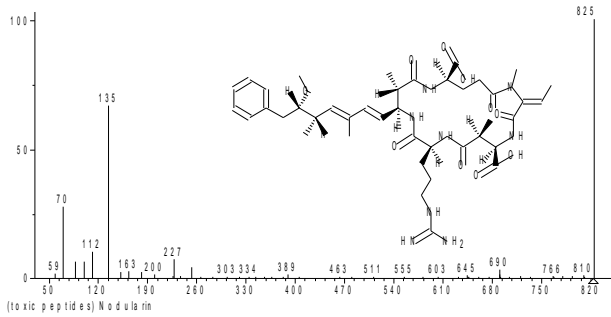
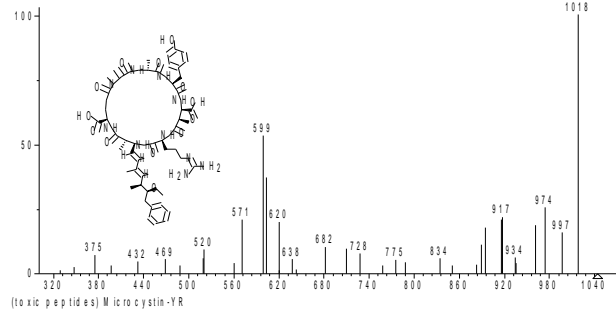
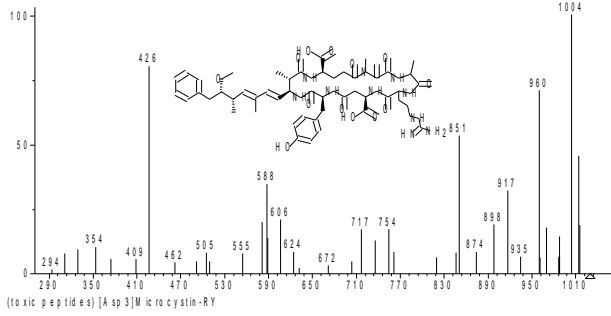
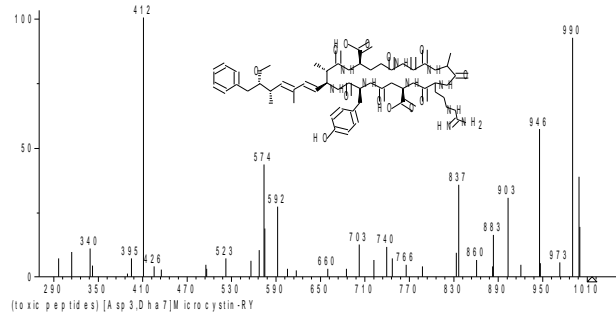
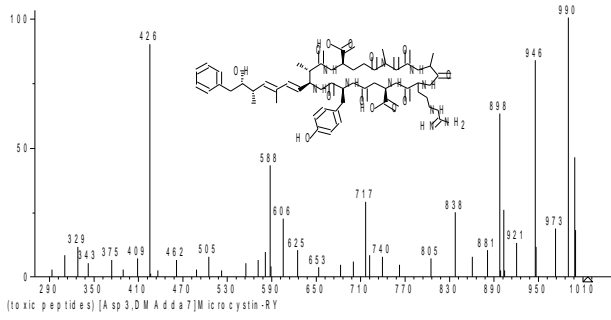


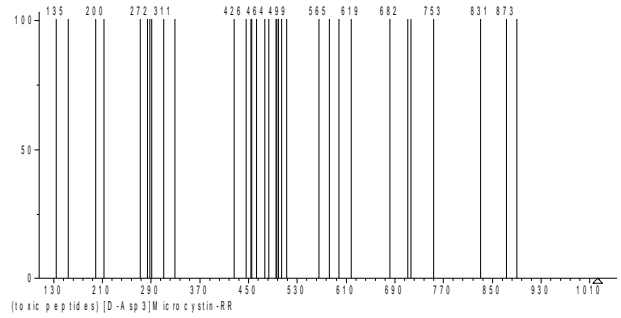
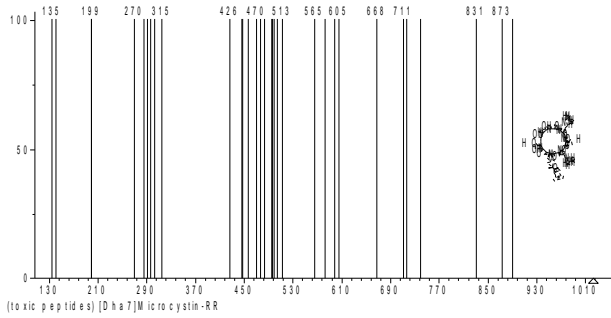
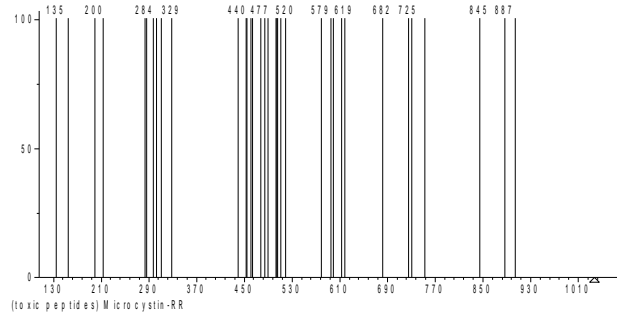
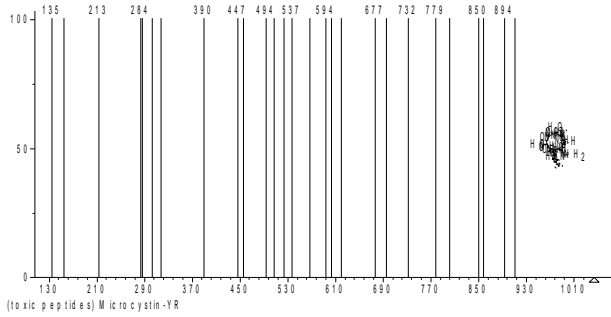
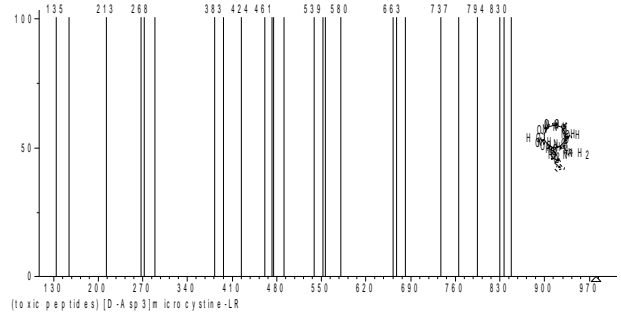
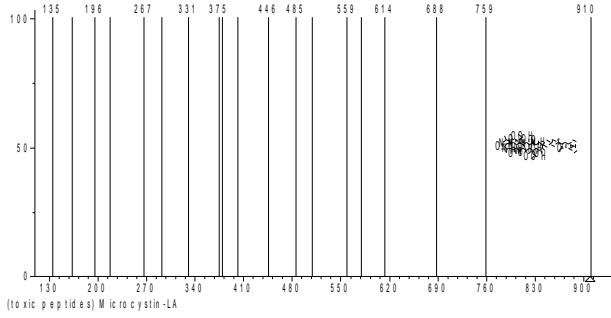
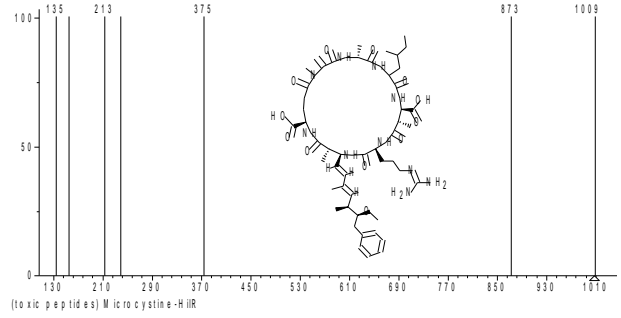
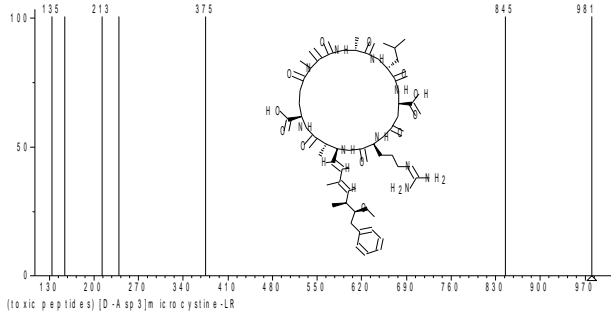
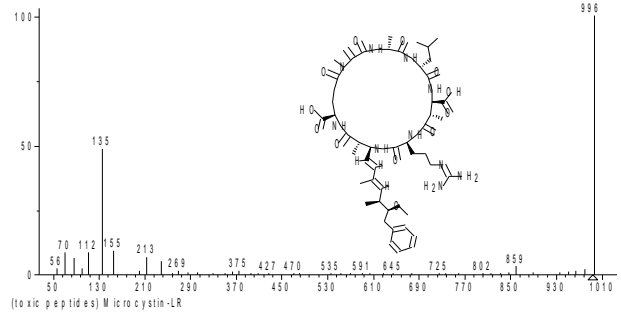
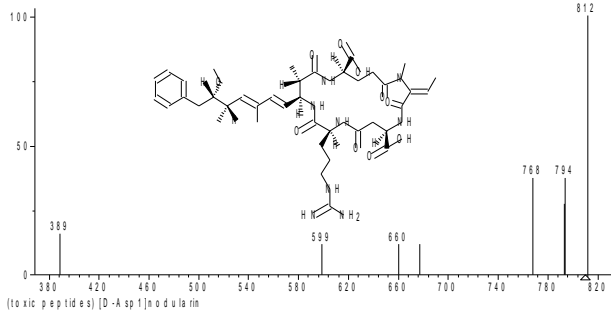


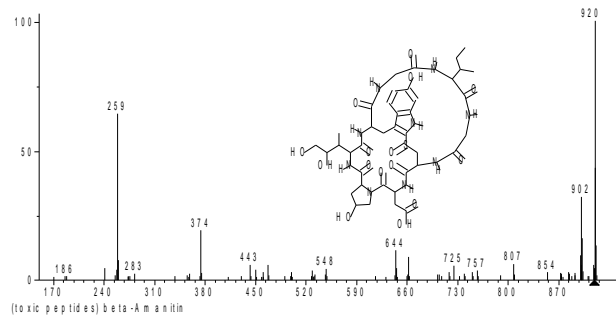
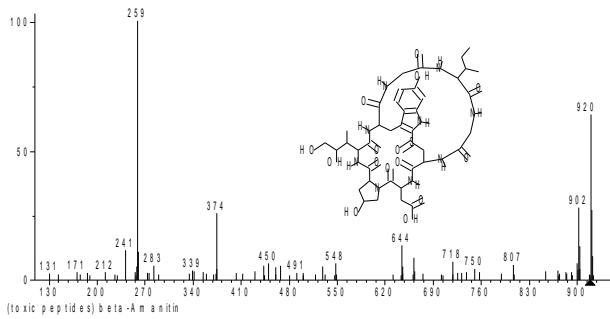
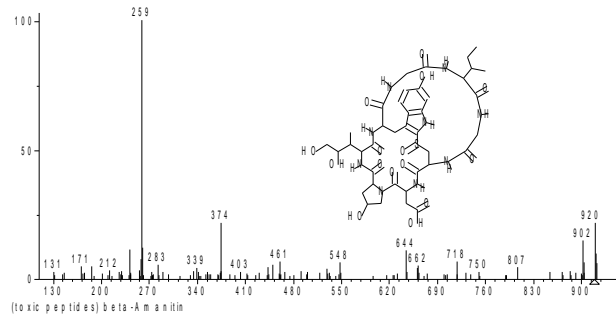
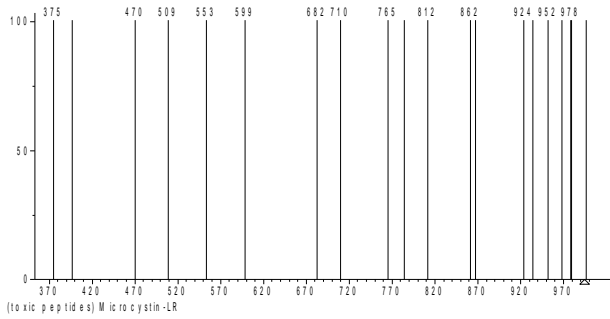
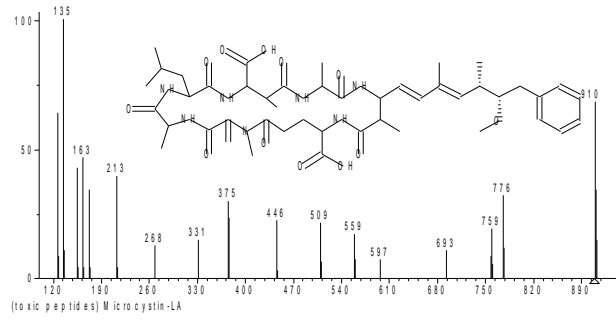
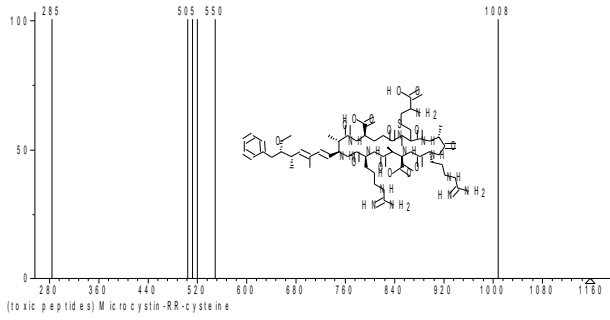
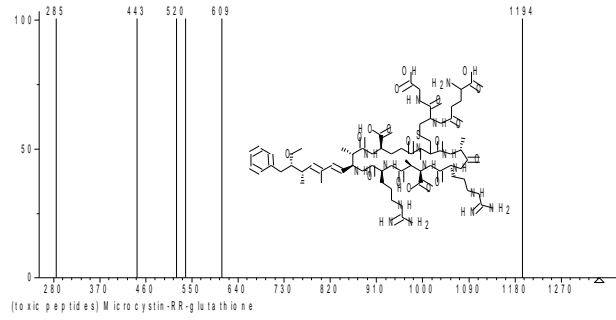
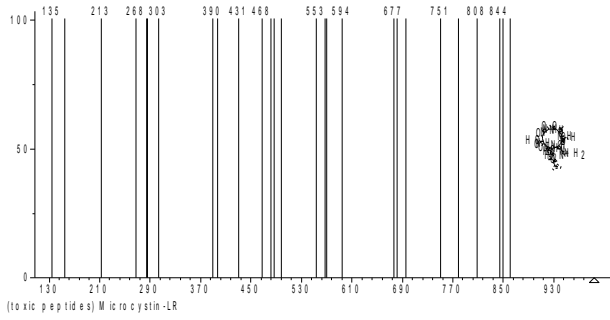
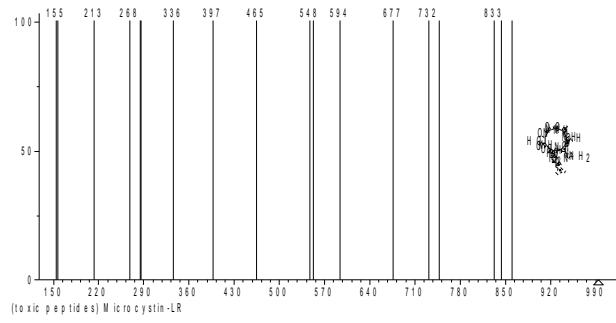
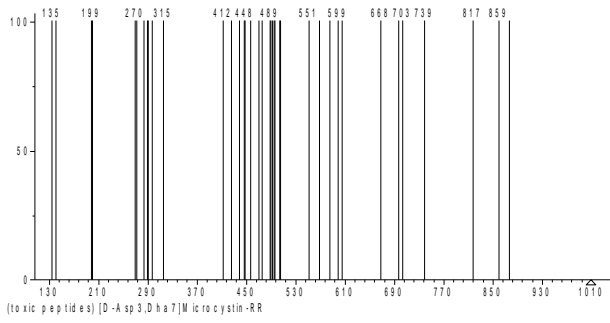


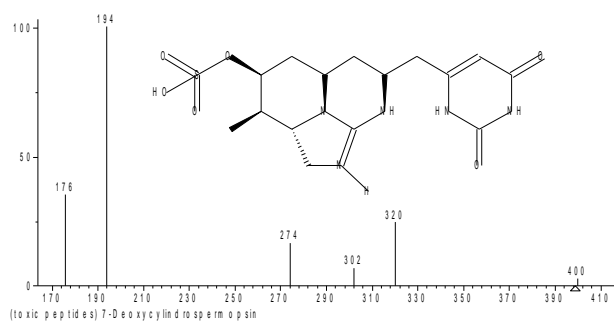












ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Пример идентификации микроцистина-LR в водном экстракте культуры  
*Microcystis aeruginosa*

Пример идентификации микроцистина-LR в водном экстракте культуры *Microcystis aeruginosa*, штамм 973, при сравнении экспериментального (а) и справочного (б) масс-спектров с показателем сходства 833.

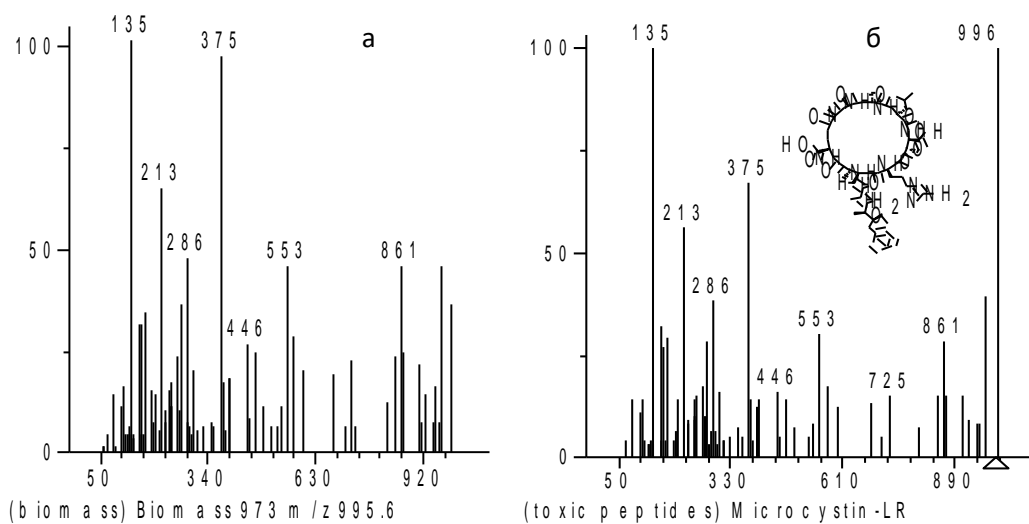


Рисунок Г.1 – Масс-спектры микроцистина-LR культуры *Microcystis aeruginosa*, штамм 973; а – экспериментальный, б – справочный

МР ФМБА России

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации  
Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья и оказанию медико-социальной помощи

**Порядок проведения химико-аналитической экспертизы объектов окружающей среды и биологических жидкостей на предмет выявления токсичных полипептидных веществ**

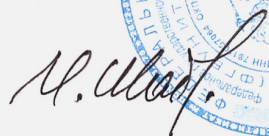
Методические рекомендации  
МР ФМБА России

Директор, д.м.н.



Е.Ю. Бонитенко

Ученый секретарь, к.б.н.



И.А. Шабунова

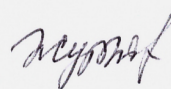
Главный метролог



И.В. Александрова

Исполнители:

Научный руководитель,  
заведующий лабораторией №10, к.х.н.



И.К. Журкович

Ответственный исполнитель,  
Старший научный сотрудник, к.х.н.



А.О. Руденко