

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2705932

Способ идентификации наркотических и психоактивных веществ в сложных биологических матрицах организма человека

Патентообладатель: *Савчук Сергей Александрович (RU)*

Авторы: *Савчук Сергей Александрович (RU), Новиков Андрей
Петрович (RU), Буряк Алексей Константинович (RU),
Шабаршин Николай Юрьевич (RU)*

Заявка № 2019112579

Приоритет изобретения 24 апреля 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 12 ноября 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 24 апреля 2039 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев



фильтров картриджей по сравнению с результатами исследования биологической жидкости, содержащей продукты криодеструкции, полученной от того же объекта.

3.4. Подготовка волос и срезов ногтевых пластин для анализа

Волосы и ногтевые пластины, являясь придатками кожи и имеют сходное строение. Поверхностные слои обоих видов структур (кутикула) – чешуйчатые, рыхлые. Это отмирающие кератиновые слои, которые постоянно обновляются за счёт роста внутреннего кератинового слоя (кортекса). Необходимые элементы для обновления приходят с кровотоком. Мелкие капиллярные кровеносные сосуды питают луковицу волоса и соответствующие структуры ногтевых пластин. Интересующие нас ксенобиотики, включая стимуляторы, наркотические и лекарственные вещества (преимущественно психоактивные) приходят также с кровотоком, "встраиваются" в кератиновые матрицы и фиксируются в ней. В рыхлых приповерхностных слоях эта фиксация слабеет и целевые вещества покидают поверхность волос и ногтевых пластин легко, тогда как из глубины их извлечь трудно, вследствие хорошей фиксации.

Психоактивные вещества могли попасть на поверхность волос или ногтевых пластин извне случайно. Например, если кто-то рядом курил каннабис или спайсы, целевые вещества в виде аэрозолей могли попасть на поверхность волос или ногтевых пластин человека, который не употреблял подобные вещества. Поэтому перед анализом отмывают поверхность волос и ногтевых срезов от внешних загрязнений. Следует отметить, что целевые вещества, находящиеся в кутикуле, также могут быть извлечены из приповерхностных слоев и смыты вместе с поверхностными загрязнениями. Для того, чтобы дифференцировать поверхностные загрязнения и объемные содержания целевых веществ, присутствующих в приповерхностных и внутренних слоях волоса или ногтевой пластины, целесообразно делать не

менее пяти последовательных смывов, и полученные смывы подвергать анализу. С каждым смывом интенсивность целевого вещества должна уменьшаться и в последнем смыве быть незначительной. После чего можно применять методы активного извлечения, например, кислый или основной гидролиз, или извлечение в метанол с обработкой ультразвуком. При получении положительного результата, по интенсивности пиков целевых компонентов существенно (в 20-50 раз) превышающим интенсивности пиков этих же веществ в смывах, надежно судить о наличии в организме таких веществ. При получении отрицательного результата после проведения кислого или основного гидролиза, или извлечения в метанол с обработкой ультразвуком, исследуемый образец признается отрицательным, а вещества, определенные в смывах, являются поверхностными загрязнениями.

Одним из критериев достоверности является снижение интенсивностей пиков определяемых веществ от смыва к смыву. При обнаружении хаотично меняющихся интенсивностей в последовательных смывах и в финальных экстрактах, необходимо проверить прибор на наличие «химической памяти» по определяемым веществам.

Примечание 1: Получить более специфичные и достоверные данные по наличию психоактивных веществ на поверхности и в объеме придатков кожи можно при комплексном исследовании волос и срезов краев ногтевых пластин, отобранных как с пальцев рук, так и с пальцев ног испытуемых. Особенный интерес представляют ногтевые срезы, отобранные с пальцев ног, поскольку они в наименьшей степени загрязнены целевыми компонентами.

Примечание 2: кератиновые матрицы волос и ногтевых пластин имеют разную плотность и скорость роста. Поэтому содержания идентифицируемых веществ в волосах, срезах ногтевых пластин с пальцев рук и ног, отобранных у одного лица, могут различаться.

Примечание 3: Волосы и ногтевые срезы помещают в пластиковый флакон с коническим дном вместимостью 50 мл. Все стадии подготовки

пробы: получение пяти смывов, измельчение ножницами (до получения отрезков 1-3 мм), гидролиз с последующей экстракцией или обработку ультразвуком в метаноле выполняют в этом же флаконе, что снижает вероятность лабораторного загрязнения пробы. Стеклоянные флаконы не рекомендуется использовать для ультразвуковой обработки, так как есть вероятность их разрушения под действием ультразвука.

3.4.1. Отбор образцов волос и ногтевых срезов (пластин)

- Для анализа требуется от 20 до 300 мг волос и/или ногтевых срезов (пластин).
- У трупа для анализа отбирают ногтевые пластины целиком.
- Волосы отбирают с волосистой части головы или с других частей тела. Скорость накопления целевых аналитов зависит от скорости роста волос (1 см в месяц для волос волосистой части головы).

3.4.2. Получение и анализ метанольных смывов

- В пластиковые флаконы с коническим дном помещают 20-300 мг неизмельченных волос, ногтевых срезов/пластин. Волосы, ногтевые срезы/пластины с пальцев рук и ног анализируют отдельно (не объединяют объекты).
- Во флакон добавляют от 1.5 до 3.0 мл метанола, так чтобы органический слой покрывал анализируемый объект и встряхивают не интенсивно 1 мин.
- Отбирают органический слой и переносят его в алюминиевый колпачок для упаривания.
- Во флакон вносят следующую порцию метанола и повторяют процедуру. Всего получают пять последовательных смывов.
- Полученные смывы упаривают досуха. Сухой остаток дериватизируют или растворяют в 150 мкл ацетонитрила и анализируют.
- При необходимости дериватизации к сухому остатку добавляют 30 мкл

BSTFA и 70 нагревают в течение 15 мин при 70°C. После охлаждения 1 мкл раствора вводят в хроматограф.

3.4.3. Измельчение волос и ногтевых срезов

После получения пяти смывов волосы и ногтевые срезы помещают в пластиковый флакон с коническим дном вместимостью 50 мл и измельчают остроконечными хирургическими ножницами внутри флакона.

Измельченные волосы и ногтевые срезы подвергают кислому или основному гидролизу или экстрагируют метанолом при обработке ультразвуком.

3.4.4. Ферментативный гидролиз (общие наркотики)

Выбранные условия pH соответствуют наибольшей активности ферментов. Для пепсина pH 2.2, для трипсина pH 8.0, для кератиназы pH 6.5.

- К измельченным волосам (ногтевым срезам) добавляют 1 мл водного раствора пепсина, трипсина или кератиназы.
- Инкубируют при 40°C в течение 12 часов.
- Обработывают 1 час на ультразвуковой бане.
- Центрифугируют в течение 5 минут 14000 об/мин.
- Надосадочную жидкость отделяют и экстрагируют методом ТФЭ согласно п. 3.3.1.3.

3.4.5. Кислотный гидролиз (общие наркотики)

К навеске волос добавляют 1 мл 5М HCl и выдерживают 45 мин при 90°C.

3.4.6. Основной гидролиз (ТГК, современные СК)

К навеске волос добавляют 1 мл 2М КОН и выдерживают 40 мин при 50°C с обработкой ультразвуком.

Примечание: Многие СК, присутствующие в волосах в нативном виде, разрушаются при основном гидролизе с образованием продуктов, тождественных метаболитам/маркерам этих веществ.

3.4.7. ЖЖЭ для основных гидролизатов (ТГК, современные СК)

- В пробирку объемом 10 мл вносят 3 г хлорида натрия, гидрокарбонат натрия на кончике шпателя (40-50 мг) и 1 мл гидролизата волос.
- Добавляют 3 мл смеси метиленхлорид-гептан-изопропанол (7:2:1) и экстрагируют 10 мин на орбитальном шейкере.
- Центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин.
- Отделяют органический слой, переносят его в пробирку объемом 4 мл или в металлический колпачок TOX-LAB для упаривания и упаривают в токе горячего воздуха. К сухому остатку добавляют 70 мкл этилацетата, встряхивают на вибромиксере до растворения (2-3 сек) и 1 мкл раствора вводят в хроматограф.

3.4.8. Твердофазная экстракция (для кислых гидролизатов, общие наркотики). Выполняют 3.3.1.2.

Примечание: методы пробоподготовки п.п. 3.1., 3.2., 3.3 пригодны для ВЭЖХ-МС/МС анализа. В этом случае дериватизацию не проводят. К сухому остатку после упаривания добавляют последовательно 200 мкл ацетонитрила и 200 мкл деионизованной воды, 5 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

3.5. Методы дериватизации

Преимущественным способом является триметилсилилирование.

3.5.1. Триметилсилилирование. К сухому остатку добавляют 30 мкл смеси BSTFA и 70 мкл этилацетата и перемешивают. Смесь нагревают в течение 15 мин при 70°C. После охлаждения смесь вводят в хроматограф.