

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13)

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России,
доктор медицинских наук


_____ А.В.Ковалев
16 октября 2014 г.

**СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ НА НАЛИЧИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ И ПСИХОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Методические рекомендации

Москва
2014

Аннотация

Разработан метод судебно-химического исследования на наличие наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях (моче) и волосах человека методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием.

Работа выполнена в ходе реализации государственного задания на 2012-2014 гг., утвержденного 26.12.2011 г. заместителем Министра здравоохранения и социального развития Российской Федерации В.И.Скворцовой, при выполнении научных исследований по теме: «Изучение возможности совершенствования методов судебно-химического исследования наркотических и психотропных веществ в биологическом и трупном материале».

Автор: судебный эксперт - химик отделения судебно-химических и химико-токсикологических исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, доктор химических наук Савчук С.А.

Рецензенты:

Е.М.Саломатин – главный научный сотрудник лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, профессор, доктор фармацевтических наук

Р.А.Калёкин – старший научный сотрудник лаборатории судебно-химических и химико-токсикологических исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, доктор фармацевтических наук

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 5 от 16 октября).

Введение

Метод хромато-масс-спектрометрии (ХМС, ГХ/МС) основан на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Метод предназначен для получения объективных данных о наличии наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов которые указываются в диагностических заключениях, результатах медицинского освидетельствования, экспертных заключениях, результатах химико-токсикологического контроля и мониторинга.

Описание метода

Методика ГХ-МС анализа основана на идентификации определяемых веществ, в экстрактах, выделенных из образцов мочи, настоев органов или тканей жидкость/жидкостной или твердофазной экстракцией. Образцы волос подвергают ферментному гидролизу или извлекают целевые вещества в метанол при ультразвуковой обработке. Определяемые вещества идентифицируют в автоматическом режиме по двум аналитическим параметрам: времени хроматографического удерживания и масс-спектру. Идентифицированное вещество определяют количественно на основании градуировочной характеристики, которую получают на основании результатов анализа стандартных образцов.

Материально-техническое обеспечение метода

Для выполнения методики используют газовые хроматографы Agilent 6890N (США) или Agilent 6850 или Agilent 7820 – Maestro (США - Россия) с автоинжектором Agilent 7683, масс-селективными детекторами Agilent 5973N, 5975 (США), Agilent 5975-Maestro (США - Россия), колонкой (Agilent HP-5MS номер по каталогу 19091S-433) длиной 30м, внутренним диаметром 0.25мм, с толщиной пленки фазы 0.25мкм. Для идентификации веществ используют библиотеки масс-спектров (Приложение 1).

Перечень общелабораторного оборудования и реактивов дан в Приложении 2 и 3.

Допускается использовать оборудование, материалы и реактивы с техническими характеристиками аналогичными указанным.

Условия ГХ-МС анализа

Хроматограф и масс-спектрометрический детектор включают и настраивают в соответствии с инструкцией по эксплуатации и устанавливают

параметры хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования. Градуировку приборов для проведения количественного анализа выполняют по методу внутреннего стандарта согласно инструкции к прибору. Хроматографический шприц перед анализом и после анализа промывают двумя растворителями (толуолом и ацетоном), по 5 раз каждым растворителем.

Метод 1 “SCREEN”. Температурная программа термостата колонок: начальная температура 100°C с изотермической выдержкой в течение 1 мин, с последующим температурным градиентом 35°C/мин до 300°C с изотермической выдержкой 15 мин. Анализ в режиме постоянного давления (Constant Pressure). В качестве газа носителя используют гелий марки «А». Температура испарителя хроматографа составляет 270°C, аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 280°C. Пробу вводят в режиме с делением потока (split) 1/10.

Времена удерживания определяемых соединений (см. приложение 3) получают по методу фиксации времен удерживания (Retention Time Locking, RTL). Настройку метода RTL осуществляют по дифениламину, меняя давление в узле ввода таким образом, чтобы время удерживания дифениламина в выбранных условиях хроматографирования составило 5.50±0.03 мин.

Метод 2 “DOAS”. Температурная программа термостата колонок: начальная температура 50°C с изотермической выдержкой в течение 0.5 мин, с последующим температурным градиентом 99°C/мин до 100°C с изотермической выдержкой 1 мин, с последующим температурным градиентом 15°C/мин до 280°C с изотермической выдержкой 30 мин. Анализ в режиме постоянного давления (Constant Pressure). В качестве газа носителя используют гелий марки «А». Температура испарителя хроматографа составляет 270°C, аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 280°C. Пробу вводят в режиме с делением потока (split) 1/10. Настройку метода RTL осуществляют по дифениламину, меняя давление в узле ввода таким образом, чтобы время удерживания дифениламина в выбранных условиях хроматографирования составило 9.26±0.03 мин. Примеры хроматограмм см. Рис. 1 и 2.

Условия масс-спектрометрического детектирования. Для многокомпонентной идентификации веществ по процедуре 1 используют режим сканирования по полному ионному току (SCAN), при количественном анализе также используют режим сканирования по полному ионному току, а в случае необходимости определения с пределом обнаружения ниже 50 нг/мл используют режим мониторинга по выбранным ионам (SIM).

Анализ в режиме сканирования по полному ионному току. “Задержка на растворитель” время включения катодов и анализатора после прохождения по колонке фронта растворителя – через 3 мин после ввода пробы.

- Температура источника ионов 230°C
- Температура анализатора 150°C
- Диапазон масс m/z 41-650 а.е.м.

- Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме ATUNE.

Анализ в режиме мониторинга по выбранным ионам (SIM). Детектирование в режиме SIM выполняют в случаях, когда концентрация определяемых веществ ниже 25-50 нг/мл, при этом идентификационная значимость полученных результатов будет существенно ниже, поскольку полный спектр не фиксируется. В качестве характеристичных ионов могут быть выбраны: базовый ион масс-спектра, молекулярный ион определяемого соединения или фрагментный ион наибольшей интенсивности. Выбранные ионы должны быть специфичны для определяемого соединения и не содержаться в фоне. Наиболее специфичный (целевой, target) ион используют для количественного определения, два других иона используют для подтверждения правильности идентификации.

Подготовка проб мочи для ГХ-МС анализа

Метод включает три аналитические процедуры подготовки пробы и анализа. При необходимости определения низких концентраций анализируют пробы после кислотного или ферментного гидролиза.

Процедура 1: кислотный гидролиз экстракция при pH 9, дериватизация трифторуксусным ангидридом (ТФАА). Определяют индивидуальные вещества следующих химических групп:

- Опиаты, метаболиты, сопутствующие компоненты
- Амфетамины и их метаболиты
- Барбитураты и их метаболиты
- Бензодиазепины и продукты их гидролиза
- Синтетические наркотические вещества и их метаболиты
- Стимуляторы синтетического происхождения и их метаболиты

Процедура 2: определение 11- нор –дельта- 9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты в виде пентафторпроизводного. Мочу подвергают щелочному гидролизу, экстракции при pH 2-3, дериватизации с пентафторпропионовым ангидридом с пентафторпропанолом (ПФПА и ПФПОН).

Процедура 3: кислотный гидролиз экстракция при pH 9, дериватизация BSTFA. Определяют индивидуальные вещества следующих химических групп в виде триметилсилильных производных (TMS):

- Псилоцин, псилоцибин TMS.
- Бензоилэкгонин TMS. Клофелин TMS.
- Метаболиты JWH-018, 073, 250, PB-22, FUB-PB, THJ-018, 2201 TMS их аналогов, гомологов.
- производные TMS веществ, определяемых по процедуре 1.
- TMS производное 11- нор –дельта- 9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты.

Процедуры **1** и **2** выполняют на одном приборе. Для процедуры **3** используют отдельный прибор.

Приготовление стандартных растворов. Стандартные растворы готовят из чистых (не менее 99% основного вещества) химических веществ. Можно использовать готовые стандартные образцы состава в виде растворов в метаноле или приготовленные на биологической матрице (моче).

Приготовление раствора внутреннего стандарта дифениламина. Приготовление раствора «А». В мерную пробирку вместимостью 10 мл вносят 10 мг дифениламина (ДФА), добавляют 10 мл метанола до метки. Концентрация ДФА в растворе «А» составляет 1 мг/мл.

Приготовление раствора «Б». В мерный цилиндр вместимостью 100 мл автоматическим дозатором вносят 2 мл раствора А и добавляют метанол до метки 100 мл. Концентрация ДФА в растворе «Б» составляет 20 мкг/мл.

Приготовление градуировочных растворов из чистых веществ. Для приготовления стандартных растворов используют вещества чистотой 99%.

Ниже дан пример приготовления стандартных растворов на примере морфина.

Приготовление раствора исходного стандартного раствора морфина 1000 мкг/мл. В мерную пробирку с притертой пробкой вместимостью 10 мл вносят 10 мг морфина (в виде основания) и добавляют метанол до метки 10 мл. Концентрация морфина (в виде основания) в исходном стандартный растворе составляет 1000 мкг/мл. Из исходного стандартного раствора готовят базовые и калибровочные растворы.

Базовый стандартный раствор «А» морфина (10 мкг/мл) в метаноле. К 5 мл метанола добавить автоматическим дозатором 50 мкл исходного раствора морфина (1000 мкг/мл). Предварительно от 5 мл метанола отобрать и отбросить 50 мкл метанола.

Базовый стандартный раствор «Б» морфина (0,1 мкг/мл). К 10 мл метанола добавить 100 мкл раствора «А» (10 мкг/мл). Предварительно от 10 мл метанола отобрать и отбросить 100 мкл метанола.

Приготовление калибровочных растворов морфина на биологической матрице (моче). Калибровочные растворы морфина 6, 15, 50, 100, 150 нг/мл готовят последовательным разбавлением из базового стандартного раствора «Б».

Калибровочный раствор морфина концентрацией 6 нг/мл. Внести 9.4 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу, добавить 600 мкл базового стандартного раствора морфина «Б» (0,1 мкг/мл).

Калибровочный раствор морфина концентрацией 15 нг/мл. Внести 8.5 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу, добавить 1500 мкл базового стандартного раствора «Б» (0,1 мкг/мл), довести объем до метки (10 мл) мочой.

Калибровочный раствор морфина концентрацией 50 нг/мл. Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим

дозатором 50 мкл мочи, добавить 50 мкл базового стандартного раствора «А» (10 мкг/мл).

Калибровочный раствор морфина концентрацией 100 нг/мл. Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим дозатором 100 мкл мочи, добавить 100 мкл базового стандартного раствора «А» (10 мкг/мл).

Калибровочный раствор морфина концентрацией 150 нг/мл. Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим дозатором 150 мкл мочи, добавить 150 мкл базового стандартного раствора «А» (10 мкг/мл).

Приготовление смеси органических растворителей. Для экстракции готовят смесь растворителей:

1. изопропиловый спирт 10%
2. дихлорметан 35%
3. 1,2-дихлорэтан 23%
4. гептан 32%

В мерный цилиндр на 100 мл вносят 10 мл изопропилового спирта, 35 мл дихлорметана, 23 мл 1,2-дихлорэтана и 32 мл гептана. Смесь перемешивают и хранят в герметично закрытой стеклянной емкости.

Можно использовать смесь метиленхлорид : гептан : изопропанол = 7:2:1

Приготовление твердого буфера. Взвешивают 100 г гидрокарбоната натрия и 50 г карбоната натрия, перемешивают и перетирают в ступке.

Подготовка пробы для анализа. Методика подготовки пробы включает стадии гидролиза, экстракции и дериватизации.

Кислотный гидролиз. В пробирку с завинчивающейся крышкой вместимостью 9 мл вносят 3 мл анализируемой мочи, добавляют 300 мкл концентрированной HCl, и выдерживают 1 час при 90⁰С. Гидролизат охлаждают до комнатной температуры. К гидролизату добавляют 300 мкл аммиака 10% - ного водного и экстрагируют, как описано ниже.

Выделение веществ из мочи жидкость/жидкостной экстракцией. В чистую, сухую пробирку объемом 10 мл внести 3 г хлорида натрия, твердый буфер на кончике шпателя 40-50 мг и 3 мл экстракционной смеси.

- В пробирку вносят 3 мл мочи или гидролизата мочи.
- Добавляют 30 мкл внутреннего стандарта дифениламина (раствор «Б» концентрацией 20 мкг/мл), концентрация внутреннего стандарта (ВС) в пробе составляет 200 нг/мл.
- 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 (экстракт не пересушивать, прекращать упаривание сразу после исчезновения жидкой фазы). К упаренному экстракту добавляют 70 мкл трифторуксусного ангидрида, закупоривают крышкой с тефлонированной мембраной, встряхивают реакционную смесь на вибромиксере 2-3 сек, выдерживают 30 мин при 55⁰С, после чего удаляют остаток дериватирующего агента упариванием в токе горячего воздуха. К сухому остатку добавляют 70 мкл этилацетата, встряхивают на вибромиксере 2-3 сек, 1 мкл пробы вводят в хроматограф.

Подготовка проб крови, желчи, органов и тканей методами твердофазной и жидкость/жидкостной экстракции

- Измельчить 10-50 г печени (почки).
- Поместить в стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 9 мл 2 г измельченной ткани печени, почки или 2 мл крови, желчи.
- Добавить 6 мл 6% трихлоруксусной кислоты (рН 1.0).
- Экстрагировать 10-15 мин на ультразвуковой бане и 5 мин на орбитальном шейкере.
- Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 15-20 мин.
- Надосадочную жидкость перенести в центрифужную пробирку.
- Добавить порциями 0.6 мл 22% раствора карбоната натрия (до рН 6.0), избегая пенообразования. При необходимости корректировать рН с помощью 50% раствора фосфорной кислоты.
- Добавить 30 мкл внутреннего стандарта дифениламина концентрацией 20 мкг/мл.

Жидкость/жидкостная экстракция

- В пробирку объемом 10 мл внести 3 г хлорида натрия, твердый буфер на кончике шпателя и 3 мл экстракционной смеси.
- В пробирку внести 3 мл пробы мочи или надосадочной жидкости (кровь, желчь, ткани).
- Экстрагировать 5 мин на орбитальном шейкере
- Центрифугировать при 3500 об/мин 5 мин.
- Отделить органический слой, перенести его в пробирку объемом 10 мл и упарить в вакуумном концентраторе или перенести экстракт алюминиевый колпачок и упарить в токе воздуха при температуре не выше 60⁰С.
- Упаренный экстракт дериватизировать с TFAA или BSTFA и анализировать.

Твердофазная экстракция

- Используют картриджи для твердофазной экстракции: Agilent Technologies AccuBONDII EVIDEX, 3 мл/200 мг, или Agilent Technologies SampliQ EVIDEX, 3 мл/200 мг

Приготовление реактивов

- 0.1М K_2HPO_4 (pH 6.0) – 1.74 г фосфата калия двузамещенного безводного растворить в 100 мл деионизованной воды. Установить pH 6.0 с помощью фосфорной кислоты.
- 0.1М натрия ацетат (pH 4.5). 0.82 г растворить в 100 мл деионизованной воды. Установить pH 4.5 с помощью ледяной уксусной кислоты.

Кондиционирование картриджа:

- Картридж для твердофазной экстракции Evidex устанавливают в вакуумный штатив с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум 20 мм.рт.ст. Скорость потока жидкости через картридж не выше 2.5 мл/мин.
- Через картридж пропустить 1.5 мл метанола при полном вакууме для удаления воздуха.
- 3 мл метанола
- 3 мл 0.1М K_2HPO_4 (pH 6.0)

Загрузка пробы:

- К 3 мл пробы мочи или надосадочной жидкости (кровь, желчь, ткани см. ниже) добавить 3 мл 0.1М K_2HPO_4 (pH 6.0) и пропустить через картридж Evidex.

Промывка картриджа:

- 3.0 мл 0.1М ацетата натрия (pH 4.5).
- 1.5 мл метанола.
- Картридж сушить 10-15 мин при полном вакууме.
- Поместить под картридж виалу для экстракта объемом 10 мл.
- Пропустить через картридж 2 мл смеси растворителей дихлорметан/изопропанол/ NH_4OH (78/20/2) без использования вакуума.
- Сушить картридж 36-60 сек под вакуумом, не допуская разбрызгивания элюата.
- Элюат упарить в вакуумном концентраторе или в токе воздуха при температуре не выше 60°C.
- Упаренный экстракт дериватизировать с TFAA или BSTFA и анализировать.

Методика определения 11- нор –дельта- 9-карбокситГК в моче

Реактивы. Для щелочного гидролиза используют NaOH или KOH.

1. 5N раствора едкого натрия – 200г/л.

Приготовление 5M. К 2г NaOH добавляют дист. воду до объема 10 мл.

Приготовление 5M KOH. К 2.8г KOH добавляют дист. воду до объема 10 мл.

Приготовление стандартных растворов (смесей). Исходный стандартный раствор 100 мкг/мл 11- нор –дельта- 9-карбокситГК в метаноле.

Базовый стандартный раствор карбокситГК (10 мкг/мл) в метаноле.

К 900 мкл метанола добавить 100 мкл исходного раствора карбокситГК (100 мкг/мл).

Или к 450 мкл метанола добавить 50 мкл исходного раствора карбокситГК (100 мкг/мл).

Базовый стандартный раствор карбокситГК (0,1 мкг/мл)

К 10 мл метанола добавить 100 мкл раствора 10 мкг/мл.

Или к 1.5 мл 15 мкл р-ра 10 мкг/мл.

Калибровочные растворы карбокситГК

а. 6 нг/мл КарбокситГК-калибратор.

1) Внести 9.4 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу.

2) Добавить 600 мкл раствора карбокситГК (0,1 мкг/мл).

б. 15 нг/мл КарбокситГК-калибратор.

1) Внести 8.5 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу.

2) Добавить 1500 мкл раствора карбокситГК (0,1 мкг/мл).

3) Доведите объем до метки (10 мл) мочой.

с. 50 нг/мл КарбокситГК-калибратор.

1) Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим дозатором 50 мкл мочи из пробирки

2) Добавить **50** мкл раствора карбокситГК (10 мкг/мл).

d. 100 нг/мл Карбокси-ТГК-калибратор.

- 1) Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим дозатором 100 мкл мочи из пробирки
- 2) Добавить **100 мкл** раствора карбокси-ТГК (10 мкг/мл) в 10-мл мерную колбу.

e. 150 нг/мл Карбокси-ТГК-калибратор.

- 1) Внести 10 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу. Отобрать и отбросить автоматическим дозатором 150 мкл мочи из пробирки
- 2) Добавьте **150 мкл** раствора карбокси-ТГК (10 мкг/мл) в эту 10-мл мерную колбу.

Подготовка пробы

Гидролиз: к 3 мл мочи добавить 0.5 мл 5N раствора NaOH, выдерживать при 50°C в течение 20 минут.

Выделение определяемых веществ жидкостной экстракцией.

Гидролизат подкисляют до pH 2-3 добавлением 250-350 мкл конц. соляной кислоты, экстрагируют 3 мл смеси изооктан-этилацетат 7:1 на орбитальном шейкере 5 мин, центрифугируют (3 мин при 3000 об/мин), отбирают верхний органический слой, добавляют 30 мкл р-ра ВС дифениламина в ацетонитриле конц. 20 мкг/мл (до конц. ВС в пробе 200 нг/мл), упаривают в вакуумном концентраторе и дериватизируют.

Дериватизация. (вариант 1). Алкилирование/ацетилирование пентафторпропионовый ангидрид (PFPA) + пентафторпропанол (PFPOH)

К сухому остатку добавить 50 мкл PFPA и 25 мкл PFPOH, выдерживать 30 мин при 90°C, упарить остаток реагента, сухой остаток растворить в 100 мкл этилацетата, 1 мкл ввести в инжектор хроматографа.

Дериватизация. (вариант 2). Силилирование. К сухому остатку добавить 70 мкл BSTFA, выдержать 30 мин при 70°C, 1 мкл в хроматограф.

Условия ГХ-МС анализа

Условия двух вариантов ГХ/МС хроматографирования и детектирования тетрагидроканнабиноловой кислоты в моче представлены ниже.

1. Определение тетрагидроканнабиноловой кислоты в виде производного с пентафторпропионовым ангидридом и пентафторпропанолом

Метод 1 SCREEN: 100°C(1 мин) 35°C/мин300°C (15 мин).

Диапазон масс m/z 41 – 650 а.е.м.

Характеристические ионы ДФА-PFP m/z 315, 222, 167 время удерживания 5.20 мин.

Характеристические ионы ТГК-COOH-PFP m/z 607. 622, 458 время удерживания 7.68 мин.

ГХ-МС Метод 2 DOAS: 50°C (0,5мин.), 99°C/мин 100°C (1мин.), 15°C/мин, 280°C (30 мин.).

Время удерживания ДФА- PFP 9.00 мин.

Время удерживания ТГК-ССООН-PFP 14.49 мин.

2. Определение тетрагидроканнабиноловой кислоты в виде производного с BSTFA

ГХ-МС Метод 1: 100°C(1 мин) 35°C/мин300°C (15 мин).

Диапазон масс m/z 41 – 650 а.е.м.

Характеристические ионы ТГК-COOH-TMS m/z 371, 472, 488 время удерживания 9.41 мин

Методика определения клофелина в моче

Ввод внутреннего стандарта. К 3 мл пробы мочи добавляют 30 мкл р-ра ВС дифениламина в ацетонитриле конц. 20 мкг/мл (конц. ВС в пробе 200 нг/мл).

Выделение определяемых веществ жидкостной экстракцией. К 5 мл пробы с введенным ВС добавляют 300 мкл 25% водного NH₄OH и экстрагируют 10 мл смеси гексан – изопропанол 9:1, центрифугируют, переносят органический слой в виалу вместимостью 10 мл и упаривают экстракт.

Получение производных. К сухому экстракту добавляют 70 мкл (BSTFA), выдерживают 30 мин при 70°C, 1 мкл пробы вводят в хроматограф.

Условия ГХ-МС анализа. ГХ-МС Метод 1 SCREEN: 100°C (1 мин) 35°C/мин300°C (15 мин).

Диапазон масс m/z 41 – 650 а.е.м.

Характеристические ионы ДФА-TMS m/z 201, 255, 270 время удерживания 2 .73

мин. Характеристические ионы КЛОФЕЛИН-TMS m/z 266, 301

КЛОФЕЛИН-2TMS m/z 338, 373 время удерживания 6.40 мин

Из BSTFA на клофелин может накладываться ион m/z 379.

Примечание: для дериватизации клофелина можно использовать реактив N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (CAS 24589-78-4). Дериват

КЛОФЕЛИН-2TMS m/z 338, 373 время удерживания 6.40 мин.

Примечание: на клофелин может накладываться фоновый пик с базовым ионом m/z 325 (из реактива).

Последовательность выполнения измерений, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов

Последовательность выполнения измерений по процедурам 1, 2, 3 на хроматографе с масс-селективным детектором при анализе экстрактов биологических проб (мочи):

1. **Контроль фона прибора.** Перед началом работы анализ растворителя (этилацетата) по методу SCREEN для контроля фона прибора по определяемым веществам.
2. **Положительный контроль.** Анализ контрольной мочи (QC) содержащей известные введенные содержания определяемых веществ на уровне 100 нг/мл по методу DOAS.
3. **Отрицательный контроль.** Анализ контрольной мочи (BLANK) не содержащей определяемых веществ по методу DOAS.
4. **Контроль фона прибора между пробами.** Между пробами выполняют анализ растворителя (этилацетата) по методу SCREEN для контроля фона прибора по определяемым веществам.
5. **Последовательность применения библиотек** масс-спектров для обработки результатов дана в табл 1. Для автоматической идентификации в первую очередь применяют AMDIS библиотеки, имеющие времена удерживания определяемых соединений. При отрицательном результате идентификации используют более подробные AMDIS библиотеки не содержащие времен удерживания. В этом случае при положительном результате идентификации необходимо подтвердить правильность идентификации анализом стандартного образца. При использовании библиотек в PBM формате для «ручной» идентификации правильность идентификации подтверждают анализом стандартного образца.

При отсутствии стандартных образцов состава для положительного контроля могут быть использованы пробы мочи положительные по определяемым веществам. Уровень концентраций в этих пробах оценивают относительно внутреннего стандарта – дифениламина.

Подготовка образцов волос для анализа

Ферментный гидролиз

- Образец волос отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором ПАВ.
- Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом.
- Высушивают и измельчают (ножницами).
- Взвешивают, масса навески 20-100 мг.
- Добавляют 1 мл водного раствора (рН 6.5.) 1/10 β-глюкуронидазы, пепсина, трипсина или кератиназы.
- Выдерживают при 40° С в течение 12 часов.
- Обработывают на 1 час на ультразвуковой бане.
- Центрифугируют в течение 5 минут при 14000 об/мин.
- Водную фазу отделяют и обрабатывают методом жидкостной или твердофазной экстракции.

Экстракция метанолом

- Образец волос отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором ПАВ.
- Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом.
- Высушивают и измельчают (ножницами).
- Взвешивают, масса навески 20-100 мг.
- Помещают в пластиковый флакон.
- Добавляют 3 мл метанола.
- Выдерживают на ультразвуковой бане 3 часа.
- Центрифугируют при 6,5 -15 тыс об/мин.
- Метанол отделяют и упаривают в алюминиевом колпачке ТОХ-LAB.
- К сухому остатку добавляют 100 мкл метанола, 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 6.0 и подвергают очистке методом твердофазной экстракции.

Жидкостная экстракция

- В пробирку объемом 10 мл вносят 3 г хлорида натрия, твердый буфер на кончике шпателя 40-50 мг и 3 мл экстракционной смеси.
- В пробирку с экстракционной смесью вносят 1 мл гидролизата волос.
- Добавляют 30 мкл внутреннего стандарта дифениламина (раствор «Б»

концентрацией 20 мкг/мл), концентрация ВС в пробе 200 нг/мл.

- 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 алюминиевый колпачок TOX-LAB для упаривания и упаривают в токе горячего воздуха. (К сухому остатку добавляют 70 мкл этилацетата, встряхивают на вибромиксере 2-3 сек, 1 мкл пробы вводят в хроматограф).

Твердофазная экстракция

- Кондиционирование картриджа (колонки) (поток 3-5 мл/мин).
 - 3 мл метанола.
 - 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 6.0.
- Нанесение образца на колонку.
 - Пропускали пробу через колонку.
- Промывка водой.
 - Пропускали через колонку 3 мл деионизованной воды (поток 3-5 мл/мин).
- Подкисление.
 - Пропускали 2 мл 1М уксусной кислоты через колонку (поток 3-5 мл/мин).
 - Высушивали колонку в течение 2 минут.
- Промывка гексаном.
 - Пропускали через колонку 3 мл гексана (поток 3-5 мл/мин).
- Сбор кислой/нейтральной фракции.
 - Пропускали через колонку 1,7 мл смеси гексан:этилацетат (1:1) (поток 1-2 мл/мин).
 - Собирали кислую/нейтральную фракцию.
 - Удаляли остатки элюента током азота.
- Промывка колонки метанолом.
 - Пропустить через колонки 3 мл метанола (поток 3-5 мл/мин).
 - Высушить колонку в течение 2 минут.
- Сбор основной фракции.
 - Пропустить через колонки 1,7 мл смеси дихлорметан : пропанол-2 : концентрированный раствор аммиака (78:20:2) (поток 1-2 мл/мин).
 - Собрать основную фракцию.
- Концентрирование фракций.
- Упарить содержимое виал с собранными фракциями.
- Перерастворить остаток в 100 мкл этилацетата и анализировать.

Возможные осложнения и способы их устранения

Способы оценки состояния прибора, основные факторы, влияющие на образование ложноположительных и ложноотрицательных результатов и приемы устранения наиболее распространенных проблем даны в таблице 1, факторы, влияющие на образование ложноположительных и ложноотрицательных результатов приведены в табл.2.

Таблица 1. Оценка состояния хромато-масс-спектрометра и выявление наиболее распространенных неисправностей и проблем.

Проверка параметров	Метод контроля	Типичные проблемы при отрицательном результате проверки	Способ устранения
Проверка параметров масс-спектрометрического детектора	Стандартная процедура настройки детектора (atune MSD)	Загрязнение источника ионов, неисправность детектора	Чистка источника ионов
Проверка параметров масс-спектрометрической системы (хроматографа и детектора)	Анализ стандартной смеси	Потеря эффективности хроматографической колонки, неисправность хроматографа	Подрезка начального участка колонки или замена колонки

Таблица 2. Факторы, влияющие на образование ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Факторы	Проблема	Причина	Метод контроля	Способ устранения
Ложноотрицательные результаты. Погрешности экстракции	Снижение выхода экстракции после кислотного гидролиза	pH пробы вне диапазона.	Анализ положительных контрольных проб мочи (QC). Интенсивность пика ВС не менее 70000 ед.	Заменить реактивы, посуду, повторить экстракцию
Погрешности упаривания	Потери амфетаминов и веществ, близких им по летучести	Слишком высокая температура и длительность упаривания (пересушивание экстракта)	То же	Снизить длительность упаривания. Температура упаривания не выше 75 ⁰ С, прекращать упаривание сразу после исчезновения жидкой фракции
Погрешности дериватизации	Неполная дериватизация	Наличие влаги в экстракте	То же, полноту дериватизации оценивают по внутреннему стандарту (не менее 75%)	Высушить экстракт, заменить дериватирующий агент
Ложноположительные результаты. Наличие определяемых веществ	Химическая память шприца	Загрязнения остатками предыдущих проб	Анализ отрицательных контрольных проб мочи (BLANK).	Промыть или заменить шприц

в пробе BLANK			Интенсивность пика ВС не менее 70000 ед.	
Наличие определяемых веществ в пробе BLANK	Химическая память узла ввода прибора	Загрязнения остатками предыдущих проб	То же	Заменить лайнер и полимерную мембрану в узле ввода (септу)
Наличие определяемых веществ в пробе BLANK	Загрязнения химической посуды	Некачественная мойка посуды	То же	Вымыть посуду водой с ПАВ, крышки промыть этанолом
Наличие определяемых веществ в пробе BLANK	Загрязнения реактивов и растворителей	Попадание следов определяемых веществ в реактивы	То же	Заменить реактивы и растворители

Эффективность использования методики

Согласно сложившейся мировой практике методы хромато-масс-спектрометрии являются наиболее селективными и специфичными при подтверждающем исследовании биологических объектов на наличие наркотических, сильнодействующих и психоактивных веществ. Однако, существуют методические проблемы мешающие надежному определению и приводящие к появлению ложноотрицательных результатов. Описание проблем и пути их решения даны ниже.

Проблема 1. При использовании программы AMDIS основными источниками ошибок идентификации являются плохая форма хроматографического пика и наличие высоких концентраций фоновых веществ, коэлюирующихся с целевыми компонентами. Для устранения этих мешающих влияний анализ выполняли по 4-м хроматографическим методам. Для этого нативные и дериватизированные экстракты в виде ТМС или ТФА производных анализировали по двум хроматографическим программам SCREEN и DOAS в режимах с делением и без деления потока (всего 4 процедуры). Главной задачей анализа по нескольким процедурам – элюировать определяемое соединение в том месте хроматограммы, которое свободно от фоновых соэкстрактивных компонентов. Поскольку состав мешающих матричных веществ в анализируемых образцах может быть различен, параметры меняют последовательно. Для этого готовили аликвоты пробы с гидролизом, без гидролиза. Из них готовят нативные и дериватизированные ТФА и ТМС экстракты, которые затем анализируют по 4 –м хроматографическим методам. Полную схему (Рис.1) используют при анализе на неизвестное вещество или при контрольном анализе.

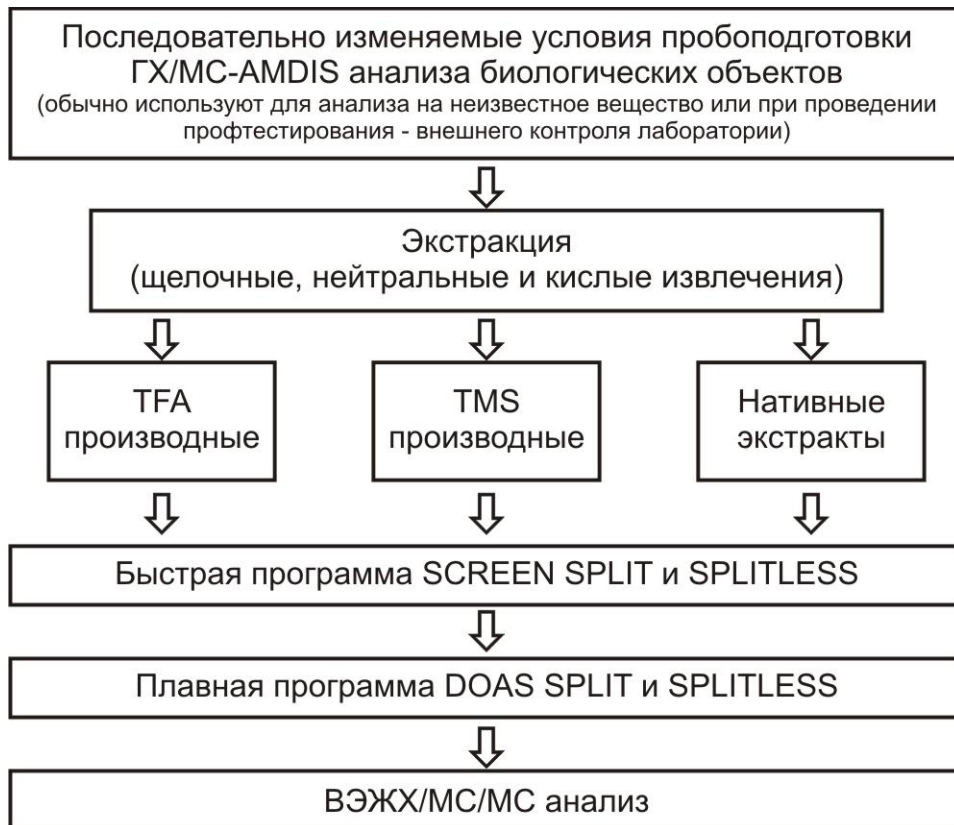


Рисунок 1. Применение методов ГХ/МС анализа с последовательно изменяемыми условиями.

Изменяемые ГХ условия для программы автоматической масс-спектрометрической деконволюции и идентификации (AMDIS)

AMDIS
идентификация
невозможна

ГХ-МС определение клофелина в моче

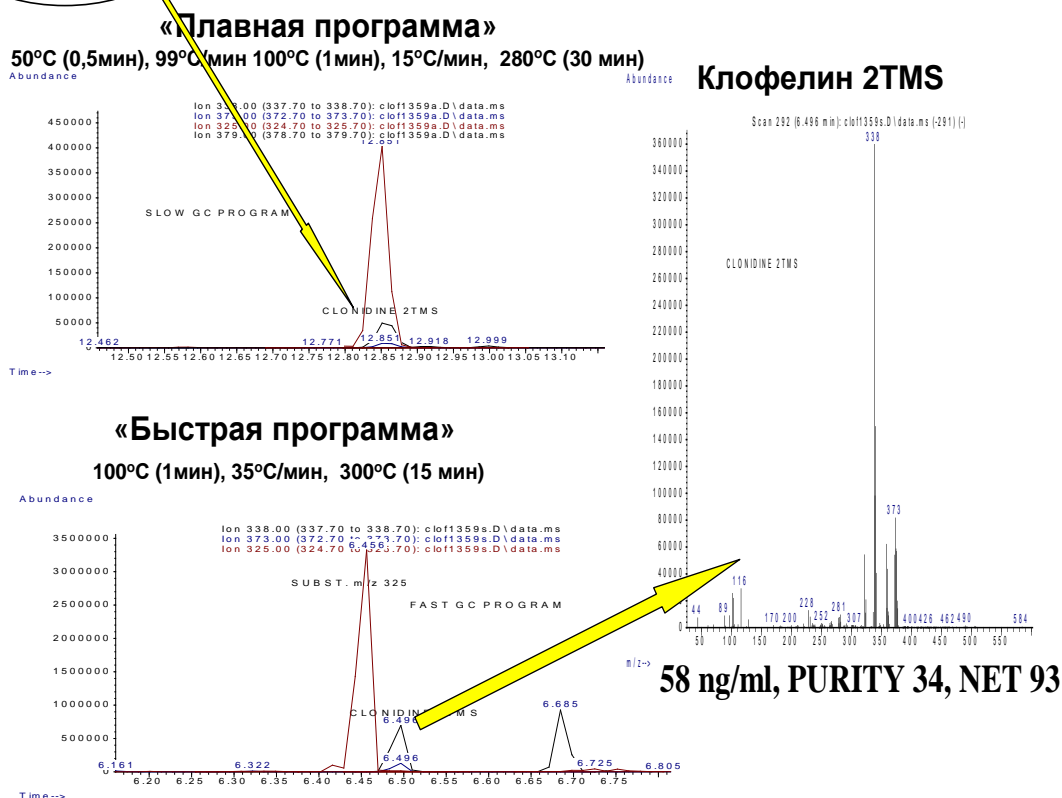


Рисунок 2. Хроматограммы (SCAN) пробы мочи содержащей клофелин.

При использовании «плавной» хроматографической программы наблюдали наложение на клофелин 2TMS созкстрактивного компонента, мешающего AMDIS идентификации. Применение «быстрой» программы позволило разделить пики мешающего компонента и клофелина 2TMS. Применение 4-х процедур позволило получить надежные результаты идентификации в наиболее сложных случаях хроматографических наложений, например, при определении клофелина в моче в виде ТМС.(Рис.2).

Контроль качества выполнения измерений

Воспроизводимость фиксированных времен удерживания на колонках HP-5MS дана в табл. 3, метрологические характеристики метода даны в табл. 4.

Таблица 3. Воспроизводимость фиксированных времен удерживания на колонках HP-5MS.

Вещество	Лаб.1*	Лаб.2	Лаб.3	Лаб.4	Лаб.5	среднее	Станд. откл.
Никотин	6.76		6.75	6.77	6.87	6.79	0,06
Котинин	10.08		10.06	10.06	10.00	10.05	0,03
Кофеин	11.10		11.13	11.11	11.06	11.10	0,03
Димедрол	11.38		11.37	11.37	11.37	11.37	0,01
Карбамазепин	14.65		14.72			14.69	0,05
Метамфетамин ТФА	7.33	7.40	7.31	7.33		7.34	0,04
Грамадол	12.07			12.08		12.08	0,01
Морфин 2ТФА	14.10	14.18	14.13	14.15	14.09	14.13	0,04
Буторфанол 2ТФА	16.76	16.81				16.79	0,04
Кодеин ТФА	14.49			14.53	14.	14.50	0,03
Папаверин	19.71		19.58	19.70	48	19.66	0,07

Таблица 4. Метрологические параметры методики определения веществ по процедурам 1, 2, 3

Нижний предел обнаружения веществ в режиме много-компонентного анализа полного сканирования с AMDIS идентификацией	70 нг/мл (морфин, амфетамин, диазепам)
Нижний предел обнаружения веществ в режиме мониторинга выбранных ионов SIM при количественном определении	10 нг/мл (морфин, тетрагидрокан-набиноловая кислота)
Воспроизводимость фиксированных времен удерживания при их переносе с прибора на прибор	+/- 0.05 мин

Список литературы

1. Савчук С.А. Система удаленной идентификации и распознавания объектов сложного состава. Патент на изобретение (19)RU(11) 77474 (13) (51) МПК G06K 17/00 (2006.01). Дата начала срока действия патента 15.07.2008. Опубликовано 20.10.2008 Бюл. №29.
2. Савчук С.А., Чибисова М.В., Апполонова С.А. Анохин Л.А. Способ выявления неизвестных веществ в биологических жидкостях пациентов, принимавших наркотические или психоактивные вещества. Положительное решение от 05 мая 2010 г. по заявке 2009109664/28(013081) от 18.03.2009.
3. Савчук С.А., Апполонова С.А. Способ идентификации наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях. Патент на изобретение RU 2390771 С1 МПК G01N 30/86 (2006 01) приоритет от 05 февраля 2009 г. Опубликовано 27.05.2010 бюлл. 15.
4. С.А.Савчук, А.Н.Веденин, А.В.Смирнов, Е.А.Симонов, О.Б.Дорогокупец, В.И.Сорокин, Ю.В.Кислун Исследование влияния продуктов и лекарственных препаратов на правильность определения опиатов и некоторых других наркотических средств в биологических объектах (моче). Лабораторный журнал 2002 №2 (2) декабрь 18-23.

Приложение 1.

Перечень библиотек масс-спектров, используемых для идентификации веществ, относящихся к наркотическим средствам, психотропным и сильнодействующим веществам

Название библиотеки	Формат	Для какой процедуры использовать	Последовательность использования AMDIS библиотек при автоматической идентификации
SAV_27R	AMDIS формат, 350 веществ с временами удерживания	1, 2	1
SAV_stim02		1, 2	2
SAV_TMS		3	1
PMW_TOX3, 2011.	AMDIS формат, 6360 спектров	1,2,3	2
NIST 08, 11,12	PBM формат, 175 000 спектров	1,2,3	Только для «ручной» идентификации
PMW_TOX3, 2007, 2011.	PBM формат, 6360 спектров	1,2,3	Только для «ручной» идентификации
Wiley 7n, W10	PBM формат, 392086 спектров	1,2,3	Только для «ручной» идентификации

Приложение 2.

Оборудование общелабораторного назначения и реактивы

№ п/п	Тип оборудования
1.	Автоматические пипетки вместимостью 200-1000 мкл и наконечники к ним.
2.	Автоматические пипетки вместимостью 10-100 мкл. И наконечники к ним.
3.	Микрошприцы хроматографические на 10 мкл Hamilton, Agilent Technologies для автоинжектора.
4.	Виалы стеклянные с завинчивающейся пробкой и тефлонированной мембраной вместимостью 2 мл (для работы с автоинжектором) Agilent Technologies, Thermo.
5.	Виалы стеклянные с завинчивающейся пробкой и тефлонированной мембраной вместимостью 4 мл Agilent Technologies.
6.	Виалы стеклянные с завинчивающейся пробкой и тефлонированной мембраной вместимостью 9 мл (16 мм x 100 мм) или экстракционные пробирки TOXI-LAB Tubes A-100.
7.	Стеклянная мерная колба вместимостью 10-мл.
8.	Стеклянный мерный цилиндр вместимостью 100 мл

9.	Лабораторные штативы под виалы 16 мм x 100 мм
10.	Выпаривательные чашки-колпачки TOXI-LAB (можно заменить виалами Agilent Technologies вместимостью 4 мл).
11.	Подставка для работы с алюминиевыми выпаривательными чашками-колпачками TOXI-LAB Omega-12 (можно заменить металлическим лабораторным штативом под виалы вместимостью 4 мл).
12.	Весы аналитические пределом измерения 0.1 мг.
13.	Центрифуга лабораторная, 3-6 тыс об/мин.
14.	Центрифуга лабораторная, 14 тыс об/мин.
15.	Патроны для твердофазной экстракции AccuBONDII EVIDEX 3 мл/200 мг. Agilent Technologies.
16.	Устройство для твердофазной экстракции, включающее штатив для патронов (картриджей) для твердофазной экстракции с регулятором вакуума, предохранительным клапаном с вакуумным мембранным насосом, обеспечивающий вакуум (20 мм. Рт. Ст.)
17.	Ультразвуковая баня мощностью не менее 240 Вт.
18.	Шейкер орбитальный
19.	Вибромиксер
20.	Фильтры полимерные 0.5 мкм для фильтрации экстрактов
21.	Фен лабораторный мощностью не менее 800 Вт.
22.	Лабораторная посуда Shott Duran (квадратные стеклянные бутылки для реактивов) с пластиковыми закручивающимися пробками вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000 мл.
23.	Вставки в виалы с коническим дном вместимостью 250 мкл,

Дериватизирующие агенты для ГХ-МС анализа

Реактив	Кол-во
BSTFA + 1% TMCS (N,O-Bis(trimethyl)trifluoroacetamide) with 1% Trimethylchlorosilane) Фирма производитель: Supelco cat.No 33149-U, можно также ACROS ORGANICS	50 мл
PFPAА pentafluoropropionic anhydride Фирма производитель: ACROS ORGANICS Code:416931000 CAS:356-42-3	100-200 мл
PENTAFLUOROPROPANOL (2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propanol) Фирма производитель: ACROS ORGANICS Code:303790250 CAS:422-05-9	100-200 мл
TFAA trifluoroacetic anhydride Фирма производитель: ACROS ORGANICS	100-200 мл

Растворители и реактивы для ГХ-МС анализа

Наименование	Ед. изм.	Количество На 1000 анализов
Гелий марки «А». 99.995% ТУ 51-940-80	Баллон	0.4
Метанол (HPLC grade)	л	0.6
Ацетонитрил (HPLC grade)	л	0.6
Пропанол-2 (HPLC grade)	л	0.9
Гептан (HPLC grade)	л	0.9
Этилацетат (HPLC grade)	л	0.9
Бутилацетат (HPLC grade)	л	0.9
Изооктан (триметилпентан) (HPLC grade)	л	1.5
Метилен хлористый «Lichrosolv» (HPLC grade)	л	2.1
1,2-Дихлорэтан (HPLC grade)	л	0.9
Натрия хлорид ч.д.а.	кг	1.5
Ацетон (HPLC grade)	л	0.1
Толуол (HPLC grade)	л	0.1
Карбонат натрия ч.д.а.	кг	0.2
Бикарбонат натрия ч.д.а.	кг	0.2
Гидроксид натрия ч.д.а.	кг	0.6
Кислота соляная ХЧ	л	0.6
Аммиак 25% водный	л	2
Перекись водорода 33%	л	2
Калия фосфат двузамещенный K_2HPO_4 ч.д.а.	кг	0.6
Калия фосфат однозамещенный KH_2PO_4	кг	0.6
Натрия фосфат двузамещенный Na_2HPO_4	кг	0.6
Натрия фосфат одноамещенный NaH_2PO_4	кг	0.6
Ацетат натрия	кг	0.6
Уксусная кислота	л	0.6
Ортофосфорная кислота	л	0.1
Трихлоруксусная кислота	кг	0.1
Дифениламин >99%	г	0.1

Пример веществ различных групп,
определяемых по процедуре 1

	Целевые вещества	RT DOAS, МИН	m/z, в скобках интенсивность
1.	Δ 8-Tetrahydrocannabinol,	15.46	314(160)299(20)271(90)258(100) 231(270)193(60)174(40)
2.	2-Amino-5-Chlorobenzophenone	12.69	195 (11) 214 (6) 230 (100) 232 (40)
3.	2-Amino-5-Nitrobenzophenone	15.11	165 (180) 195 (29) 241 (100) 242 (84)
4.	2-Amino-5-nitrodenzophenone TFA	13.45	105 (100) 191 (37) 269 (40) 338 (62)
5.	2-Methylamino-5-Chlorobenzophenone	13.07	193(38) 228(45) 244 (91) 245 (100)
6.	2-METHYLAMINOPROPIOPHENON	6.68	
7.	2-Pyrrolidinone,1,5-dimethyl-3,3-diphenyl	13.60	
8.	3,4-Methylenedioxy-amphetamine (MDA),	8.01	179(3)136(40)105(3)77(12)44(100)
9.	3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA	8.90	135(10)105(2)72(100)44(20)
10.	3-N-pentyl-.delta.9-tetrahydrocannabinol	15.63	314(80)299(100)271(45)256(25)321(80)
11.	4-ACETYLAMINOANTIPYRINE-9 analgine met	14.17	56(100) 84 (58)203(40) 245(45)
12.	4-Methylthioamphetamine (MTA)	8.77	181(3)166(2)138(30)122(15)91(7)78(4)44(100)
13.	4-OH-Methamphetamine 2TFA	8.69	110(22)154(100)230 (203)
14.	6-ACETYL-MORPHINE, 6-MAM	14.95	364 (100) 311 (8) 423 (57)
15.	6-MAM, 6-AC Morphine	16.22	327(100)284(10)268(100)215(35)204(15)162 (15)146(25)
16.	Acetaminophen	9.87	151(10)109(400)80(10)53(5)43(10)
17.	Acetaminophen TFA (Paracetamol TFA)	8.86	108 ₁₀₀ 205 ₅₁ 247 ₂₆
18.	Adiphenine	13.76	167(10)152(5)99(10)86(100)
19.	Alphaprodine	10.89	261(5)187(50) 172(100)144(20)129(15)84(35)57(20)42(20)
20.	Aminochlorbenzophenone TFA	12.21	180 ₄₃ 258 ₃₈ 327 ₇₁ 329 ₂₃
21.	Aminochlorbenzophenone TFA	12.17	180 40 258 37 327 70
22.	Amitriptylinoxide -(CH3)2NOH	15.12	204 ₃₁ 219 ₃₉ 232 ₁₀₀
23.	Amitriptyline	13.74	58 ₁₀₀ 202 ₄ 215 ₂
24.	Amobarbital	10.14	141 (80) 156 (100)
25.	Amphetamine,	4.584	120(5)115(3)91(15)65(10)44(100)
26.	Amphetamine TFA	6.18	91 ₄₉ 18 ₉₇ 140 ₁₀₀
27.	Amphetamine TFA	6.31	140(100)118(100)91(60)65(20)
28.	p-OH-Amphetamine TFA	7.77	140 ₁₀₀ 203 ₁₂ 230 ₇₅
29.	Analgine -M	12.47	299(100)230(77)83(62)56(98)
30.	ANALGINE MET.	12.34	56(100)84(75)203(90)
31.	ANALGINE-M TFA	13.15	56(90)123(70)216(80)313(100)
32.	Androst-2-en-17-one, (5.alfa.)	14.11	91(80)161(55)218(100)272(75)
33.	ANDROSTERONE TFA	14.85	342(85)368(25)386(100)
34.	Anhydroecgonine	7.28	152 (100) 166 (7) 181 (32)
35.	Aprophene TAREN comp. major	13.95	86(100)99(47)181(40)
36.	Aprophene	13.94	325(2)310(5)253(3)181(20)165(15)99(30)86 (100)
37.	Atropine	13.77	94(25)124 (100) 289(23)

38.	Barbital	8.20	141(94)156 (100)
39.	BENZOIC ACID 4-AMINO-2-DIETHYLAMINOETHER	12.56	86(100)99(45)120(25)
40.	Benzphetamine TFA	11.23	91 ₁₀₀ 148 ₉₀
41.	Benzylamphetamine	11.16	148(90)91(100)65(10)
42.	Bromantane TFA	13.00	247 ₁₀₀ 343 ₂₀ 360 ₂₂ 402 ₂₁
43.	Bromantane-M(OH) TFA	14.94	247 ₃₆ 269 ₈ 515 ₈
44.	Buthorphanol (stadol)2TFA	14.76	350 ₃₀ 351 ₉ 464 ₁₀₀ 465 ₂₁
45.	Buthorphanol (stadol)-M TFA	15.91	350 ₂₄ 414 ₁₇ 464 ₁₀₀ 465 ₂₂
46.	Caffeine	11.09	194(100)165(6,5)109(60,4)82(28,4)67(41,5)55(38,7)42(14,0)
47.	Cannabichromene	14.91	314(10)299(5) 231(100)174(20)
48.	Cannabicomaronone	15.13	328(60)313(20) 285(100)271(20)257(50)243(20)214(50)202(15)185920
49.	Cannabidiol	14.92	314(10)246(13) 231(100)193(10)174(10)
50.	Cannabigerol	16.01	316(15)247(15)231(40)193(100)123(30)
51.	Cannabinol,	16.20	310(10)295(100)238(15)223(5)
52.	Carbamazepine	14.64	165(25) 193(100) 236(28)
53.	CARBAMAZEPINE MET	12.87	151(25)179(100)207(80)
54.	CARBAMAZEPINE MET/artifact	12.18	16(25)193(100)204(20)
55.	Carbamazepine-10,11-epoxide	12.88	151 (23) 179 (100) 207 (81)
56.	CARBAMAZEPINE-M (ACRIDINE)	11.00	151 (9) 178 (23) 179 (100)
57.	CARPHEDON	13.57	160 ₉₃ 174 ₁₀₀ 218 ₂₂
58.	Carphedon 2TFA	9.63	270 ₁₀₀ 290 ₅ 367 ₂₇
59.	CARPHEDON Nitril	11.60	104 ₁₀₀ 173 ₃ 200 ₃₀
60.	CATHINE, NORPSEUDOEPHEDRINE	6.53	140(100)203(10)230(20)
61.	Cathine TFA (orpseudoephedrine TFA)	6.40	140 ₁₀₀ 203 ₆ 230 ₁₁
62.	Chlorphenamine-M (bis-nor-) AC	13.90	167 ₄₁ 203 ₆₁ 216 ₁₀₀ 218 ₃₄
63.	CHLORPHENIRAMINE	12.41	167(25)203(100)
64.	Chlorpheniramine	12.41	167 ₂₀ 203 ₁₀₀ 205 ₃₃
65.	Chlorpromazine	16.12	232 ₆ 272 ₁₃ 274 ₅ 318 ₂₂ 320 ₈
66.	Chlorpromazine	16.00	58 ₁₀₀ 232 ₉ 272 ₁₄ 318 ₂₄
67.	Chlorpromazine,	15.94	318(50)272(30)232(15)86(30)58(100)
68.	Chlorprothixene	15.92	58 (100) 221 (15)
69.	Clobenzorex TFA	12.97	125 ₁₀₀ 230 ₂₃ 264 ₁₅
70.	Clozapine	20.32	192 (227) 243 (256)
71.	Coaxil (Tianeptine)-M	25.29	228 (100) 255 (46) 283 (24) 297 (23) 311 (26) 390 (18)
72.	Cocaethylene	14.11	196 83 272 12 317 17
73.	Cocaine	13.76	82 ₁₀₀ 182 ₉₆ 272 ₉ 303 ₂₀
74.	Cocaine	13.80	303(10)272(5)198(5)182(550)94(250)82(600)
75.	Cocaine-M (methylecgonine) TFA	7.69	182 (100) 264 (10) 295 (25)
76.	CODEINE	15.18	299(100),282(10),229(30),162(40)

77.	Codeine TFA	14.49	282(100),395(70),266(15),225(15)
78.	Cropropamide	8.98	69 ₇₅ 100 ₁₀₀ 168 ₃₃
79.	Crotethamide	8.44	69 ₆₂ 86 ₁₀₀ 154 ₃₃
80.	Desomorphine	14.17	214 ₃₀ 228 ₁₇ 256 ₁₅ 270 ₃₈ 271 ₁₀₀
81.	Desomorphine TFA	13.213	324 ₁₈ 350 ₁₂ 352 ₁₈ 367 ₁₀₀
82.	Diazepam	15.58	221 ₂₇ 256 ₁₀₀ 283 ₉₀ 283(250)256(300)241(50)221(100)
83.	Dicaine (Tetracaine)	13.88	150 176 193
84.	Diethyltryptamine	11.74	216(3)144(3)130(5)115(3)86(100)58(5)42(2)
85.	Diphenhydramine	11.37	58(290)73(60)152(20)165(40)
86.	Doxepin	13.95	58(100),152(5),165(5)178(5)189(5)202(3)279(3M)
87.	Doxepine	14.01	58 100 165 2 189 1
88.	Ecgonine N,O-di TFA	6.06	164 100 194 28 232 40 308 36
89.	Ephedrine,	7.04	58(100)77(15)91(3)
90.	Ephedrine TFA	7.13	110 ₂₄ 154 ₁₀₀ 244 ₃
91.	Ephedrine 2TFA	7.21	244(10)154(100)110(20)69(10)
92.	Etamivan TFA	10.17	247, 318,319
93.	Ethamivan	11.54	151 (100) 222 (26) 223 (22)
94.	Ethylephrine TFA	8.04	126 ₂₈ 154 ₁₀₀ 217 ₃
95.	Ethylmorphine	15.39	313(100)284(25)256(15)243(20)214(25)162(45)
96.	Ethylmorphine TFA	14.78	409(100)380(20)296(100)281(50)266(30)
97.	Etofylline TFA	12.07	206 (37) 207 (38) 320 (100)
98.	Fenazepam-Hy TFA	13.51	224 ₂₈ 226 ₂₈ 336 ₁₇ 405 ₄₀ 407 ₄₉
99.	Fenfluramine TFA	7.63	140 ₃₁ 159 ₁₇ 168 ₁₀₀
100.	Fenproporex TFA	10.09	118 ₅₉ 140 ₄₄ 152 ₁₃ 193 ₁₀₀
101.	Fentanyl	18.17	245(400)189(125)146(220)132(30)105(60)91(30)77(50)
102.	Fludiazepam	15.88	273 (53)274 (100) 283 (37) 302 (93)
103.	Haloperidol-M (N-desalkyl-) AC	14.17	210 (70) 237 (30) 255 (36) 309 (10)
104.	Haloperidol-M -2H2O	9.67	127 (33) 154 (27) 189 (100) 191 (33)
105.	Heroine,	17.29	369(140)327(200)310(110)268(150)215(70)204(65)
106.	Hexobarbital	11.34	155 (23) 157 (37) 221 (100)
107.	Hydrocodone	15.72	242 ₅₁ 243 ₃₃ 270 ₁₁ 284 ₁₃ 299 ₁₀₀
108.	Hydromorphone TFA	14.83	325 ₇₁ 352 ₁₆ 381 ₁₀₀
109.	Imipramine	13.98	193 (35) 234 (100) 280 (29)
110.	ISTD DPA	9.27	169 ₁₀₀ 168 ₆₃ 167 ₃₃
111.	Ketamine TFA	12.08	262 (35) 270 (63)276 (16) 298 (20) 305 (14)
112.	Levorphanol TFA	12.33	150 ₇₁ 285 ₈₁ 352 ₈₄ 353 ₁₀₀
113.	MDA TFA	9.35	135 ₁₀₀ 162 ₄₀ 275 ₁₃

114.	MDA-M/precursor-3	7.86	105 ₇ 135 ₁₀₀ 136 ₁₀ 178 ₂₃
115.	MDMA TFA	10.40	154 ₁₀₀ 162 ₇₉ 289 ₁₅
116.	Meconin,	10.31	194(90) 176(40) 165(100) 147(80)
117.	Mefenorex TFA	10.26	118 ₄₄ 140 ₄₉ 216 ₁₀₀ 218 ₄₃
118.	Meperidine	10.46	172 ₂₇ 218 ₂₀ 247 ₃₅ 247(40) 232(10) 218(23) 190(8) 172(30) 71(100) 57(25) 42(23)
119.	Meprobamate	10.74	144(20), 114(20), 96(30), 83(100), 71(50), 62(40), 55(80)
120.	Mescaline TFA	10.91	181 ₁₀₀ 194 ₃₃ 307 ₃₂
121.	Mescaline,	9.93	211(30) 182(100) 167(60) 151(20) 139(10)
122.	Methadone,	13.38	72(100) 91(3) 115(3) 165(3) 178(3) 223(4) 294(5)
123.	Methamphetamine	5.13	58(100) 65
124.	Methamphetamine TFA	7.35	110 ₂₈ 118 ₃₂ 154 ₁₀₀ 154(100) 118(45) 110(50) 91 (23) 69(20)
125.	Methaqualone,	13.52	233 ₃₀ 235 ₁₀₀ 250 ₃₀ 250(30) 235(100) 217(5) 207(5) 143(5) 132(10)
126.	Methorphan	13.38	171 ₃₉ 214 ₄₁ 271 ₁₀₀
127.	Methoxyphenamine TFA	8.90	91 ₅₀ 110 ₆₀ 121 ₃₀ 148 ₁₀₀ 154 ₉₉
128.	Methylaminochlorbenzophenone TFA	12.51	236 (96) 288 (22) 307 (16) 340 (20)
129.	Methylaminopropiophenon	6.68	105(5) 77(15) 58(100) 42(5)
130.	Methylenedioxy-meth-amphetamine (MDMA),	8.50	193(1) 135(5) 77(5) 58(100)
131.	Methylphenidate	11.40	180 ₁₀₀ 150 ₈
132.	Methylphenidate	10.31	172(3) 150(5) 91(15) 84(100) 65(3) 56(10)
133.	Morphine 2TFA	14.10	364 ₁₀₀ 477 ₂₅
134.	Morphine mono-TFA	14.44	268 ₁₀₀ 381 ₅₆ 382 ₁₃
135.	Morphine,	15.58	285(120) 268(20) 215(40) 162(50) 42(45)
136.	N,N-Dimethyltryptamine	10.65	188(10) 143(5) 130(10) 115(5) 77(5) 58(100) 42(5)
137.	N,N-DIMETHYLTRYPTAMINE		
138.	Naltrexone 2TFA	15.61	420 ₄₀ 436 ₂₉ 492 ₁₉ 533 ₁₀₀
139.	Naltrexone-M TFA	14.40	518 ₇₃ 534 ₅₁ 632 ₂₁
140.	Naltrexone-M TFA	16.09	422 ₁₃ 480 ₁₄ 494 ₅₀ 535 ₁₀₀
141.	Nicotine	6.76	161(40) 162(40) 133(80) 84(280) 42(60)
142.	Nikethamide	8.76	78 ₃₈ 106 ₁₀₀ 177 ₄₆
143.	Nitrazepam	18.85	Doas 206 234 253 264 280
144.	Nordazepam		241 ₈₉ 242 ₁₀₀ 269 ₈₇
145.	Norephedrine TFA	6.34	140 ₁₀₀ 203 ₆ 230 ₁₁
146.	Norfenyramine TFA	12.57	167 (41) 169 (70) 182 (100)
147.	norketamine	11.10	
148.	Norketamine TFA	10.83	239 (54) 256 (72) 275 (50) 284 (100)

149.	Nortriptyline	13.86	44(100)202(5)215(3)
150.	Noscapine	27.10	220(100)205(20)
151.	Octopamine TFA	7.93	287,315,328
152.	Oxazepam	14.80	205 ₉₆ 233 ₇₅ 239 ₉₁ 268 ₁₀₀
153.	Oxycodone	16.43	315(100)300(5)281(10)258(20) 230(50)201(20)187(17)140(17)115(17)
154.	Papaverine,	19.70	338(100)324(90)308(30)293(20)
155.	Phenazepam	18.10	315 319 321 350
156.	Phencyclidine	11.61	242(40)200(100)186(20)166(17)117(10)91(30)
157.	Phendimetrazine	DPATFA 9.13	85 ₉₁ 117 ₇ 191 ₁₃
158.	Phendimetrazine	7.950	191(15)117(10)105(10)85(90)70(15)57(100)42 (50)42(50)
159.	Pheniramine	11.19	167 (15) 168 (36) 169 (100) 182 (3)
160.	Phenproporex	9.160	97(100)68(10)56(22)
161.	phentermine 4.968		
162.	Phentermine TFA	6.34	114 (24) 132 (45) 154 (100)
163.	Phenylephrine TFA	8.18	140 ₁₀₀ 328 ₇ 342 ₃
164.	Prolintane	9.51	126 ₁₀₀ 174 ₆
165.	Promazine	14.67	199 (34) 238 (40) 284 (60)
166.	Promedol (Trimeperidine)	11.14	186 100 201 18
167.	Propoxyphene	13.54	58 ₁₀₀ 91 ₄ 115 ₃ 117 ₁
168.	Propylcannabinol	14.65	282(18)267(100)238(20)223(10)
169.	Pseudococaine	10.97	82 (96) 182 (100) 303 (22)
170.	(+)-PSEUDOEPHEDRINE	7.04	58(100)77(15)91(3)
171.	Pseudoephedrine TFA	7.52	110 ₂₄ 154 ₁₀₀ 244 ₃
172.	Pseudoephedrine 2TFA	7.70	154(100)110(60)69(50)56(20)
173.	Scopolamine	14.64	138, 154, 303
174.	Sibitramine	10.96	72 ₁₄ 114 ₁₀₀ 115 ₁₀
175.	Sibutramine-M (bis-nor-) TFA	10.90	137 ₃₀ 165 ₁₀₀ 263 ₆
176.	Sibutramine-M (nor-) TFA	11.92	140 ₂₈ 154 ₃₅ 196 ₁₀₀
177.	Sidnocarb TFA	14.36	91 ₁₀₀ 119 ₂₉ 230 ₁₈ 299 ₃
178.	Sinephrine TFA	8.17	140 ₁₀₀ 328 ₁₆ 342 ₆
179.	Struchnine	27.72	333 (34) 334 (100) 335 (51)
180.	Tenocyclidine	11.609	249(40)206(55)192(15)165(80)123(20)110(15) 97(100)84(22)
181.	Trifluopeazine	17.62	407(80)306(30)280(20)266(30)248(30)141(40) 113(100)70(70)
182.	Trifluoropromazine	13.90	248(10)234(10)86(20)58(100)
183.	Trimeperazine,	14.45	298(40)252(15)198(15)180(13)58(100)
184.	TRIMEPRAZINE	14.47	58 ₁₀₀ 198 ₁₀ 252 ₇ 298 ₂₁
185.	Tropacocaine	12.05	245(30)140(10) 124(100)105(20) 94(40)82(80)67(20)42(23)