

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НАРКОЛОГИИ

«Утверждаю»

Директор ФБГУ ННЦ Наркологии
Минздрава России профессор, д.м.н.
Е.А.Кошкина



«14» сентября 2014 г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ И ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИ-
ЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И ВОЛОСАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С
МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Информационное письмо

Москва
2014 г.

Аннотация

Разработан метод подтверждающего химико-токсикологического исследования на наличие наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях (моче,) и волосах человека методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Метод предназначен для врачей клинической лабораторной диагностики химико-токсикологических лабораторий наркологических диспансеров.

Организация разработчик: ФБГУ ННЦ Наркологии Минздрава России совместно с ЦХТЛ 1-го МГМУ им.И.М.Сеченова.

Авторы:. д.х.н. Савчук С.А., д.х.н., профессор Б.Н.Изотов

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

Метод хромато-масс-спектрометрии (ХМС, ГХ-МС) основан на сочетании двух аналитических методов: капиллярной газовой хроматографии - метода наиболее селективного по возможности разделения веществ и метода масс-спектрометрии – метода наиболее селективного и чувствительного по детектированию и структурной идентификации компонентов. Наиболее информативные и надежные результаты получают в режиме полного сканирования с регистрацией масс-спектра. Использование режима мониторинга выбранных ионов позволяет повысить чувствительность определения (на порядок величины), но снижает надежность идентификации.

Методика ГХ-МС анализа основана на идентификации определяемых веществ, выделенных из образцов мочи жидкость/жидкостной или твердофазной экстракцией с последующей дериватизацией и хромато-масс-спектрометрическим . 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 СО.

Показания и противопоказания к использованию новой метода

ПОКАЗАНИЯ:

- диагностика факта употребления наркотических и психоактивных веществ.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ: отсутствуют.

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 реактивы дан в Приложении 2.

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

Описание метода

Метод включает 3 аналитические процедуры подготовки пробы и анализа. При необходимости определения низких концентраций анализируют пробы после кислотного или ферментного гидролиза. При определении метаболитов героина анализируют пробы без гидролиза. Выявление фактов потребления употребления героина выполняют по наличию в пробе 6-моноацетил морфина (6-МAM).

Процедура 1: кислотный гидролиз экстрация 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: щелочной гидролиз экстрация при pH 3, дериватизация пентафторпропионовым ангидридом с пентафторпропанолом (ПФПА и ПФПОН)

Определяемое вещество детектируют в виде пентафторпроизводного (ПФП):
11- нор –дельта- 9-карбокситетрагидроканнабиноловая кислота

- ПФП производные веществ, определяемых по процедуре 1

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

- Псилоцин, псилоцибин TMS
- Бензоилэкгонин TMS
- Метаболиты JWH-018, 073, 250 TMS
- TMS производные веществ, определяемых по процедуре 1.

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

Определение в моче веществ неполярной и слабополярной природы по процедуре 1

По процедуре 1 определяются вещества входящие в состав наркотических средств, психотропных и сильнодействующих веществ с неполярными и м слаболярными свойствами (см. приложении 3). Для выявления веществ данной группы выполняются следующие процедуры.

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 стандартном 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). Раствор 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 90⁰C. Гидролизат охлаждают до комнатной температуры. К гидролизату добавляют 300 мкл аммиака 10% - ного водного и экстрагируют, как описано ниже.

Выделение веществ, определяемых по процедуре 1, 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 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 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, укупоривают крышкой с тефлонированной мембраной, встряхивают реакционную смесь на вибромиксере 2-3 сек, выдерживают 30 мин при 55⁰C, после чего удаляют остаток дериватизирующего 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.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. 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 и 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.

Условия ГХ-МС анализа. 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 газа-носителя (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 4) 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 газа-носителя (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.

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.

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.

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.

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 дериватизирующий агент
Ложноположительные результаты Наличие определяемых веществ в пробе BLANK	Химическая память шприца	Загрязнения остатками предыдущих проб	Анализ отрицательных контрольных проб мочи BLANK). Интенсивность пика ВС не менее 70000 ед.	Промыть или заменить шприц
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 медицинской технологии

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) [3]. Главной задачей анализа по нескольким процедурам – получить определяемое соединение в том месте хроматограммы, которое свободно от фоновых соэкстрактивных компонентов. Поскольку в реальных может варьироваться состав эндогенных и целевых компонентов параметры меняют последовательно. Для этого 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 используют при анализе на неизвестное вещество или при контрольном анализе.

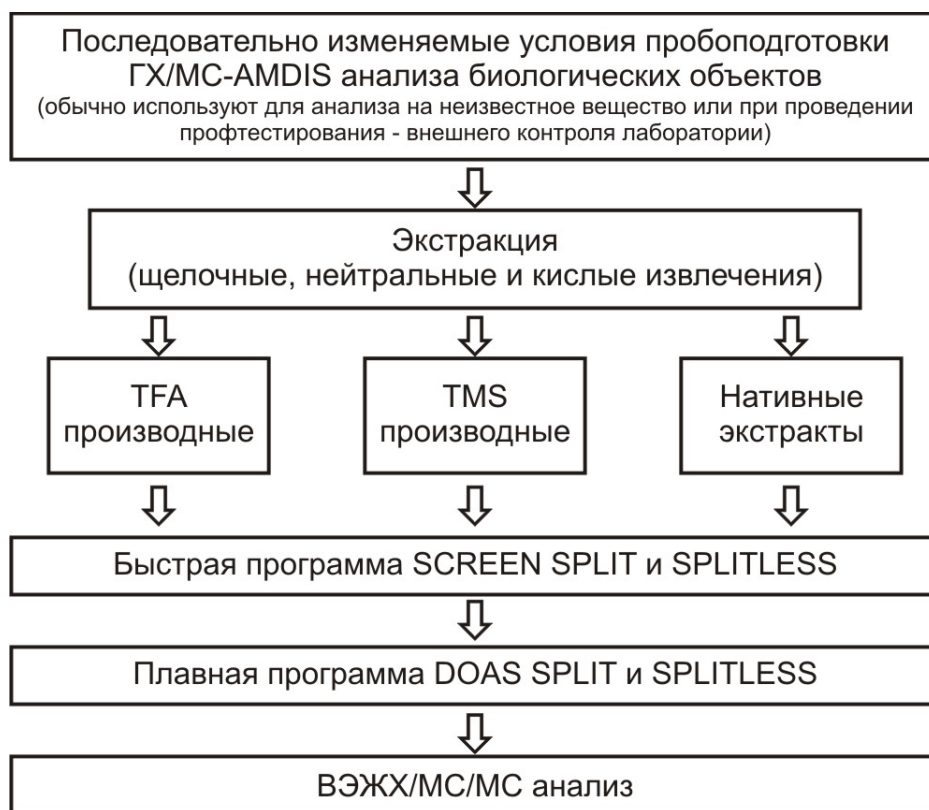


Рисунок 2. Применение методов ГХ/МС анализа с последовательно изменяемыми условиями.

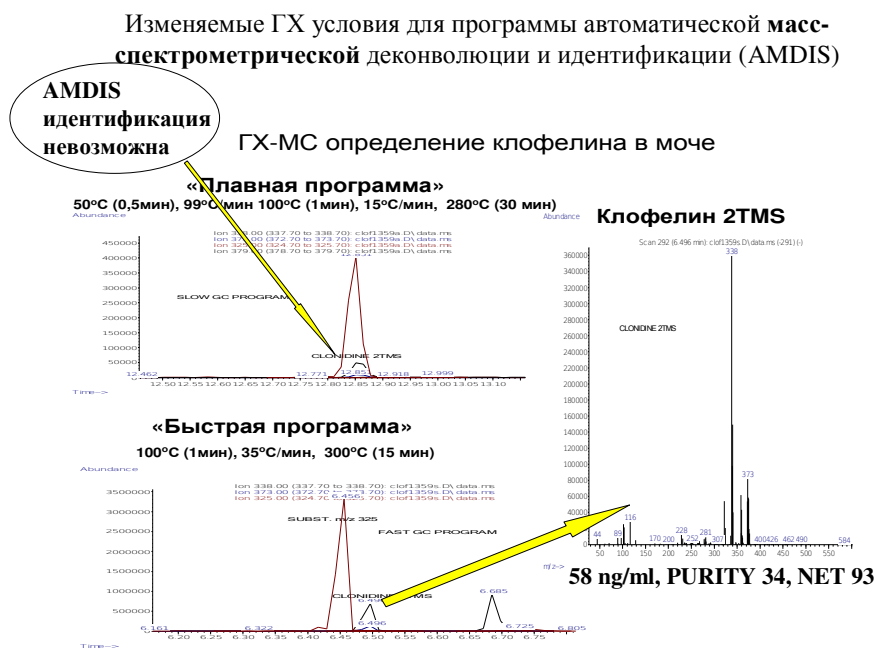


Рисунок 3. Хроматограммы (SCAN) пробы мочи содержащей клофелин.

При использовании «плавной» хроматографической программы наблюдали наложение на клофелин 2TMS соэкстрактивного 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 TMS.

Контроль качества выполнения измерений

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
Трамадол	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 (см. раздел Описание новой медицинской технологии).

Нижний предел обнаружения веществ в режиме многокомпонентного 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, тетрагидроканнабиноловая кислота)
Воспроизводимость фиксированных времен удерживания при их переносе с прибора на	+/- 0.05 мин

Акты внедрения

Эффективность методики подтверждена актами внедрения от следующих организаций:

1. Химико-токсикологическая лаборатория Ярославской областной клинической наркологической больницы.
2. Химико-токсикологическая лаборатория Наркологического диспансера Псковской области.
3. Химико-токсикологическая лаборатория Саратовской областной психиатрической больницы Святой Софии.
4. Химико-токсикологическая лаборатория ОГУЗ «Орловский наркологический диспансер».
5. Судебно-химическая лаборатория ОГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Белгорода
6. Судебно-химическая лаборатория Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы, Республика Татарстан, г.Казань
7. Судебно-химическая лаборатория ГУЗ «Калужское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Калуга
8. Химико-токсикологическая лаборатория Сургутского клинического психоневрологического диспансера. г. Сургут, Ханты–Мансийский автономный округ.
9. Химико-токсикологическая лаборатория ФУ «1080 Центральный военный госпиталь» 12 ГУ МО РФ, г.Сергиев-Посад Московской области.
10. Судебно-химическая лаборатория ГУ Бюро судебно-медицинской экспертизы, Республика Саха (Якутия) г. Якутск.
11. ФГУП «Антидопинговый центр» г. Москва.

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 C1 МПК G01N 30/86 (2006 01) приоритет от 05 февраля 2009 г. Опубликовано 27.05.2010 бюл. 15.

4. "Reconstructed Mass Spectra, A Novel Approach for the Utilization of Gas Chromatograph—Mass Spectrometer Data", Biller, J.E.; Biemann, K. Anal. Lett. 1974 7 515-528.
5. "Spectral Deconvolution for Overlapping GC/MS Components" Colby, B. N. J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 1992 3 558-562.
6. "Software-Based Mass Spectral Enhancement to Remove Interferences from Spectra of Unknowns", Herron, N.R.; Donnelly, J.R.; Sovocool, G.W. J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 1996 7 598-604.
7. "Automated Extraction of Pure Mass Spectra from Gas Chromatographic / Mass Spectrometric Data", Pool, W.G.; Leeuw, J.W.; van de Graaf, B. J. Mass Spectrom. 1997 32 438-443.
8. "Extraction of Mass Spectra Free of Background and Neighboring Component Contributions from Gas Chromatography/Mass Spectrometry Data" Dromey, R.G; Stefik, M.J.; Rindfleisch, T.C; Duffield, A.M. Anal. Chem. 1976 48 (9) 1368-1375.
9. "An Evaluation of Automated Spectrum Matching for Survey Identification of Wastewater Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry" Shackelford, W.M.; Cline, D.M.; Faas, L; Kurth, G. Analytica Chim. Acta 1983 146 25-27.
10. "Improvement of Algorithm for Peak Detection in Automatic Gas Chromatography-Mass Spectrometry Data Processing" Hargrove, W.F.; Rosenthal, D.; Cooley, P.C. Anal. Chem. 1981 53 538-539.
11. "Optimization and Testing of Mass Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification" Stein, S.E.; Scott, D.R. J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 1994 5 859-866.
12. Б.А. Руденко, С.А.Савчук, Е.С.Бродский. Хроматографическое определение обезболивающих наркотических средств (Обзор) Журнал Аналитической Химии 1996 Т51. №2. 182-201
13. Н.В.Веселовская, С.А.Савчук, Б.Н.Изотов, Свойства и анализ опиоидного анальгетика Трамадола (Обзор) Вопросы наркологии 1998, №2 С. 41-53
14. С.А.Савчук, Н.В.Веселовская, Е.С.Бродский, А.А.Формановский, В.В.Чистяков, Б.Н. Изотов, Применение хроматографии и хроматомасс-спектрометрии для изучения фармакокинетики и метаболизма пропофола, клофелина, фенциклидина и трамадола (Обзор) Хим.-Фарм. Журнал 1999, №10, с. 29-52.
15. Н.В.Веселовская, С.А.Савчук, Б.Н.Изотов Хроматографический анализ фенциклидина, его метаболитов и аналогов в биологических жидкостях (обзор) //Судебно медицинская экспертиза 1999 г., №2 с.20-25.
16. С.А.Савчук, А.Н.Веденин Применение программы фиксации времен

- удерживания при хромато-масс-спектрометрическом определении анализируемых веществ Российский химический журнал(Ж.Рос.хим.об-ва им. Д.И.Менделеева), 2003, т.XLVII, №1, с.141.
- 17.С.А.Савчук, Е.А.Симонов, В.И.Сорокин, О.Б.Дорогокупец, А.Н.Веденин. Применение метода фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом и хроматографическом определении наркотических средств// Журнал Аналитической Химии , 2004, Т.59, №10, с.1059-1069.
- 18.С.А.Савчук, Б.А.Руденко, Н.А.Давыдова, Е.С.Бродский, Т.Ф.Боровкова Определение анестезирующего препарата Кетамин в крови методом капиллярной газовой хроматографии с применением термоионного детектирования и хромато-масс-спектрометрии Журнал Аналитической Химии 1995 Т50. N12. С. 1324-1329
- 19.С.А.Савчук, Е.С.Бродский, Б.А.Руденко, А.А.Формановский, И.В.Михура, Н.А.Давыдова //Хромато-масс-спектрометрическое определение продуктов биотрансформации анестезирующего препарата Кетамин Журнал Аналитической Химии 1997 Т52. N12. С. 1299-1311
- 20.С.А.Савчук, Е.С.Бродский, А.А.Формановский, В.В.Ерофеев, Е.В.Бабанова, В.В. Чистяков, М.Л. Рабинович, О.А.Долина, Б.А.Руденко. Применение газовой хроматографии с селективным детектированием и хромато-масс-спектрометрии для идентификации метаболитов Кетамина и исследования процессов конъюгации Кетамина и его метаболитов в организмах человека и крыс //Журнал Аналитической Химии 1998 Т53. N.6. С. 663-670
- 21.С.А.Савчук, Е.С.Бродский, А.А.Формановский, Е.В.Бабанова, Н.В.Веселовская, Б.Н.Изотов, Г.М. Родченков, В.В.Ерофеев, Б.А.Руденко Артефакты при хромато-масс-спектрометрическом определении препаратов для внутривенного наркоза (I). Трамадол, связь между структурой метаболитов и примесных веществ (II) Журнал Аналитической Химии 2000, Т.55, № 4, с.430-442.
- 22.ЛазаревВ.В., Галибин И.Е., Савчук С.А., Изотов Б.Н., Веденин А.Н., Р.П.Васина. Фармакокинетика и метаболизм кетамина на фоне болюсного введения рентгеноконтрастных средств при рентгеноэндоваскулярных вмешательствах у детей //Ж. Анестезиологии и реаниматологии. 2001 №1 с.38-43.
- 23.Лазарев В.В., Поляев Ю.А., Савчук С.А., Изотов Б.Н. Влияние болюсного введения рентгеноконтрастных средств на фармакокинетику кетамина и течение анестезии при рентгенохирургических вмешательствах у детей Научно-практический журнал “Детская больница”. 2001 №2 с.12-17.
- 24.Симонов Е.А., Савчук С.А., Сорокин В.И. Кислун Ю.В. Ключев Е.А. //Оксибутират, его прекурсоры и метаболиты Наркология 2002 №3 с.12-19.
- 25.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.

26. А.М.Григорьев, С.А.Савчук Обзорные библиотеки удерживания (ГЖХ). Опыт согласования значений. Полученных для разных пневматических режимов Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии Самара 6-9июля 2009 г. с. 96.

27. Савчук С.А., Родченков Г.М., Щербакова Т.Г., Кирюшин А.Н. Сравнительное ГХ-МС исследование метаболизма обезболивающих наркотических средств и способ идентификации новых метаболитов. Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии Самара 6-9июля 2009 г. с. 186.

28. Савчук С.А., Родченков Г.М., Апполонова С.А., Никитина Н.М. Опыт практического применения новых ГХ-МС методик в системе химико-токсикологических лабораторий и спортивном тестировании Тезисы докладов Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии Самара 6-9июля 2009 г. с. 58

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	AMDIS формат, 6360 спектров	1,2,3	2
NIST 08	PBM формат, 175 000 спектров	1,2,3	Только для «ручной» идентификации
PMW_TOX3, 2007	PBM формат, 6360 спектров	1,2,3	Только для «ручной» идентификации
Wiley 7n	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 выпарительными 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 вials, Conical Inserts with Polymer Feet 250 µL glass inserts with polymer feet and mandrel interior 100/pk 5181-1270

Дериватизирующие агенты для ГХ-МС анализа

Наименование	ед. изм.	Кол-во на 1 анализ, мкл
Пентафторпропионовый ангидрид, pentafluoropropionic anhydride, PFPAА	мл	100
Пентафторпропанол. Pentafluoropropanol .	мл	50
Трифторуксусный ангидрид, trifluoroacetic anhydride, TFAА	мл	100
N,O –бис(триметилсилил—трифторацетамид, N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) with 1% Trimethylchlorosilane, BSTFA + 1%TMCS или N-метил (N-триметилсилил—трифторацетамид, N-methyl(N-trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, MSTFA *	мл	100
*При наличии в лаборатории отдельного прибора для процедуры определения веществ в виде TMS производных		
Уксусный ангидрид	мл	100
Пиридин	мл	100
Beta-глюкуронидаза		

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 для ВЭЖХ (HPLC grade)	л	0.6
Пропанол-2 «ОСЧ 13-5»	л	0.9
Гептан ХЧ	л	0.9
Этилацетат ХЧ	л	0.9
Изооктан (триметилпентан) ХЧ	л	1.5
Метилен хлористый ХЧ «Lichrosolv»	л	2.1
1,2-Дихлорэтан	л	0.9
Натрия хлорид ч.д.а.	кг	1.5
Ацетон	л	0.1
Толуол	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 10% водный	л	0.6
Дифениламин >99%	г	0.1

Приложение 3

Методика определения 11- нор –дельта- 9-карбокси ТГК в моче

Реактивы

Для щелочного гидролиза используют NaOH или КОН.

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

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

Приготовление 5М КОН. К 2.8г КОН 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 карбокси-ТГК (10 мкг/мл) в метаноле.

К 900 мкл метанола добавить 100 мкл исходного раствора карбокси-ТГК (100 мкг/мл).

Или К 450 мкл метанола добавить 50 мкл исходного раствора карбокси-ТГК (100 мкг/мл).

Базовый стандартный раствор карбокси-ТГК (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 карбокси-ТГК

а. 6 нг/мл Карбокси-ТГК-калибратор.

- 1) Внести 9.4 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу.
- 2) Добавить 600 мкл раствора карбокси-ТГК (0,1 мкг/мл).

б. 15 нг/мл Карбокси-ТГК-калибратор.

- 1) Внести 8.5 мл мочи в 10-мл стеклянную мерную колбу.
- 2) Добавить 1500 мкл раствора карбокси-ТГК (0,1 мкг/мл).
- 3) Доведите объем до метки (10 мл) мочой.

с. 50 нг/мл Карбокси-ТГК-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 карбокси-ТГК (10 мкг/мл).

д. 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.

е. 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 изеооктан-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 растворить в 100 мкл этилацетата. 1 мкл в хроматограф.

Дериватизация. (вариант 2). Силилирование. К сухому остатку добавить 70 мкл BSTFA выдержать 30 мин при 70°C, 1мкл 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-СООН-PFP m/z 607, 622, 459 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-СООН-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 NH_4OH 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).

Приложение 4.

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-Chlorbenzophenone	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 analgin 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(2 0)
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.	Analgin -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.	Cannabicumaronone	15.13	328(60)313(20) 285(100)271(20)257(50)243(20)214(50)202(15)185(20)
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)1 62(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(7 0)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.	Methylenedioxymeth-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.	Octopanine 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)9 1(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(10) 0)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)11 0(15)97(100)84(22)
181.	Trifluopeazine	17.62	407(80)306(30)280(20)266(30)248(30)14 1(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)
------	--------------	-------	---

Приложение 5.

Применение методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотических веществ в волосах

¹Савчук С.А., ²Никитина Н.М., ³Зулаева А.С., ⁴Несмеянова Н.И., ⁴Константинова С.Д.

1 – Национальный научный центр наркологии МЗ.

2- Наркологический диспансер Псковской области.

3- Городское бюро судебно-медицинской экспертизы, Москва.

4 – Бюро судебно-медицинской экспертизы, Якутск.

К обнаружению веществ в образцах волос в последние годы увеличивается интерес судебной и клинической токсикологии. Анализ волос расширяет возможности химико-токсикологических лабораторий по обнаружению наркотических и лекарственных веществ в организме человека. Волосы как объект имеют некоторые преимущества перед мочой или кровью, такие как наиболее долгое удерживание попавших в организм человека токсикантов, легкодоступность для корректного отбора и исследования [13], стабильность образцов волос (они не нуждаются в специальных условиях хранения как биожидкости и могут храниться в простом бумажном конверте). Анализ волос по сегментам позволяет установить время потребления веществ по месяцам из расчета, что скорость роста волос приблизительно равна 1 см в месяц. Также к преимуществам выбора волос в качестве биообъекта для исследования можно отнести меньший процент получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов из-за включения в процесс подготовки пробы стадии отмытки от поверхностных загрязнений [6].

С помощью современных аналитических методов в волосах можно обнаружить практически любые классы токсикантов. Главной особенностью исследования волос является правильный подбор механизма пробоподготовки для более полного извлечения аналитов из внутренней части волоса [6]. В соответствии со строением волоса и спецификой образцов волос большинство исследователей выделяют несколько стадий пробоподготовки: отмытка образцов волос, извлечение и экстракция образцов волос [2,4-8].

Идентификация веществ из экстрактов волос в основном проводится газовой хроматографией/масс-спектрометрией [1,2,4,5,6], у которой есть недостаток - потребность дериватизации полярных аналитов, к которым относятся большинство наркотических веществ. Эта проблема решена с помощью использования метода жидкостной хроматографии с традиционными детекторами или в тандеме с различными масс-спектрометрическими детекторами, например как тройной квадруполь, ионная ловушка или время-пролетная масс-спектрометрия [2,3,6,8,11].

Стадия отмытки является одной из обязательных, так как позволяет исключить факт внешнего загрязнения образца волос исследуемыми веществами. В основном для отмытки используются растворы щелочи или органические спирты, или другие растворители [2-4,7,10]. Настаивание проводить необходимо в течение 15 минут, а затем промывать дистиллированной водой.

Симонов Е.А. и др. предлагают волосы последовательно отмывать 2 мл 0,2N раствора хлористоводородной кислоты и 2 мл метанола (или этанола), по 10 минут каждым. Операция проводится до полного исчезновения в последнем растворителе, после его упаривания, следов наркотического средства [1].

Некоторые исследователи предлагают следующий вариант отмывки: волосы, разделенные на сегменты, моют шампунем и ополаскивают деионизированной водой, затем споласкивают уксусом и просушивают в течение ночи на воздухе или при температуре 60°C [6,8].

После высушивания образцы волос режут на сегменты и помещают в пробирки для дальнейшего изолирования.

Все описываемые в литературе методы изолирования аналитов из образцов волос можно объединить в несколько вариантов [2,6]:

- 1) Щелочной гидролиз. Проводится настаивание проб волос с раствором NaOH (до 2,5М) при 37°C в течение ночи. При увеличении температуры проведения изолирования время экспозиции соответственно снижается. После этого доводят кислотой pH до 9 и проводят жидкость-жидкостную экстракцию. Данный метод изолирования используют в основном для обнаружения каннабиноидов [4,9,10,12], амфетаминов, нейролептиков и психостимуляторов [4,7]
- 2) Ферментативный гидролиз проводят с раствором глюкуронидазы в течение 2 часов при 40°C. После центрифугирования обычно проводят ТФЭ. Данный метод экстракции описан для 6-МAM и кокаина, бензодиазепинов [4,].
- 3) Кислотный гидролиз возможно проводить несколькими методами.
 - с растворами соляной или серной кислот при 37°C в течение ночи. При увеличении температуры проведения гидролиза сокращается время экспозиции. После нейтрализации проводят ТФЭ [2] или жидкость-жидкостную экстракцию смесью растворителей [1,3]. Данный метод используется для извлечения веществ морфиновой группы, бензодиазепинов, антипсихотических средств, кокаина.
 - с метанолом [1,4], часто при использовании настаивания в ультразвуковой бане в течение нескольких часов [5,6]. Используется для обнаружения веществ группы опиатов, тетрагидроканнабинола, кокаина;
 - с метанолом, подкисленным раствором соляной кислоты. Извлечение проводится с использованием ультразвуковой бани в течение 1 часа [2], затем настаивание в течение ночи. Данный вид изолирования используется для выделения меторфана [3], амфетаминов [8,11].
 - метанол + ТФ кислота (9:1) с использованием ультразвуковой бани в течение 1 часа, затем настаивают при повышенной температуре в течение ночи. После чего проводят ТФЭ. Частный метод изолирования проводится для обнаружения 6-МAM, метадона, кокаина [2,8]

Прямое метанольное извлечение показало более высокую степень и чистоту извлечения аналитов [4,6]. При исследовании на амфетамины и другие стимуляторы показано целесообразное применение в щелочного гидролиза, так как при этом получают более полные извлечения [4]. После кислотного и щелочного гидролиза, дающего более «грязные» извлечения чаще всего используется ТФЭ [6]. При анализе волос на содержание каннабиноидов используется только щелочной гидролиз [4,7].

Для отдельных групп веществ, например амфетамины и другие стимуляторы, успокоительные средства, кокаин и опиаты, каннабиноиды, описано значительное количество методик анализа. Но по разработке скрининговых методик было опубликовано всего

несколько работ [3]. Поэтому несомненно разработка скрининговых методик для введения в рутинную работу является наиболее перспективным направлением.

Экспериментальная часть

Подготовка образцов волос для анализа. Сравнивали три варианта гидролиза волос: кислотного, щелочного и ферментного. Также сравнивали жидкостную и твердофазную экстракцию.

Ферментный гидролиз

- Образец волос отмывали от загрязнений в химическом стакане с водным раствором ПАВ.
- Промывали деионизированной водой до полного удаления моющего средства, промыть метанолом.
- Высушивали и измельчали (ножницами).
- Взвешивали, масса навески 20-100 мг навесок волос
- Добавляли 1 мл водного раствора (рН 6.5.) β -глюкуронидазы 1/10.
- Выдерживали при 40° С в течение 12 часов.
- Обрабатывали на 1 час на ультразвуковой бане.
- Центрифугировали в течение 5 минут 14000 об/мин.
- Водную фазу отделяли и обрабатывали методом твердофазной экстракции.

Кислотный гидролиз. К навеске волос добавляли 1 мл 5М HCl. Выдерживали 45 мин при 90° С.

Щелочной гидролиз. К навеске волос добавляли 1 мл 1М КОН. Выдерживали 40 мин при 50° С.

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 металлический 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, рН 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 μ л этилацетата.
 -

Аппаратура ГХ-МС. Скрининговый анализ выполняли на хроматографе с масс-селективным детектором Agilent 7820/5975 Маэстро с колонками HP-5MS.

Условия анализа: газ-носитель гелий, скорость потока через колонку 2 мл/мин. Программа: 50⁰С(0.5мин) 99⁰С /мин 100⁰С (1мин) 15⁰С/мин 280 ⁰С (30 мин) время удерживания ВС ДФА 9.27 мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования:

Анализ в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN)

Температура источника ионов 230⁰С

Температура анализатора 150⁰С

Диапазон масс m/z 29-650 а. е. м.

Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройки по перфторбутиламину в режиме ATUNE + 100 кВ.

Идентификацию веществ выполняли веществ в режиме автоматической AMDIS идентификации по фиксированным временам удерживания [14-16].

Аппаратура ВЭЖХ-МС/МС. Жидкостный хроматограф Agilent 1200 с tandemным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6460 с электроспреей ионизацией

Условия ВЭЖХ анализа [17]. Колонка: Prontosil C₁₈ 75 мм 2.1 мм 5 мкм

Элюенты: А- ацетат аммония водный (0.15 г на 100 мл), с добавлением 50 мкл муравьиной кислоты). В - метанол

Условия элюирования: 5%B300 мл, 90%B1025 мл, 90%B1600 мл, 100%B1610 мл 100%B2400 мл.

Объем вводимой пробы 10 мкл.

Результаты и их обсуждение

Целью исследования было - оптимизировать методы подготовки и твердофазной очистки малых навесок проб волос. Анализировали волосы от трупа и от живых лиц. Целевые вещества: новые синтетические стимуляторы, известные наркотические и лекарственные препараты.

Выбор и обоснование методов гидролиза. Сравнивали кислотный щелочной и ферментный гидролиз. Условия представлены в разделе экспериментальная часть. Для анализа использовали три навески волос по 100 мг, полученные от одного образца. Волосы были отобраны от трупа и, как показал предварительный анализ, содержали трамадол и его метаболиты.

Также проводили оптимизацию методики ферментного гидролиза. Исследовали влияние различных значений pH: 4.0, 6.5 и 7.5 на эффективность гидролиза.

Полученные гидролизаты волос подвергали твердофазной очистке.

Результаты ГХ-МС анализа показали, что ферментный гидролиз наиболее эффективен при всех трех значениях pH. При кислотном гидролизе наблюдали значительные до 70% потери трамадола, при щелочном гидролизе трамадол в исследуемых волосах обнаружен не был.

Влияние твердофазной очистки на чувствительность определения. Сравнивали результаты анализа навесок (100 мг) волос, отобранных от трупов и содержащих параметоксиметамфетамин. Навески подвергали кислотному гидролизу с последующей жидкостной или твердофазной экстракцией. Результаты ГХ-МС анализа показали, что применение твердофазной экстракции позволяет на порядок величины поднять чувствительность определения. Наиболее эффективно совмещать твердофазную экстракцию с предварительным ферментным гидролизом. ГХ-МС профили (в режиме полного сканирования) экстрактов гидролизатов волос даны на рис. 1 и 2.

Abundance

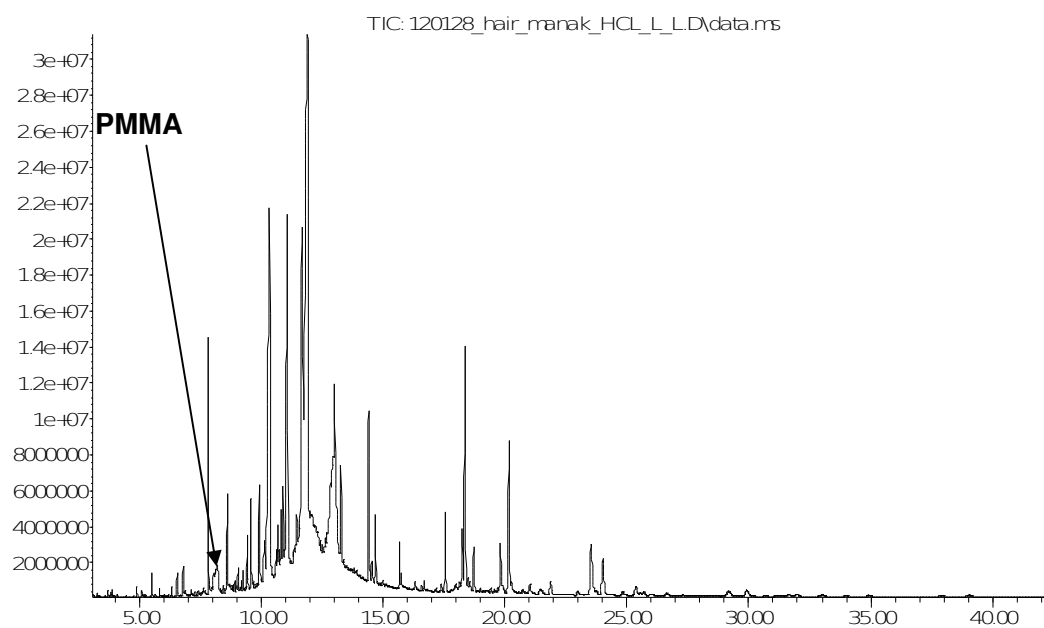


Рис.1. p-Метоксиметамфетамин в волосах трупа, кислотный гидролиз (5M HCL), жидкостная экстракция смесью растворителей метиленхлорид-гептан-изопропанол 7:2:1. (100 мг волос)

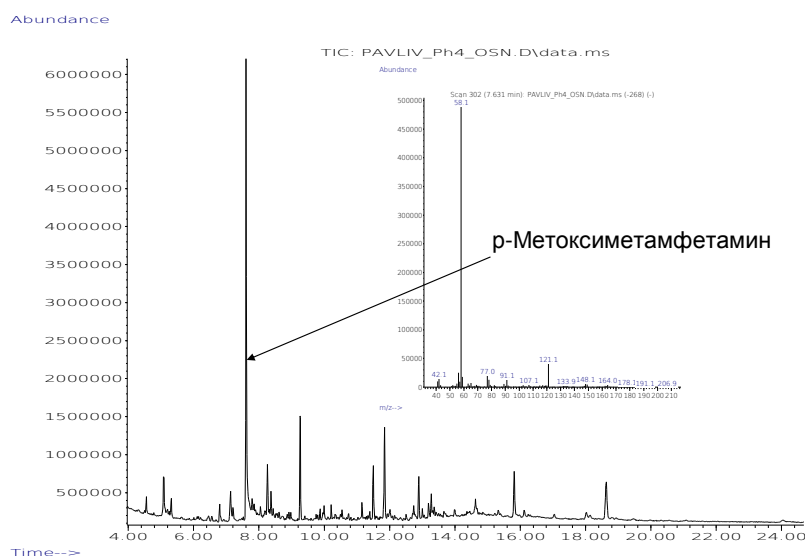


Рис. 2. Хроматограмма по полному ионному току экстракта гидролизованных волос трупа р-Метоксиметамфетамин в волосах трупа, ферментный гидролиз pH 4, SPE Bond Elute Certify (100 мг волос)

Выбор и сравнение картриджей твердофазной очистки для ГХ-МС анализа волос.

Сравнивали два типа патронов для твердофазной экстракции Bond Elute Certify и AccuBond II SPE Evidex. Исследовали навески по 50 мг волос, содержащие различные наркотические и лекарственные препараты. Для подготовки образцов использовали ферментный гидролиз. Полученные результаты позволяют говорить о сравнимой эффективности твердофазной очистки при использовании обоих картриджей. Однако, при определении метадона мы столкнулись с проблемой, которая заключалась в следующем. При использовании картриджей Bond Elute Certify на ГХ-МС хроматограмме наблюдали элюирование незначительного количества фоновых углеводов. Пик одного из гомологов этих фоновых веществ накладывался на пик метадона и препятствовал его определению. Это происходило из-за того, что масс-спектр фонового вещества содержал значительный фрагментный ион m/z 72, а этот ион является целевым ионом метадона. При этом в масс-спектре метадона отсутствуют другие ионы пригодные для детектирования. В исследуемом случае метадон удалось определить при сравнении профилей волос содержащих и не содержащих метадон. Однако масс-спектр метадона в этих образцах удалось зафиксировать только в случае использования картриджей AccuBond II SPE Evidex. Профили и масс-спектры представлены на рис. 3. Применение ВЭЖХ-МС/МС позволяет уверенно определять метадон при использовании обоих картриджей. Профиль экстракта волос, содержащих метадон представлен на рис.4.

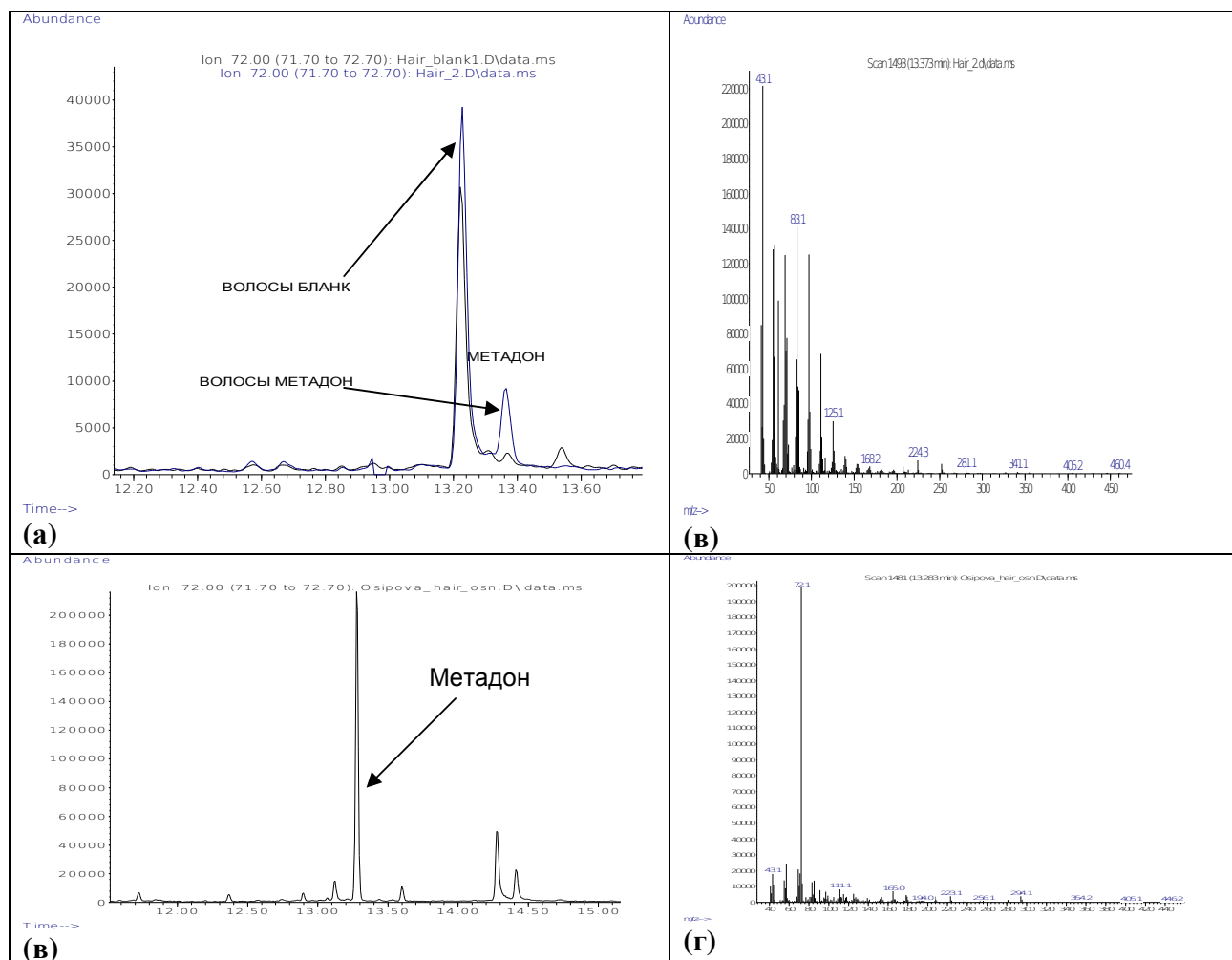


Рис 3(а). Наложение ГХ-МС профилей (по m/z 72) образцов волос, содержащих и не содержащих метадон. Ферментный гидролиз, картридж Bond Elute Certify.

Рис 3(б). Наложение масс-спектров метадона и фонового вещества, картридж Bond Elute Certify.

Рис 3(в). ГХ-МС профиль (по m/z 72) образца волос, содержащего метадон. Ферментный гидролиз, картридж AccuBond II SPE Evidex.

Рис 3(г). Масс-спектр метадона, зафиксированный в образце волос, картридж Bond Elute Certify.



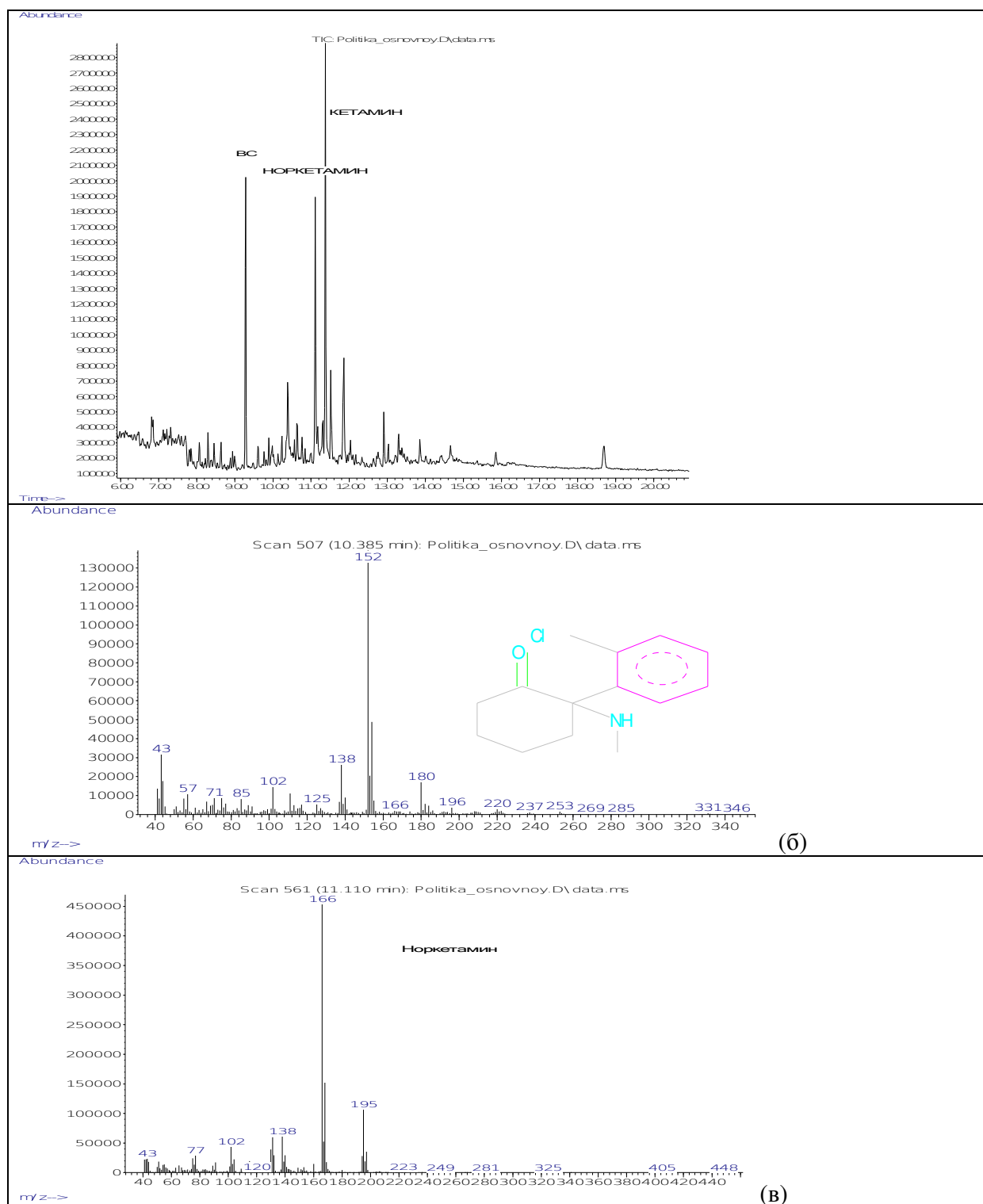
Рис 4. ВЭЖХ-МС/МС профиль (MRM 310/265) образца волос, содержащего метадон. Ферментный гидролиз, картридж AccuBond II SPE Evidex.

Рис 3(г). Масс-спектр метадона, зафиксированный в образце волос, картридж Bond Elute Sertify.

Анализ малых навесок волос

Исследовали возможность анализа малых навесок волос. Анализировали 20, 50 и 100 мг пробы. Полученные результаты позволяют сделать следующий вывод. Возможно анализировать без потери чувствительности малые навески волос (20 мг) при этом объем финального экстракта, поступающего на анализ, должен быть уменьшен и составлять 25-30 мкл.

На рис. 5 и 6 даны ГХ-МС профили экстракта волос, масса навески 20 мг. В исследуемом образце. обнаружены: кетамин с метаболитами и кокаин с метаболитом (ангидроэкогонина метиловым эфиром), а также никотин и кофеин..



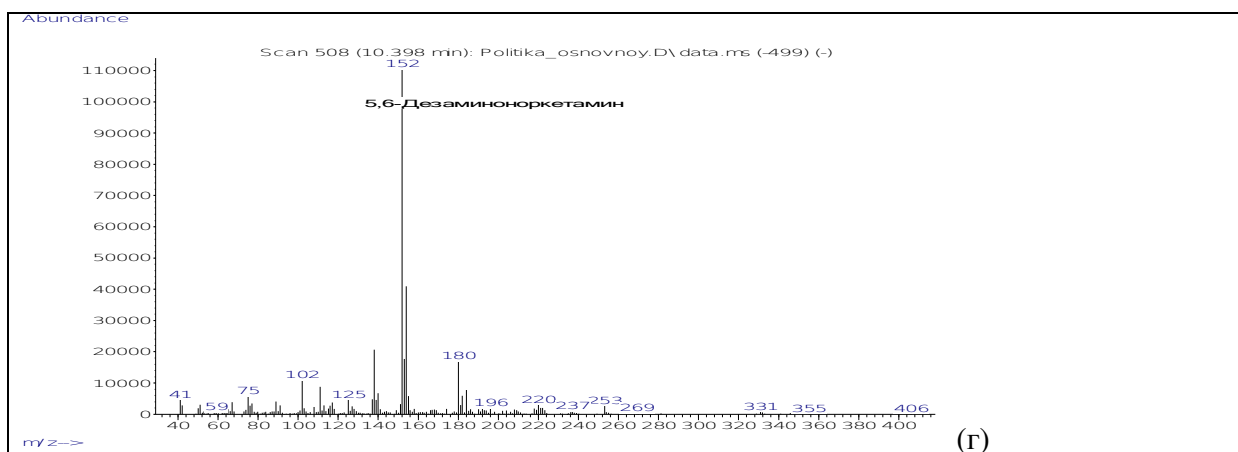
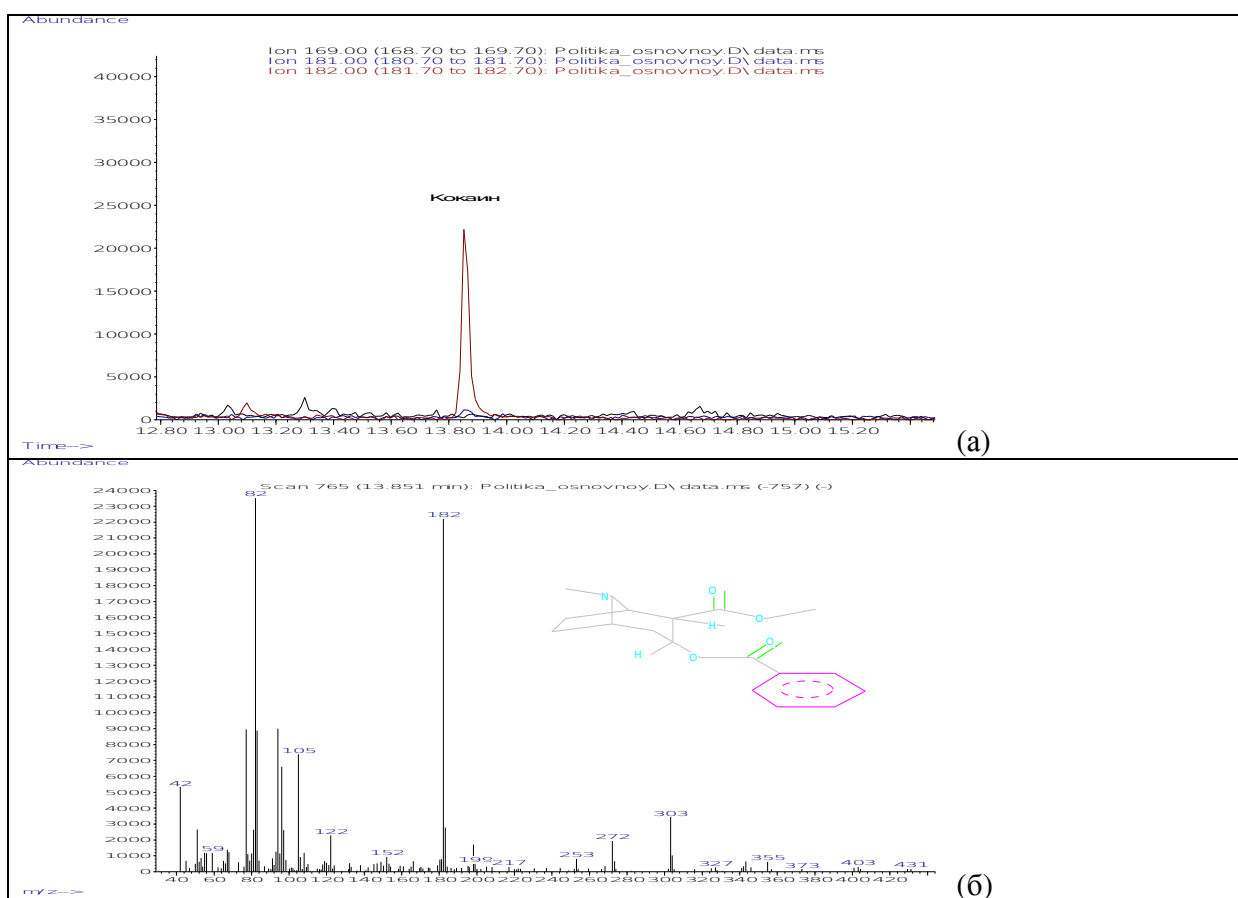


Рис. 5.(а) - Хроматограмма исследуемой пробы (SCAN) по экстрагированным ионам, соответствующим внутреннему стандарту, кетамину и его метаболитам. Вещества идентифицированы по временам удерживания и по масс-спектрам. Пик с временем удерживания 11.37 мин соответствует кетамину, 11.10 мин – норкетамину, 10.39 мин – 5,6-дезаминоноркетамину, 9.28 – дифениламин, внутренний стандарт. Масс-спектры представлены на рис. 5 (б-г), соответственно.



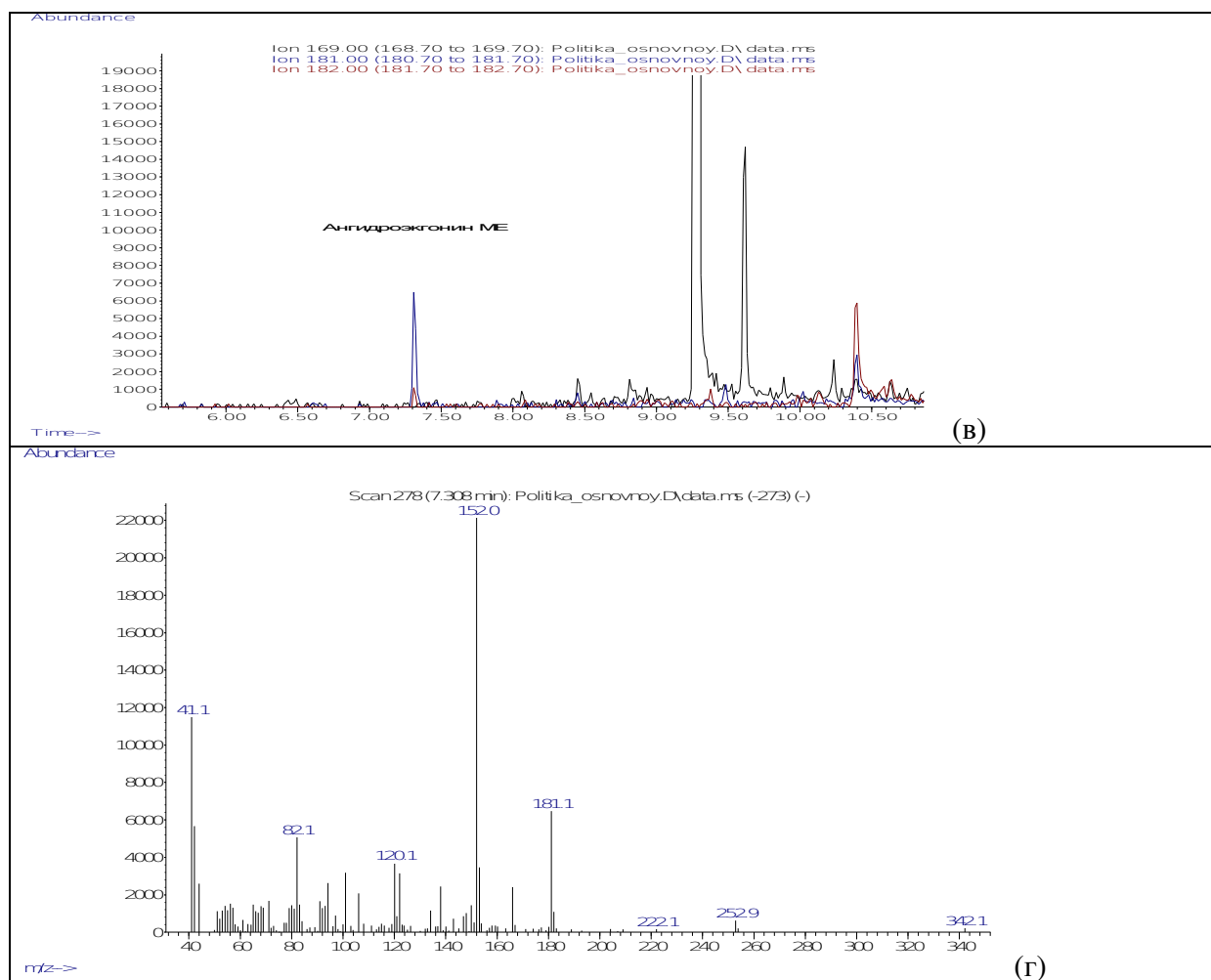


Рис. 6. - Хроматограмма исследуемой пробы (SCAN) по экстрагированным ионам, соответствующим кокаину и метиловому эфиру ангидробензоилэконина. Вещества идентифицированы по временам удерживания и по масс-спектрам. Пик с временем удерживания 13.85 мин соответствует кокаину, 7.31 мин – метиловому эфиру ангидробензоилэконина. Масс-спектры представлены на рис. 6 (б,г), соответственно.

Список литературы

- 1) Е.А. Симонов, Б.Н. Изотов, А.В. Фесенко «Наркотики: методы анализа на коже, в её придатках и выделениях» М.: «Анахарсис», 2000.—130 с.
- 2) Yuji Nakahara «Hair analysis for abused and therapeutic drugs» - **Journal of Chromatography B**, 733 (1999) 161–180
- 3) Yvan Gaillard, Gilbert Pe´pin «Testing hair for pharmaceuticals» - **Journal of Chromatography B**, 733 (1999) 231–246
- 4) Hans Sachsa, Pascal Kintzb «Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992» - **Journal of Chromatography B**, 713 (1998) 147–161
- 5) Katrin Lachenmeier, Frank Musshoff, Burkhard Madea «Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by

- gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation» - Forensic Science International 159 (2006) 189–199
- 6) Juan C. Domínguez-Romero, Juan F. García-Reyes, Antonio Molina-Díaz «Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry» - Journal of Chromatography B, 879 (2011) 2034– 2042
 - 7) Elissandro Soares Emídio, Vanessa de Menezes Prata, Fernando José Malagueño de Santana, Haroldo Silveira Dória «Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair» - Journal of Chromatography B, 878 (2010) 2175–2183
 - 8) Donata Favretto, Susanna Vogliardi, Giulia Stoccherob, Alessandro Nalesso, Marianna Tuccia, Santo Davide Ferrara «High performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples» - Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 6583– 6595
 - 9) Analytical methods for abused drugs in hair and their applications
 - 10) Elissandro Soares Emídio, Vanessa de Menezes Prata, Haroldo Silveira Dyre «Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry» - Analytica Chimica Acta 670 (2010) 63–71
 - 11) «Development of a simultaneous analytical method for selected anorectics, methamphetamine, MDMA, and their metabolites in hair using LC-MS/MS to prove anorectics abuse» - Anal Bioanal Chem (2012) 403:1385–1394
 - 12) «Segmental Hair Analysis for 11-Nor-D9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid and the Patterns of Cannabis Use» - Journal of Analytical Toxicology 2012;36:195–200
 - 13) Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие (под ред. Н.И. Калетиной) – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016 с. с ил.
 - 14) 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.
 - 15) С.А.Савчук, А.Н.Веденин Применение программы фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом определении анализируемых веществ Российский химический журнал (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2003, т. XLVII, №1, с. 141.
 - 16) С.А.Савчук, Е.А.Симонов, В.И.Сорокин, О.Б.Дорогокупец, А.Н.Веденин. Применение метода фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом и хроматографическом определении наркотических средств Журнал Аналитической Химии, 2004, Т.59, №10, с.1059-1069.
 - 17) Andrej Grigoryev, Sergey Savchuk, Aleksandra Melnik, Natal'ja Moskaleva, Jurij Dzhurko, Mihail Ershov, Aleksandr Nosyrev, Aleksandr Vedenin, Boris Izotov, Irina Zabirowa, Vladimir Rozhanets. Chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. Journal of Chromatography B, 879 (2011) 1126–1136