

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**

| | |
|--|-----------------|
| "Қазақстан Республикасы Әділет Министірінің Сот сараптамалары орталығы" | |
| БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ | |
| ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № <u>6</u> | |
| « <u>28</u> » <u>қараша</u> <u>2024</u> ж. | хаттамасы |
| реттік номері № | <u>27.1(22)</u> |

МЕТОДИКА

**ТОКСИКО-АНАЛИТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЕЙ НА НАЛИЧИЕ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ХРОМАТО-МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРОМ AMAZON SPEED
(IT MS) ТИП ИОННАЯ ЛОВУШКА**

(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

| | |
|--|--|
| 1. Наименование методики | Методика токсико-аналитического скрининга биологических жидкостей на наличие психоактивных веществ с использованием системы хромато-масс-спектрометрии с масс-спектрометром amaZon speed (IT MS) тип ионная ловушка |
| 2. Шифр специальности методики | 27.1(22) |
| 3. Информация о разработчике методики | Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт химико-токсикологического исследования НПЦСЭ |
| 4. Сущность методики | Выделение и идентификация веществ из биологических жидкостей, с последующим проведением хромато-масс-спектрометрического исследования в режиме положительных и отрицательных ионов. Идентификационные аналитические параметры: время удержания, протонированные молекулярные ионы (m/z), спектр продукт-ионов второго порядка (MS2) - (продукт-) ионы второго порядка, при необходимости спектр продуктоионов третьего порядка (MS3) |
| 4.1. Объекты исследования | Не гидролизованные образцы: Кровь, плазма крови, сыворотка крови, моча, другие биологические жидкости. Допускается применение методики для анализа сточных вод (хозяйственно-бытовых) |
| 4.2. Методы исследования | Высокоэффективная масс-спектрометрии жидкостной хроматографии-электроспрея-ионизации-ионной ловушки. Сочетание масс-спектрометрии электроспрея-ионизации-ионной ловушки, жидкостной хроматографии с обращенной фазой градиентного элюирования и уникального программного обеспечения |
| 4.3. Краткое поэтапное описание методики | Методика анализа, включает следующие стадии: - Подготовка рабочих растворов - Подготовка аналитических проб - Системные тесты оборудования и контроль качества |

| | |
|---|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> - Проведение от двух до четырех этапов аналитического процесса. - Оценка результатов на каждом этапе анализа. <p>Краткое описание получения данных о диапазоне концентраций (субтерапевтическая, терапевтическая, токсическая)</p> |
| 5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК | Протокол № 6 от 28.11.2024г. |
| 6. Информация о составителях паспорта методики | Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт химико-токсикологического исследования НПЦСЭ |

Содержание

| | | |
|-----|---|----|
| | Введение | 5 |
| 1. | Область применения | 6 |
| 2. | Сущность методики | 6 |
| 3. | Нормативные ссылки | 8 |
| 4. | Используемые сокращения, термины и определения | 8 |
| 5. | Рекомендации по отбору образца крови и хранения объектов исследования | 9 |
| 6. | Техническое обеспечение методики | 10 |
| 7. | Реактивы и стандартные образцы | 12 |
| 8. | Расходные материалы | 13 |
| 9. | Оптимальные условия выполнения измерений | 14 |
| 10. | Подготовка к выполнению измерений | 14 |
| 11. | Проведение аналитического исследования | 16 |
| 12. | Рекомендации по проведению полуколичественного анализа | 24 |
| | Заключение | 26 |
| | Рекомендуемый источник токсикологических данных | 26 |
| | Список использованной литературы | 26 |

Введение

Актуальность разработки методики судебно-экспертного исследования: Установление наличия и уровня большого перечня токсических и (или) контролируемых веществ и препаратов в биологических объектах человека является основной задачей химико-токсикологического экспертного исследования.

Совершенствование химико-токсикологического исследования биологических образцов направленного на обнаружение психоактивных веществ (далее – ПАВ), их аналогов и метаболитов является наиболее актуальной задачей в судебно-медицинской экспертной практике республики.

Современное состояние решаемой научной проблемы: Для выявления новых психоактивных веществ (далее НПВ), их аналогов и метаболитов требуется внедрения современных аналитических методов, как для диагностики отравлений и установления обстоятельств смерти при производстве судебно-медицинских экспертиз трупов, так и решения вопросов, о наличии психоактивных веществ в биологических образцах живых лиц. Актуален вопрос сокращения сроков проведения химико-токсикологических исследований.

Практическая значимость темы исследования: Предложенный методологический подход позволит провести доказательное исследование на более тысячи наименований соединений, в том числе НПВ, их аналогов и метаболитов, а также лекарственных веществ. Методы относятся к категории «А», и в соответствие требований, установленных правилами по производству судебных химико-токсикологических экспертиз (исследований)) в республике Казахстан, действующих в настоящий период, являются достаточно доказательными по структурной информативности.

Внедрение данной методики значительно снижает временные затраты на проведение экспертных исследований на соответствующие группы веществ.

Цель работы: Внедрение методики химико-токсикологического исследования малых объёмов (массы) биологического образца на наличие психоактивных и лекарственных веществ, совершенствование лабораторной диагностики отравлений и обстоятельств смерти при производстве судебно-медицинских экспертиз трупов.

Решаемые экспертные задачи: Диагностика отравлений и установление обстоятельств смерти при производстве судебно-медицинских экспертиз трупов; решение вопросов, о наличии психоактивных и сильнодействующих лекарственных веществ в биологических образцах живых лиц, медицинского освидетельствования и (или) химико-токсикологического контроля и мониторинга.

1. Область применения

Судебно-медицинская и судебная химико-токсикологическая экспертиза, химико-токсикологические исследования в клинической диагностике.

Чувствительность методики (для описанных процедур подготовки образца) в режиме полного сканирования продукт-ионов 5 нг/мл.

Целевые компоненты: полярные и неполярные кислотные, основные и нейтральные соединения, в том числе ПАВ, их аналогов и метаболитов.

Примечание: воспроизводимость результатов, пригодность описанных критериев их оценки, обеспечивается при использовании основного аналитического оборудования и в условиях, описанных в данной методике. Любые изменения системных настроек влияют на хроматографическое разделение и фрагментацию ионов, следовательно, на идентификационные параметры соединения.

2. Сущность методики

Анализ основан на сочетании двух аналитических методов: сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием в режиме положительных и отрицательных ионов.

Вещества, разделенные на хроматографической колонке, ионизируются электрораспылением с образованием протонированных молекулярных ионов, полученные ионы запираются и возбуждаются в ионной ловушке электрическим полем с определенными характеристиками и образуют фрагментные (продукт-) ионы второго и третьего порядка. Чувствительность анализа повышается путем увеличения селективности для представляющих интерес соединений, происходит более продуктивный сбор данных.

Для идентификации целевых веществ оцениваются показатели четырех аналитических параметров, соответствующие определяемым веществам. Происходит сопоставление полученных данных с записями в библиотеке идентификационных аналитических показателей: отношений массы к заряду (m/z), время удержания (RT), спектральный состав. Для большинства соединений характерный спектр MS^2 , полученный после фрагментации, дает совпадение, достаточное для достоверной идентификации. Для соединений, имеющих всего один диагностический фрагмент, идентификация проводится по спектру MS^3 . Для малоинтенсивных или плохо ионизируемых соединений с неспецифичным спектром MS^2 , которые не образуют спектр MS^3 , достаточный для надежной идентификации, результаты сопоставляются в режиме ручной проверки по алгоритмам работы ПО (визуальной оценки спектров). Идентификация по спектру MS^3 подтверждается по результатам представления числовой информации в удобном для зрительного наблюдения и оценки.

Аналитический процесс состоит из четырех этапов. В зависимости от вида образца, результат каждого очередного этапа может быть достаточным для обоснованности выводов экспертного заключения, «обнаружено», либо «не обнаружено» целевых соединений в объекте экспертизы (исследования).

Первый этап исследования – токсикологический скрининг. Метод включает упрощенную процедуру подготовки аналитических проб и их исследование. Для подготовки анализируемой пробы, используется процесс осаждение белков - процедура очистки пробы, когда необходимо удалить только белки и экстрагировать

основные метаболиты, глюкурониды. Целевые компоненты: полярные и неполярные кислотные, основные и нейтральные соединения. Результат первого этапа дифференцируется на следующие оценочные определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено», «Предварительная идентификация»

Второй этап - селективный метод исследования соединения, только из числа контролируемых и (или) запрещенных психоактивных веществ. Второй этап проводится в обязательном порядке аналитических проб из крови (сыворотки, плазмы крови). Аналитические пробы, подготовленные из других образцов, исследуются в условиях второго этапа, в случае получения результатов первого этапа соответствующих критериям «Предварительной идентификации».

Результат второго этапа дифференцируется на следующие оценочные определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено», «Предварительная идентификация»

Третий этап исследования. На данном этапе проводится более эффективная процедура подготовки образцов, метод твердофазной экстракции, с целью увеличения концентрации целевых соединений и удаления «эффекта матрицы» в аналитической пробе. Жидкость-жидкостной экстракция предложена в качестве альтернативного способа. Применение ТФЭ позволяет получить более чистые экстракты, чем применение ЖЖЭ, при значительной степени концентрирования целевых аналитов и, следовательно, повышать достоверность их обнаружения. Основной целью данного этапа является обеспечение достаточной эффективности выделения, концентрирования и обнаружения соединений, обладающих высокой токсичностью, минимальные эффективные концентрации которых составляют менее 0,05 мг/л (например: фентанил, суфентанил, ЛСД, кокаин, и др.) *Рекомендуемый источник токсикологических данных (п.13).*

Образцы сыворотки или плазмы крови (сыворотки, плазмы крови), в обязательном порядке подвергаются исследованию в условиях третьего этапа. Исследование образцов мочи рекомендуется продолжить при получении отрицательных результатах исследований в условиях первого и второго этапов, при направленном анализе на вещество из числа целевых соединений.

Результат третьего этапа дифференцируется на следующие оценочные определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено»

Четвертый этап исследования. На данном этапе проводится специальная процедура подготовки образцов для выделения Δ^9 - тетрагидроканнабинола, его основных метаболитов, и (или) удаления эффекта матрицы. Целевые компоненты: Δ^9 -тетрагидроканнабинол и его основные метаболиты 11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол и 11 – нор- 9-карбокси- Δ^9 - тетрагидроканнабинол.

Образцы крови (сыворотки, плазмы крови) в обязательном порядке подвергаются исследованию в условиях четвертого этапа. Исследование образцов мочи рекомендуется продолжить при наличии объективных данных о возможном употреблении наркотических средств марихуаны, при отрицательном результате на данную группу веществ первого и второго этапа исследования.

Результат четвертого этапа дифференцируется на следующие оценочные определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено»

3. Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие стандарты.

4.1. ISO 17034:2016 Первое издание 2016-11-01 Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов. *General requirements for the competence of reference material producers*

4.2. Приказ Министра юстиции Республики Казахстан № 484 «Об утверждении Правил организации и производства судебных экспертиз и исследований в органах судебной экспертизы» от 27 апреля 2017 года

4.2. Национальный стандарт Республики Казахстан 01.040.01 СТ РК 3805-2022 «Судебное химико-токсикологическое исследование. Термины и определения»

4.3. Стандартные операционные процедуры «Общие требования по производству судебных химико-токсикологических экспертиз(исследований)», 2016 год.

4. Используемые сокращения, термины и определения

ЖЖЭ (*LLE- Liquid-liquid extraction*) – жидкость-жидкостная экстракция

ТФЭ (*SPE - Solid-phase extraction*) – твердофазная экстракция

СВЭЖХ(*UHPLC -ultra-high performance liquid chromatography*)-
сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ (*HPLC - high performance liquid chromatography*)- высокоэффективная жидкостная хроматография.

ГХ – МС (*Gas chromatography-mass spectrometry*) – газовая хроматография с масс-спектрометрией

RT (*Retention Time*) - время удерживания

ISTD (*Internal Standard*) - внутренний стандарт

ESI (*Electrospray ionization*) - ионизация электрораспылением

EIC (*Extracted Ion Current*) - экстрагированный ионный ток

MSn - многоступенчатая масс-спектрометрия

MS2 - продукт - ионы второго порядка

MS3 – продукт - ионы третьего порядка

m/z - отношение массы к заряду

DOA (*drugs of abuse*) - наркотики, вызывающие злоупотребление

ОСЧ (*Особо чистый*) - квалификация установлена для веществ высокой чистоты

ХЧ (*Химически чистый*) - высшая степень чистоты реактива. Содержание основного компонента более 99 %.

PTFE (*Polytetrafluoroethylene*) - политетрафторэтилен

pH среды - показатель, который отражает концентрацию ионов водорода, кислотность жидких сред.

НПВС - нестероидные противовоспалительные препараты

Анализируемая проба - готовая к анализу форма образца, которая сохраняет определяемые показатели основного объекта

Аналитический сигнал - отклик искомого компонента на определенное воздействие

Аналитические условия - параметры проведения метода исследования, влияющие на аналитические показатели (аналитический сигнал) конечного результата используемой методики и (или метода) исследования

Время удерживания - идентификационный аналитический сигнал, показатель времени, измеряемый при проведении хроматографических методов (газовой и (или) жидкостной) в химико-токсикологическом анализе.

Глюкуронид - соединение образующиеся в организме человека после попадания токсиканта в кровоток в результате его взаимодействия с глюкуроновой кислоты, содержащейся в организме

Жидкостная хроматография - хроматографический процесс, в котором подвижной фазой является жидкость

Подвижная фаза (элюент) – растворитель (смесь растворителей), пропущенный через колонку

Элюирование – пропускание элюента через хроматографическую колонку.

Элюат – фильтрат, вытекающий из хроматографической колонки

Масс-спектр - совокупность данных об образующихся при определенных условиях ионизации, в результате распада конкретного вещества, ионах и их интенсивности. Графическая запись зависимости ионного тока от соотношения m/z , в виде набора пиков

Mass Range Mode - режим массового сканирования

Эффект матрицы - это искажение результатов измерения тех или иных физических свойств, используемых для качественного или количественного анализа на определенный компонент, под влиянием ряда других компонентов (мешающих веществ), присутствующих в анализируемой пробе

Избирательность (селективность) метода - возможность метода достоверно определять одно вещество (соединение, ион) в присутствии других сопутствующих веществ (соединений, ионов)

Ион - атом или группа атомов, которые за счет потери или приобретения одного, или более электронов приобрели электрический заряд

Нестероидные противовоспалительные препараты - широкая группа лекарственных веществ, действующих как противовоспалительные, обезболивающие и жаропонижающие средства, наиболее часто используемые в фармакотерапии боли. Кроме того, они входят в состав многих препаратов от гриппа и простуды (например, метамизол, аспирин и ибупрофен и т.п.)

Направленный анализ - химико-токсикологическое исследование с использованием специальных («частных») аналитических методов для выделения, обнаружения и определения количества токсических веществ, указанных в постановлении о назначении экспертизы или в направлении на химико-токсикологическое исследование.

5. Рекомендации по отбору образца крови и хранению объектов

Отбор проб крови осуществляют в вакуумные пробирки (вакутейнер-одноразовое приспособление, предназначенное для забора проб венозной крови) или медицинский шприц (*при дезинфицировании кожи следует избегать использования этанола и других средств с летучей фракцией*).

На анализ рекомендуется направлять как минимум два образца по 5 мл, при этом один образец используется для идентификации, а второй может быть использован в качестве доказательного образца.

Материалы сразу же после забора помещают в холодильник ($t = 2-8^{\circ}\text{C}$). Если образцы не были подвержены анализу в течение 24 часов, разрешено их хранение в морозильной камере (при $t = -18^{\circ}\text{C}$), для образцов крови после предварительного отделения плазмы. Оставшиеся образцы рекомендовано хранить в морозильной камере для возможных дальнейших анализов.

Методика обеспечивает наиболее достоверный результат по факту употребления ПАВ при условии сбора образца крови в течение 24-х часов после предполагаемого употребления наркотических веществ, в моче в течение 36 часов.

6. Техническое обеспечение методики

6.1 Основные средства измерений

6.1.1 Высокочувствительный масс-спектрометр с ионной ловушкой amaZon speed (IT MS) на основе технологии двойных ионных воронок с возможностью быстрого переключения полярности при скорости сбора данных в 20 Гц для работы со сверхбыстрой ВЭЖХ. Система должна включать: ионный источник электрораспыления с термофокусировкой, систему управления и обработки данных, программный пакет для управления масс-спектрометром и системой ВЭЖХ для регистрации и обработки данных.

6.1.2 Бинарная СВЭЖХ система со сверхмалым мертвым объемом и поддержкой давлений до 1300 бар. Система должна обеспечивать формирование градиента на стороне высокого давления, обладать функцией автоматической компенсации сжимаемости подвижной фазы, оснащается смесителем объемом 35 мкл и системой автоматического заполнения и прокачки линий с помощью встроенного насоса. Должна включать поддон для растворителей, бинарный градиентный насос высокого давления с селектором растворителей и встроенным дегазатором, термостатированный автосамлер с возможностью охлаждения и нагрева для виал (или луночных планшетов) и стандартный термостат колонок. Стандартный термостат колонок для жидкостного хроматографа с возможностью нагрева до 90°C с шагом в 1°C .

6.1.3 Дополнительная сливная система для высоких потоков в источниках ионизации. Система должна обеспечивать скорость потока подвижной фазы в диапазоне 1-5000 мкл/мин.

6.1.4 Хроматографическая колонка (Column): Acclaim® RSLC 120 C18 2.2 μm , 120A 2.1 x 100 mm (Dionex) и предколонка VanGuard;

6.1.5 Хроматографическая колонка Kinetex - C18, 100 x 2.1мм, 2.6 мкм (рекомендована для скрининга на синтетические каннабиноиды)

6.1.6 Лабораторный генератор азота со встроенными компрессорами (Производительность 24 л/мин, чистота азота 99,5%.)

6.2 Программное обеспечение (ПО)

- Compass 3.1 for amaZon
- trapControl 8.0 SR 2
- DataAnalysis 5.2
- Library Server 5.2
- HyStar 5.0 SR1
- Toxtyper™ Library Version 3.0
- Bruker Elute PlugIn 1.1

**могут быть использованы перечисленные ПО в более новых версиях*

6.3. Библиотеки данных идентификационных аналитических параметров

Библиотеки данных идентификационных аналитических параметров, созданные с помощью СВЭЖХ (ВЭЖХ)-МС/МС типа «ионная ловушка». Библиотека должна содержать следующие аналитические параметры времени удерживания, МС, МС² и МС³ спектры для психоактивных, наркотических и лекарственных соединений и их метаболитов.

Библиотеки Toxtyper 3.0 — это основанный на клиническом исследовательском инструменте ВЭЖХ-ESI-MSn для качественного анализа токсичных соединений, наркотиков (DOA) в биологических образцах, таких как сыворотка, плазма или моча.

6.3.1 Библиотека Toxtyper 3.0. Библиотека содержит 1188 соединений: 1135 соединений и соответствующих метаболитов. 53 соединения, меченные стабильными изотопами, обычно используемые в качестве внутренних стандартов.

6.3.2 Библиотека DOA (drugs of abuse). Библиотека содержит информацию о спектре избранных наркотических и других веществ, вызывающие злоупотребление, обычно выявляемые в случаях их незаконного употребления. 86 соединений и соответствующих метаболитов.

6.3.3 Библиотека «SynthCann». Библиотека, расширяющая возможности по идентификации синтетических каннабиноидов по времени удерживания, МС, МС² и МС³ спектрам: Библиотека содержит данные 158 соединений (145 синтетических каннабиноидов). Пределы обнаружения менее 1 нг/мл и 13 внутренних стандартов.

6.3.4 Библиотека «Psychotropic». Библиотека, расширяющая возможности по идентификации психоактивных соединений по времени удерживания, МС, МС² и МС³ спектрам. Библиотека содержит данные 113 соединений и может быть расширена пользователем. Библиотека метаболитов на 7000 соединений.

6.3.5 Рекомендованная расширенная библиотека токсических веществ.

Maurer/Wissenbach/Weber LC-MSn Library of Drugs, Poisons, and Their Metabolites, 2nd Edition. Armin A. Weber, Hans H. Maurer, Dirk K. Wissenbach ISBN: 978-3-527-34649-3, July 2019. Второе издание библиотеки лекарственных средств, наркотических соединений, ядов и их метаболитов Maurer/Wissenbach/Weber LC-MSn предоставляет проверенный метод скрининга LCMSn на основе метаболитов и спектры MS2 и MS3 более чем 2270 исходных соединений и более 3600 их метаболитов.

6.4 Дополнительное лабораторное оборудование, лабораторная посуда и материалы

6.4.1 Система для очистки воды методом обратного осмоса и деионизации, включая емкость для хранения деионизованной воды.

6.4.2 pH – метр (рабочий диапазон pH: 0 – 14 Разрешение: 0,1pH)

6.4.3 Устройство для фильтрования растворов, включая: стеклянный держатель фильтров диаметром 47 мм, приемная колба (колба Бунзена), соединительные шланги, мембранный насос.

6.4.4 Вакуумный коллектор (манифолд SPE) для ТФЭ - на 12 или 24 гнезда

6.4.5 Ручные дозаторы с переменным объемом дозирования: до 10 мкл, до 50 мкл, 100 мкл, до 200 мкл, до 1000 мкл, до 10000 мкл.

6.4.6 Лабораторный азотный испаритель концентратор для проб

6.4.7 Ванна лабораторная с ультразвуковым источником излучения.

6.4.8 Вортекс-миксер с адаптерами (регулируемая скорость 0-3000 об/мин).

6.4.9 Шейкер лабораторный возвратно-поступательный. Диапазон скорости, 100 – 350 об/мин

6.4.10 Микроцентрифуга, макс. Максимальная скорость 14500 об/мин

6.4.11 Центрифуга лабораторная с ротором (4000 об/мин, для пробирок на 15 мл)

6.4.12 Весы аналитические 220 гр/0.0001 г внутр.калибровка

6.4.13 Азотный испаритель сухого типа

6.4.14 Вials объемом 1,5 либо 2 мл вials для автосамплера ВЭЖХ, микровials/вставки (стеклянные)

6.4.15 Крышки для вials с центральным отверстием

6.4.16 Пробирка коническая центрифужная с винтовой крышкой, объемом 10 мл

6.4.17 Микропробирка на 1,5 мл

6.4.18 Шпатель-ложечка

6.4.19 Штатив для пробирок.

6.4.20 Устройство для укупоривания вials (кримпер), при необходимости.

6.4.21 Колбы мерные, 5 мл, 10 мл 25 мл. 50 мл, 100 мл.

6.4.22 Химические стаканы, 50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл.

6.4.23 Стеклянные пробирки, 10 мл.

6.4.24 Мерные цилиндры, 10 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл.

6.4.25 Банки прозрачные для растворов, 100 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл.

6.4.26 Воронки диаметром 3 см, 6 см.

6.4.27 Одноразовые средства индивидуальной защиты, включая халаты, шапочки, перчатки, маски, очки

7. Реактивы и стандартные образцы

Требования к реактивам: Химические реактивы классификацией «LC-MS grade» или максимально возможной чистоты (LC-MS, HPLC, GH – MS, LC, ОСЧ и ХЧ).

7.1 Вода (только класса LC-MS)

7.2 Ацетонитрил «только класса LC-MS grade»

7.3 Концентрированная муравьиная кислота (~98%)

7.4 Формиат аммония (твердый) (всегда использовать класса LC-MS) $\geq 99,0\%$

7.5 Натрия хлорид

7.6 Натрия гидрокарбонат (при необходимости)

7.7 Дихлорметан (при необходимости)

7.8 1-хлорбутил (~99,5%)

7.9 Этилацетат

7.10 Хлороформ

7.11 Ацетон

7.12 Метиловый спирт

7.13 Изопропиловый спирт (использовать класса HPLC, LC)

7.14 Изоамиловый спирт

7.15 Концентрированный раствор гидроксида аммония (~27%)

7.16 Концентрированная (дымящая) соляная кислота (~36%)

7.17 Концентрированная (ледяная) уксусная кислота (~36%)

7.18 Гелий газообразный марка 5,5

7.19 Азот газообразный (содержание кислорода не должно превышать 0.001%).

7.20 Тестовый образец: Toxtyper QC (SST BDAL Mix, № 8705123). *Этот образец содержит 6 соединений из разных классов лекарств. Пять соединений, а именно парацетамол, мirtазепин, рисперидон, D4- галоперидол и деалкилфлуразепам, ионизируются в режиме положительных ионов, тогда как гидрохлоротиазид обнаруживается в режиме отрицательных ионов.*

7.21 Сертифицированные стандартные образцы целевых веществ (при необходимости) ISO 17034:2016

Рекомендуется использование сертифицированных изотопномеченных внутренних стандартов для контроля процедуры подготовки проб и анализа образцов. В качестве исходных растворов рекомендуется использовать стандартные образцы в концентрациях 1 мг/мл в метаноле.

Использованные при разработке и апробации методики: D-5 Diazepam, Reserpine.

Другие рекомендованные виды изотопномеченных внутренних стандартов: кломипрамина-D3, доксепина-D3 или галоперидола-D4.

Рекомендуется использовать в качестве исходных, растворы в концентрациях 1 мг/мл в метаноле.

8. Расходные материалы

8.1 Концентрирующие патроны для ТФЭ Poly-Sery HLB Pro 30 mg 3 ml

8.2 Концентрирующие патроны для ТФЭ Poly-Sery HLB Pro 60 mg 3 ml

8.3 Концентрирующие патроны для ТФЭ Poly-Sery HLB Pro 200 mg 6 ml

8.3 Концентрирующие патроны для ТФЭ Poly-Sery HLB Pro 500 mg 10 ml

8.5 Концентрирующие патроны для ТФЭ Clean-UP Hydrophobic Endcapped C8 3 ml 200mg

8.7 Концентрирующие патроны для ТФЭ PLEXA PCX 3CC, 60 mg

8.8 Микроцентрифужная пробирка, РР, 1,5 мл

8.9 Наконечники для дозаторов 0,1-10 мкл; 2-200 мкл, 100-1000мкл

8.10 Наконечники 0,1-10 мкл с фильтром, в штативах, стерильные

8.11 Наконечники 2-200 мкл с фильтром, в штативах, стерильные

8.12 Наконечники 100-1000мкл с фильтром, в штативах, стерильные

8.13 Пробирки центрифужные 15 мл, 50 мл, конические, стерильные

8.14 Септы для виал (силикон/PTFE)

Модификации и объёмы концентрирующих патронов подбираются в зависимости от объёма аликвоты объекта исследования. Объём колонки определяется как наибольший объём пробы или растворителя, который может вместить картридж для ТФЭ. Масса сорбента определяется исходя из максимального количества анализируемого вещества, которое может быть удержано сорбентом.

При выборе патронов для ТФЭ, необходимо обращать внимание на качество сорбентов, использованных в их производстве (у разных производителей может отличаться). Не исключается «смыв» фазы, что может привести к загрязнению элюатов, и, как следствие, получению необъективных результатов исследования.

9. Оптимальные условия выполнения измерений

температура воздуха (20 — 28) °С;

относительная влажность воздуха не более 80% при 25 °С

напряжение в сети (220 ±22) В

10. Подготовка к выполнению измерений

Посуда, используемая для подготовки проб, реактивов и анализа, должна быть тщательно вымыта и защищена от загрязнений при хранении.

Их следует содержать в чистоте, исключив рост микроорганизмов.

Важно. Для мойки посуды нельзя использовать моющие средства и иные реагенты. Посуду нельзя использовать для других целей.

Приготовление растворов

10.1 Приготовление подвижных фаз

Важно! Использовать воду, растворители и реагенты класса MS или LC-MS в контейнерах в зависимости от потребления (ёмкости от 1 до 2,5 л для воды и растворителей, а также небольшие упаковки муравьиной кислоты и формиата аммония).

10.1.1 Приготовление основного раствора формиата аммония: 303 мг формиата аммония растворить в 1,2 мл воды.

10.1.2 Приготовление «Элюент А» (состав: 2 mM формиат аммония, 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты, 1% (об./об.) ацетонитрила в воде). К 988,5 мл воды

добавить 0,5 мл основного раствора формиата аммония, 1 мл муравьиной кислоты и 10 мл ацетонитрила.

10.1.3 Приготовление «Элюент В» (состав: 2 mM формиат аммония, 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты, 1% (об./об.) воды в ацетонитриле). К 989 мл ацетонитрила добавить 0,5 мл основного раствора формиата аммония, поместите ёмкость в ультразвуковую ванну до тех пор, пока формиат аммония не растворится полностью. Далее в ту же ёмкость добавить 1 мл муравьиной кислоты и 9,5 мл воды.

Важно: Рекомендуется готовить свежие элюенты раз в неделю, если они не используются.

Не допускается добавление свежих элюентов к ранее приготовленным. Перед повторным наполнением необходимо промыть ёмкости для подвижных фаз с растворителем (водой или ацетонитрилом).

Хранить и готовить растворы следует в химически стойких, герметичных емкостях, например, мерных колбах и цилиндрах класса «А».

10.2 Приготовление внутреннего стандарта D5-дiazепама в метаноле (10 мкг/мл. (0,01 г/л.)): Мерную колбу объемом 25 мл на 1/3 заполнить метиловым спиртом. Из ампулы, содержащей стандартный раствор 1мг/мл diaзепамa D-5 в метаноле пипеточным дозатором с переменным объемом на 1000 мкл отмерить 250 мкл раствора и перенести в мерную колбу, перемешать, объем довести метиловым спиртом до 25 мл.

Непосредственно перед использованием разбавить исходные растворы внутренних стандартов метанолом для экстракции проб. При необходимости подготовить смесь внутренних стандартов.

10.3 Порядок приготовления растворов для процессов подготовки проб.

10.3.1 0,2 М раствор хлористоводородной кислоты в метаноле: Медленно добавить 1,67 мл концентрированной хлористоводородной кислоты в градуированный мерный цилиндр 100 мл, содержащий 1,67 мл воды. После охлаждения полученной смеси, медленно, довести объём раствора до 100 мл метанолом.

10.3.2 5% раствор гидроксида аммония: Медленно добавить 5 мл концентрированного гидроксида аммония (не менее 27% аммиака) и 5 мл метанола в градуированный мерный цилиндр 100 мл, содержащий 90 мл воды.

10.3.3 2 % раствор муравьиной кислоты в метаноле: Медленно добавить 2 мл концентрированной муравьиной кислоты (не менее 98%) в градуированный мерный цилиндр 100 мл, содержащий 98 мл метанола.

10.3.4 0,25% раствор уксусной кислоты: Медленно добавить 15 мл концентрированной уксусной кислоты в градуированный мерный цилиндр 100 мл, содержащий 600 мл воды. После охлаждения полученной смеси, медленно, довести объём до 1000 мл водой.

10.4 Приготовление рабочего раствора образца контроля. Раствор готовится путём разбавления исходной смеси (п.8.19.) метиловым спиртом в соотношении 1:100. *Срок хранения разбавленного образца 3 месяца, при температуре 4°C.*

11. Проведение аналитического исследования

11.1 Первый этап исследования

Образцы исследования: сыворотка или плазма крови, моча, другие жидкости.

Целевые компоненты: полярные или неполярные кислотные, основные и нейтральные соединения.

11.1.1 Подготовка анализируемой пробы: процедура очистки проб (удаления белков) и экстрагирование глюкуронидов.

Проверить pH образца. При необходимости довести до pH 7-9.

100 мкл образца поместить в микропробирку на 1,5 мл, добавить 500 мкл охлажденного (до -18 °C и ниже) ацетонитрила. Тщательно перемешать на шейкере, в течение 10 сек. Поместить полученную смесь на 10 минут в морозильник (-18 °C и ниже). По истечении времени пробирку с образцом центрифугировать при 10 000 об/мин., 5-10 минут, до получения прозрачной надосадочной жидкости. Прозрачную надосадочную фазу перенести в микровиалу (либо во вставку для виал).

11.1.2 Для образца плазмы и (или) сыворотки крови допускается использование упрощённых способов подготовки пробы:

А) 1500 мкл образца крови центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин. 100 мкл плазмы или сыворотки крови поместить в виалу, добавить 400 мкл подвижной фазы «Элюент А» (из п.), перемешать на шейкере в течение 10 сек. Готовая аналитическая проба исследуется*.

Б) в микропробирку (типа Эппендорф) поместить 600 мкл образца крови добавить 0,1 грамм натрия хлорида и 600 мкл ацетонитрила. Полученную смесь тщательно перемешать, используя шейкер-вортекс, в течение 10 сек. Далее полученную смесь центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин. 500 мкл верхнего надосадочного слоя поместить в виалу. Готовая аналитическая проба исследуется*.

11.2.3 Для образца мочи допускается использование упрощённой методики подготовки пробы: 1000 мкл мочи центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин. 100 мкл образца поместить в виалу, добавить 400 мкл подвижной фазы «Элюент А» (из п. 11.1.2.), перемешать на шейкере в течение 10 сек. Готовая аналитическая проба исследуется*.

* При проведении упрощённых способов подготовки анализируемых проб необходимо учитывать влияние «эффектов матрицы». Необходимо проводить исследование контрольной пробы, содержащей известное количество не менее одного из целевых соединений.

11.1.2 Проведение измерения (аналитического исследования) масс-спектрометрическим методом с хроматографическим разделением.

11.1.2.1 Условия хроматографирования: Хроматографическая колонка Asclaim TM RSLC 120 C18 2.2 µl 120A (Thermo scientific) с защитной колонкой. Температура термостата колонки 40(°C). Хроматографическое разделение 11 минутном градиентом режиме подвижной фазы.

| Время начала (мин) | Скорость увеличения потока (мл/мин) | % фаза А | % фаза В |
|------------------------------|---|----------|----------|
| 0,00 | 0,500 | 99 | 1 |
| 1,00 | 0,500 | 99 | 1 |
| 8,00 | 0,500 | 1 | 99 |
| 9,00 | 0,500 | 1 | 99 |
| 9,10 | 0,500 | 99 | 1 |
| 11,00 | 0,500 | 99 | 1 |

11.1.2.2 Условия масс-спектрального исследования:

Режим (Ion Source Type) – ESI.

Mass Range Mode - Ultra scan.

Диапазон масс от 70 до 800 m/z.

В режиме положительных и отрицательных ионов.

11.1.3 Измерение контрольной «холостой» пробы составом: Введите смесь вода/ацетонитрил (50:50), объём вводимой пробы 2 мкл. Условия описаны в п. 12.1.2.

Допустимый результат: Основными критериями оценки эффективности являются: а) отсутствие соединений из списка идентифицируемых веществ; б) должна быть видна ровная базовая линия (кроме пиков примесей использованных растворителей).

11.1.3 Измерение образца контроля качества. Введите разбавленный образец контроля качества, объём 2 мкл. Условия описаны в п. 11.1.2.

Допустимый результат: Должны быть обнаружены все соединения, входящие в состав образца контроля качества.

Интенсивность пяти соединений, идентифицированных в положительном режиме, должна находиться в диапазоне от 10^7 отсчетов до 10^8 отсчетов. Интенсивность гидрохлоротиазида, который обнаруживается в отрицательном режиме, должен составлять около 10^6 импульсов. Допустимое отклонение времен удерживания (ΔRT) <0,3 мин. Идеальная интенсивность сигнала находится в диапазоне от E^6 до E^8

Примечание: Могут наблюдаться ионы, помеченные как предварительно идентифицированные соединения, из-за масс-спектрометрического шума, с незначительными значениями показателя интенсивности и соотношением сигнал/шум. Если есть несколько дополнительных соединений с низким содержанием (от 10^5 до 10^6), которые помечены как ориентировочные, они считаются незначительными примесями из источника ESI, элюентов, колонки или системы ВЭЖХ и могут быть в значительной степени проигнорированы. Для данной методики сигнал менее 10^4 считается незначительным на уровне шума.

Если были обнаружены дополнительные соединения (не помеченные как предварительно идентифицированные, и их интенсивность значительна), возможно, они являются результатом загрязнения в связи с наличием остатков предыдущих проб (кросс-реакция). В этом случае необходимо выполнить очистку источника и инжектора, указанную в рекомендациях для работы с оборудованием. Затем необходимо выполнить еще одно измерение образца контроля качества. При необходимости заменить фильтр и предколонку (колонку).

Рекомендуется дополнительно проводить анализ образца контроля через каждые 20 анализов исследуемых образцов

11.1.4 Измерение анализируемой пробы. Условия описаны в п. 12.1.2.

Объем вводимой пробы: пробы, подготовленные из плазмы и сыворотки крови - 5 мкл.; из других жидкостей - 2 мкл.

11.1.5 Оценка результата

Результат первого этапа проведения исследования анализируемой пробы дифференцируется на следующие три оценочных определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено», «Предварительная идентификация»

11.1.5.1 Критерии для оценки «Идентификация достигнута»:

А) Характерный спектр MS^2 , полученный после фрагментации спектр уникален для одного соединения и дает полное совпадение с библиотекой данных, результат оценивается как «Высоконадежная идентификация».

Б) Спектр MS^2 неспецифичен, идентификация проведена по спектру MS^3 . Спектры MS^2 и MS^3 совпали, идентичность автоматически подтверждена программным обеспечением, показатель высокой чистоты ≥ 850 , результат оценивается как «Высоконадежная идентификация».

В) В спектре MS^2 получен всего один диагностический фрагмент (*единственный сигнал обусловлен при потере ионов воды ($\Delta m = -18$) или группы NH_3 (-17), либо при потере CO_2 (-44))*), при этом идентификация по спектру MS^3 проведена автоматически и подтверждена программным обеспечением (совпадения с библиотекой данных), показатель высокой чистоты ≥ 850 , результат оценивается как «Высоконадежная идентификация».

С) Получен неспецифичный спектр MS^2 и значение интенсивности сигнала спектр MS^3 низкое (менее 10^4), поэтому он не сравнивается с библиотечным. *Некоторые соединения имеют одинаковый ион-предшественник и одинаковый единственный фрагмент в MS^2 . Для правильной оценки имеются соответствующие критерии дифференциации по библиотеке спектра MS^3 , в этом случае результаты сопоставляются в режиме ручной проверки по алгоритмам работы ПО. Необходимо сравнить экспериментальный спектр MS^3 с соответствующим спектром библиотеки в режиме ручной проверки (визуальной оценки спектров).* Идентификация по спектру MS^3 должна быть подтверждена по результатам представления числовой информации в удобном для зрительного наблюдения и анализа.

При условии полного соответствия одному из перечисленных критериев, указанных в п. 11.1.5.1, даётся заключение об обнаружении соответствующего (их) соединений в образце.

Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.

11.1.5.2 Критерии для оценки «Целевых соединений в образце не обнаружено». На данном этапе применяется только для образцов мочи, смывов с частей тела человека, промывных вод желудка, жидкого содержимого желудка.

А) По результатам автоматической обработки данных совпадений спектров МС² и МС³ не с одним из целевых соединений не установлено.

Б) По результатам автоматической обработки данных предлагаются наименования соединений с результатами аналитических показателей, имеющими отклонение по времени удерживания $\Delta RT \geq 0,3$ мин, отклонение массы $\Delta m/z \geq 0,25$ Да, показатель чистоты < 750 .

При условии полного соответствия одному из перечисленных критериев даётся заключение об не обнаружении соответствующих соединений в образцах, исключая кровь (сыворотка или плазма крови).

Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.

11.1.5.3 Критерии для оценки «Предварительная идентификация»

А) Результат измерений по значениям отклонений аналитических показателей составляет: по времени удерживания ($0,2 \text{ мин} \leq \Delta RT < 0,3 \text{ мин}$), показатель чистоты ≥ 750 и < 850 , значение сигнал/шум (S/N) < 5 .

Б) Спектр МС² неспецифичен, характерно для малоинтенсивных или плохо ионизируемых соединений, которые не образуют спектр МС³ достаточный для надежной идентификации и (или) значение интенсивности сигнала спектр МС³ низкое (менее 10^4) результаты являются предварительными.

По результатам первого этапа, указанным в п. 11.1.5.3 проводится второй этап исследования образца.

11.2 Второй этап исследования. Селективный метод исследования на основные виды целевых соединений.

Второй этап исследования проводится в обязательном порядке для образцов сыворотки или плазмы крови (сыворотки, плазмы крови), а также сточных вод.

Для других образцов, второй этап исследования проводится в случае получения результатов первого этапа, указанных в п. 11.1.5.3

Целевые компоненты: основные контролируемые и (или) запрещенные ПАВ

11.2.1 Проведение измерения (аналитического исследования) масс-спектрометрическим методом с хроматографическим разделением.

11.2.1.1 Хроматографическое разделение 19 минутном градиентом режиме подвижной фазы.

| Время начала (мин) | Скорость увеличения потока (мл/мин) | % фаза А | % фаза В |
|------------------------------|---|----------|----------|
| 0,00 | 0,500 | 99 | 1 |
| 1,00 | 0,500 | 99 | 1 |
| 4,00 | 0,500 | 79 | 21 |
| 8,00 | 0,500 | 71 | 29 |
| 13,00 | 0,500 | 36 | 64 |
| 15,00 | 0,500 | 1 | 99 |
| 17,00 | 0,500 | 1 | 99 |
| 17,10 | 0,500 | 1 | 99 |
| 19,00 | 0,500 | 99 | 1 |

11.2.1.2 Условия масс-спектрального исследования:

Режим (Ion Source Type) – ESI.

Mass Range Mode - Ultra scan.

Диапазон масс от 70 до 800 m/z.

В режиме положительных и отрицательных ионов.

Объем вводимой пробы: из плазмы и сыворотки крови 5 мкл.; из других жидкостей 2 мкл.

11.2.2 Оценка результата проводится по критериям, описанным в п. 11.1.5.

По результатам второго этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.1 даётся заключение об обнаружении соответствующего (их) соединений в образце.

По результатам второго этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.2 даётся заключение об не обнаружении соответствующих соединений в образцах, исключая кровь (сыворотка или плазма крови).

Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.

Исследование образцов крови (сыворотки или плазмы крови) необходимо продолжить.

Исследование образцов мочи рекомендуется продолжить при получении отрицательных результатах исследований в условиях первого и второго этапов, при направленном анализе на вещество из числа целевых соединений.

11.3 Третий этап исследования

Целевые компоненты: кислотные, основные и нейтральные соединения, исключая наркотический компонент марихуаны тетрагидроканнабинол и его метаболиты.

Важно: В целях исключения риска подавления малоинтенсивных сигналов и риска чрезмерного «загрязнения» ионной ловушки («эффекта памяти»), в случае если по результатам первого и (или) второго этапов исследования было установлено наличие каких-либо веществ с высокими значениями интенсивности сигнала ($ID \geq 10^9$), для продолжения исследования необходимо использовать методики подготовки аналитических проб, исключающих дальнейшее концентрирование обнаруженных веществ (увеличение их количества в единице объема аналитической пробы, наиболее часто встречаются высокие концентрации метадона и его метаболита EDDP, НПВС и т.п.), используя более селективные методы экстракции для других целевых веществ.

11.3.1 Подготовка аналитической пробы:

Стандартная операционная процедура подготовки аналитической пробы методом твердофазной экстракции с использованием патронов HLB 1 cc

11.3.1.1 Подготовка патрона ТФЭ.

Важно! Скорость потока через концентрирующий патрон на всех стадиях не должна превышать 1 мл/мин.

Не допускать высыхания сорбента между процессами проведения конденсирования и уравнивания патрона.

А) Конденсация патрона: Пропустить через патрон 1 мл метилового спирта.

Б) Уравнивание патрона: Пропустить через патрон 1 мл очищенной воды

В) Проведение процесса экстракции

Проверить pH образца (должно быть в диапазоне 7-9)

Перенести 500 мкл сыворотки или плазмы крови (либо мочи) в микропробирку на 1,5 мл

Добавить 500 мкл воды и 10 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 10 мкг/мл и тщательно перемешать, используя шейкер в течение не менее 5 сек. *В случае отсутствия образцов внутреннего стандарта эффективность процесса экстракции необходимо контролировать, проведением контрольного образца, пробы содержащей один либо несколько целевой(ых) компонент(ы), экстрагирующихся в тех же условиях.*

Полученную смесь пропустить через концентрирующий патрон. Далее промыть патрон 1 мл раствора 5% раствором гидроксида аммония в метаноле. Высушить концентрирующий патрон в течение 2 минут. Процесс элюирования с концентрирующего патрона провести путем двукратного пропускания по 750 мкл, содержащего 2% раствором муравьиной кислоты в метаноле. Пробу собрать в вialу содержащую 50 мкл 0,2 М раствора хлористоводородной кислоты.

Органический фазу пробы выпарить до полного его испарения, при температуре не более 40°C. Сухой остаток пробы в вialе перерастворить в 50 мкл смеси содержащей: 90 частей «Элюент А» (п.11.1.2.) и 10 частей «Элюент В» (п.11.1.3.).

Примечание: Если ожидаемые финальные концентрации определяемых веществ в

элюате из концентрирующего патрона достаточны для осуществления анализа, процесс выпаривания и пере растворения сухого остатка можно не проводить.

Полученную аналитическую пробу перемешать в течение 10 секунд на шейкере, поместить на 30 секунд в ультразвуковую ванну, затем центрифугировать в течение 5 минут при 3000 об/мин (жидкость должна быть прозрачной). Надосадочную жидкость перенести в микровиалу или вставку для дальнейшего аналитического исследования.

11.3.1.2 Стандартная операционная процедура подготовки аналитической пробы методом жидкость-жидкостной экстракции для выделения основных видов ПАВ. *Используется как альтернативная ТФЭ способу, либо в случаях, когда предварительно идентифицированное соединение не экстрагируются доступными видами концентрирующих патронов для ТФЭ.*

Проверить pH образца (должно быть в диапазоне 7-9)

1000 кл образца поместить в стеклянную пробирку на 10 мл с винтовой крышкой, добавить сухой гидрокарбонат натрия (на кончике шпателя) и 1000мкл воды. При необходимости добавить 10 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 10мкг/мл. Полученную пробу перемешать. *В случае отсутствия образцов внутреннего стандарта эффективность процесса экстракции можно контролировать, проведением контрольного образца, пробы содержащей один либо несколько целевой(ых) компонент(ы), экстрагирующихся в тех же условиях.* Если использованная навеска гидрокарбоната натрия раствориться полностью добавить дополнительное количество гидрокарбоната натрия, до перенасыщения раствора (пока не перестанет растворяться). Далее, добавить в пробирку 3500 мкл экстрагирующей жидкости (1-хлорбутан, содержащий 1% (объемн) изоамилового спирта). Процесс экстрагирования провести в течение 10 минут при 20°C., рекомендуется использовать роторный миксер. Смесь центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 минут. Отделить органическую фазу и перенести в виалу содержащую 50 мкл 0,2М раствора хлористоводородной кислоты в метаноле.

Далее, к оставшейся в пробирке нижней водной фазе, добавить 1000 мкл этилацетата. Процесс экстрагирования провести в течение 10 минут при 20°C. Смесь центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 минут. Отделить органическую фазу и объединить с ранее полученной органической фазой. Объединенные органические фазы тщательно перемешать, используя шейкер, и выпарить до полного испарения, при температуре не более 60°C. Сухой остаток пробы в виале перерастворить в 50 мкл смеси содержащей: по 50 частей «Элюент А» (п.11.1.2.) и «Элюент В» (п.11.1.3.).

Полученную аналитическую пробу перемешать в течение 10 секунд на шейкере, поместить на 30 секунд в ультразвуковую ванну, затем центрифугировать в течение 5 минут при 3000 об/мин (жидкость должна быть прозрачной). Надосадочную жидкость перенести в микровиалу или вставку.

11.3.2 Аналитические пробы, полученные в п. 11.3.1.1 или п. 11.3.1.2, анализировать в условиях, описанных в 11.2.1.

При необходимости поиска более расширенного круга веществ (например, лекарственные вещества) дополнительно провести аналитическое исследование в условиях, описанных в п. 11.1.2.

Объем вводимой пробы: из плазмы и сыворотки крови 5 мкл; из мочи 2 мкл.

11.3.3 Оценка результата проводится по критериям, описанным в п. 11.1.5.

11.3.3.1 По результатам третьего этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.1 даётся заключение об обнаружении соответствующего (их) соединений в образце.

11.3.3.2 По результатам третьего этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.2 даётся заключение об не обнаружении соответствующих соединений в образцах.

Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.

Образцы сыворотки или плазмы крови (сыворотки, плазмы крови) в обязательном порядке подвергаются исследованию в условиях четвертого этапа. Исследование образцов мочи рекомендуется продолжить при наличии объективных данных о возможном употреблении наркотических средств марихуаны, при отрицательном результате на данную группу веществ первого и второго этапа исследования.

11.4 Четвертый этап исследования.

Целевые компоненты: Δ^9 -тетрагидроканнабинол и его основные метаболиты 11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол и 11 – нор- 9-карбокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинол.

11.4.1 Подготовка аналитической пробы:

Стандартная операционная процедура подготовки аналитической пробы методом твердофазной экстракции с использованием концентрирующих патронов (Hydrophobic Endcapped C8, 3ml 200 mg).

Важно! Скорость потока через концентрирующий патрон на всех стадиях не должна превышать 1 мл/мин.

Не допускать высыхания сорбента между процессами проведения конденсирования и уравнивания патрона

11.4.1.1 Подготовка патрона ТФЭ.

Конденсация патрона: Двукратно пропустить через патрон по 3 мл метилового спирта.

Уравнивание патрона: Пропустить через патрон 3 мл очищенной воды

11.4.1.2 Проведение процесса экстракции. Проверить pH образца (должно быть в диапазоне 7-9)

Перенести 1000 мкл сыворотки или плазмы крови (мочи) в пробирку на 10 мл. Добавить 4000 мкл воды и 10 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 10мкг/мл и тщательно перемешать, используя шейкер в течение не менее 5 сек. В случае отсутствия образцов внутреннего стандарта из числа гидрофобных

соединений. Эффективность процесса экстракции можно также контролировать, проведением контрольного образца, пробы содержащей один либо несколько целевой(ых) компонент(ы), экстрагирующихся в тех же условиях. Полученную смесь центрифугировать при 1500 об/мин 5 минут.

Две аликвоты по 2 мл прозрачного супернатанта пропустить через концентрирующий патрон. Затем пропустить оставшуюся часть пробы.

Промыть концентрирующий патрон: последовательно пропустить через патрон 3 мл воды, 3 мл 0,25М раствор уксусной кислоты и вновь 3 мл воды.

Высушить патрон: собрать со стенок концентрирующего патрона оставшуюся жидкость, поместить патрон в 10 мл пробирку и центрифугировать в течение 10 минут при 1500 об/мин. Полное удаление оставшейся жидкости с патрона провести с использованием манифолда для ТФЭ под постоянным вакуумом, избыточным давлением (или в токе азота) в течение 5 минут.

Элюировать образец в чистую виалу объемом 10 мл, предварительно поместив в пробирку 50 мкл 0,2М раствора хлористоводородной кислоты в метаноле: пропустить через патрон, последовательно, 1500 мкл ацетона и 200 мкл дихлорметана (или ацетонитрила).

Органический фазу пробы выпарить до полного его испарения, при температуре не более 60°C. Сухой остаток пробы в виале перерастворить в 100 мкл смеси содержащей: по 50 частей (объемн.) «Элюент А» (п.10.1.2) и «Элюент В» (п.10.1.3).

Полученную аналитическую пробу перемешать в течение 10 секунд на шейкере, поместить на 30 секунд в ультразвуковую ванну, затем центрифугировать в течение 10 минут при 6000 об/мин (жидкость должна быть прозрачной).

Надосадочную жидкость перенести в микровиалу или вставку.

11.4.2 Аналитическую пробу анализировать в условиях, описанных в описанных в п.11.2.1.

Объем вводимой пробы: из плазмы и сыворотки крови, а также из образцов сточных вод 5 мкл; из мочи 2 мкл.

Результат четвертого этапа дифференцируется на следующие оценочные определения: «Идентификация достигнута», «Целевых соединений в образце не обнаружено»

11.3.3 Оценка результата проводится по критериям, описанным в п. 11.1.5.

11.3.3.1 По результатам четвертого этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.1 даётся заключение об обнаружении соответствующего (их) соединений в образце.

11.3.3.2 По результатам четвертого этапа, при условии полного соответствия одному из перечисленных критериев п. 11.1.5.2 даётся заключение об не обнаружении соответствующих соединений в образцах.

Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.

12. Рекомендации по проведению полуколичественного анализа

Проводится при необходимости и наличии соответствующих материально-технических ресурсов, указанных в п.б., в полном объеме.

Стандартный скрининг можно комбинировать с автоматическими результатами полуколичественного анализа в рамках одного анализа.

Цель: Получение данных о диапазонах концентраций (субтерапевтических, терапевтических или токсических)

Объекты исследования: образцы сыворотки и (или) плазмы крови.

Выбор диапазона калибровки

Идеальные интенсивности сигналов находятся в диапазоне от E^6 до E^8 (10^6 - 10^8). Для оценки линейного диапазона проводятся предварительные эксперименты.

Чтобы определить правильный диапазон калибровки, необходимо подготовить 5-7 растворов целевого соединения известных концентраций и растворов ISTD.

Для калибровки используется показатели интенсивности пиков, соответствующих ионных хроматограмм. ПО-автоматически создаст сглаженные ионный хроматограммы (EIC) целевых соединений и ISTD.

Для линейного диапазона калибровки интенсивности должны увеличиваться с постоянным коэффициентом с увеличением концентрации. Верхний предел калибровки достигается, когда увеличение концентрации больше не приводит к постоянно увеличивающимся интенсивностям. Нижний предел количественного определения достигается, когда уменьшение концентраций больше не приводит к постоянному уменьшению интенсивности.

Линейная калибровочная кривая определяется с помощью Excel или программного обеспечения для количественной оценки.

После проведения измерений, средняя концентрация для целевого соединения используется для одноточечной калибровки. Таким же образом, выбирается средняя концентрация для ISTD.

Проведение одноточечной калибровки.

Готовиться две пробы калибровочной смеси (включая ISTD) в выбранной концентрации и проводится одноточечная калибровка по алгоритму ПО.

Аналитическая проба готовится из образцов сыворотки и плазмы крови с обязательным включением внутренних стандартов. Аналитические пробы, подготовленные в п. 11.3.1.1, п. 11.3.1.2, п. 11.4.1.2 анализируются в условиях, описанных в 11.2.1.

Внутренний стандарт должен быть похож на калибруемое соединение как химически, так и по времени удерживания, но должен быть хроматографически различим. Стандарт пропорционально реагирует на изменения в анализируемом веществе и выдаёт аналогичный, но не идентичный измерительный сигнал. Также внутренний стандарт должен отсутствовать в матрице образца, чтобы гарантировать отсутствие другого источника внутреннего стандарта. Ионные хроматограммы (EIC) со значениями m/z целевого соединения и ISTD создаются, сглаживаются и интегрируются автоматически. Площади пиков используются для расчета калибровочной кривой (её тангенса угла наклона).

Рекомендуемые единицы измерения концентраций: нг/мл.

Объём вводимой пробы 2 или 5 мкл. Математическая обработка результатов проводится автоматически с помощью ПО.

Заключение

Методика, основанная на сочетании двух высокочувствительных аналитических методов, хроматографии и масс-спектрометрии, является наиболее селективными и специфичными по своей структурной информативности для исследования биологических объектов на наличие наркотических, сильнодействующих и психоактивных веществ, их аналогов и метаболитов.

Предложенный алгоритм, заключающийся в последовательном применении способов подготовки анализируемых проб, позволяет выявлять соединения новых видов синтетических наркотических средств.

Результаты каждого из этапов исследования являются достаточно объективными аналитическими данными для определения дальнейшего хода анализа, либо завершения экспертного исследования.

Алгоритм последовательного использования нескольких методов подготовки образцов и их дальнейшего исследования методом хромато-масс-спектрометрии позволяет получить объективные данные о наличии наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов, необходимых для диагностики наркотических состояний, острых и хронических интоксикаций.

Внедрение методики позволяет сократить сроки производства экспертиз и исследований, направленных для разрешения соответствующих вопросов, в рамках производства как судебных химико-токсикологических экспертиз, так и судебно-медицинских экспертиз трупов.

Рекомендуемый источник токсикологических данных

Референсные уровни терапевтических и токсических веществ в крови TIAFT. (TIAFT - международная ассоциация судебных токсикологов), сентябрь 2004 год

Список использованной литературы:

1. Веселовская, Н.В. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм / Н.В. Веселовская, А.Е. Коваленко, К.А. Галузин — М.: Нарконет, 2008.

При разработке настоящей методики использованы рекомендации от производителя аналитического оборудования.