

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 066-0618

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ
БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ИДЕНТИФИКАЦИИ И
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПСИХОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ,
ПОТЕНЦИРУЮЩИХ ИХ ДЕЙСТВИЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,

Учреждение здравоохранения «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

АВТОРЫ:

Чубуков А.М., д.м.н., профессор Камышников В.С.,

Юхнель О.М., к.м.н. Шилейко И.Д., Ананич М.В.,

Мастяйкина И.Л., Турцевич А.М., Сергеева Е.А.,

Василица Е.М., Соболенко В.М., Уголькова Е.Г., Чикунова Л.Г.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

22.06.2018

Регистрационный № 066-0618

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО
МАТЕРИАЛА, ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ,
ПОТЕНЦИРУЮЩИХ ИХ ДЕЙСТВИЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования», УЗ «Городской клинический наркологический
диспансер» г. Минска

АВТОРЫ: А. М. Чубуков, д-р мед. наук, проф. В. С. Камышников, О. М. Юхнель,
канд. мед. наук И. Д. Шилейко. М. В. Ананич, И. Л. Мастяйкина, А. М. Турцевич.
Е. А. Сергеева, Е. М. Василица, В. М. Соболенко, Е. Г. Уголькова, Л. Г. Чикунова

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению предложен комплексный метод выделения наркотических средств, психотропных и других одурманивающих веществ из биологического материала (крови, мочи, волос, ногтей), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику заболеваний и патологических состояний, вызванных воздействием психоактивных веществ (ПАВ) и лекарственных средств (ЛС), потенцирующих их действие.

Комплексный метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с заболеваниями, вызванными воздействием психоактивных веществ и лекарственных средств, потенцирующих их действие, в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод может быть использован на этапах диагностики и оказания медицинской помощи пациентам с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением опиоидов, каннабиноидов, стимуляторов ЦНС, галлюциногенов, кокаина, седативных и снотворных средств, а также одновременным употреблением нескольких наркотических средств и использованием других психоактивных веществ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Лабораторное оборудование, средства измерения и вспомогательные устройства.

- баня водяная электрическая;
- баня водяная с терморегулированием от +20 до +90 °С;
- вакуумный насос KNF 022AN/18 или аналогичный;
- весы лабораторные аналитические с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г;
- весы лабораторные с погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г;
- виалы № 24 с резьбой, 30 мл, прозрачного стекла с плоским дном;
- виалы с завинчивающимся колпачком на 2 мл;
- виалы с завинчивающимся колпачком на 1,1 мл с коническим дном;
- воронки конические, диаметром 5 см;
- вортекс;
- газовый хроматограф с детектором ионизации в пламени;
- газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 2–20 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 5–50 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 20–200 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 100–1000 мкл;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 0–2 мл;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 1–5 мл;
- жидкостный хроматограф с диодно-матричным детектором;

- жидкостный хроматограф с МС/МС-детектором;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 5–50 мл;
- крышки для виал № 24 с резьбой и силиконовой септой;
- колба коническая из термостойкого стекла объемом 1000 мл;
- колба мерная 2а-1000-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-100-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-50-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-25-2 по ГОСТ 1770-74;
- морозильник с возможностью создания температуры — 18 °С и ниже;
- пипетка градуированная 1-2-5-10 по ГОСТ 29227-91;
- пипетка пастеровская;
- пробирка мерная объемом 10 мл со шлифом и притертой пробкой;
- пробирка полипропиленовая с крышкой объемом 1,5 мл;
- пробирка 50 мл полипропиленовая коническая с делениями, винтовой крышкой, юбкой устойчивости;
- рН-метр лабораторный;
- секундомер по ГОСТ 5072-79;
- стаканы по ГОСТ 23932-90;
- установка для твердофазной экстракции (ТФЭ);
- флаконы экстракционные БСС 25 или объемом 30 мл;
- флаконы экстракционные объемом 12 мл;
- холодильник-морозильник по ГОСТ 16317-95;
- центрифуга лабораторная с бакет-ротором;
- центрифуга лабораторная высокоскоростная;
- цилиндр 1-100-2 по ГОСТ 1770-74;
- цилиндр 1-50-2 по ГОСТ 1770-74;
- цилиндр 1-10-2 по ГОСТ 1770-74;
- чашка для выпаривания, фарфоровая № 3;
- чашка концентрационная, стеклянная, объемом 10 мл;
- шейкер планетарный;
- шейкер-ротатор;
- шпатель по ГОСТ 9147-80;

Реактивы и материалы

- аммоний двууглекислый, х.ч.;
- аммиак водный, 25 %;
- аммоний сернокислый, х.ч.;
- ацетонитрил, х.ч.;
- бутанол-1, х.ч.;
- гексан, х.ч.;
- гептан, х.ч.;
- диметилсульфоксид безводный, х.ч.;
- диэтиловый эфир, х.ч.;
- изооктан, х.ч.;
- калий двухромовокислый, х.ч.;
- калий углекислый, х.ч.;

- калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч.;
- картриджи для ТФЭ на основе комбинированного состав — стирол/дивинилбензол, модифицированные группами C₈;
- колонки экстракционные Extrelute NT 3;
- кислота серная концентрированная, х.ч.;
- кислота соляная концентрированная, х.ч.;
- кислота трифторуксусная концентрированная, х.ч.;
- кислота уксусная, х.ч.;
- метил йодистый стабилизированный;
- метанол, х.ч.;
- 17-метилтестостерон 97,0–100 %;
- N-метил-бис-трифторацетамид, 98 %;
- N-метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамид, 97 %;
- метилен хлористый, х.ч.;
- натрия гидроокись, х.ч.;
- натрий двууглекислый, х.ч.;
- натрий сернокислый безводный, х.ч.;
- натрий углекислый, х.ч.;
- натрий уксуснокислый, х.ч.;
- натрий фосфорнокислый двухзамещенный, двухводный, х.ч.;
- натрия хлорид, х.ч.;
- нафтохинон-4-сульфат, х.ч.;
- пентафторпропионовый ангидрид, 99+ %;
- 2,2,3,3,3-пентафлюоропропанол (PFPOH);
- пиридин, х.ч.;
- пропанол-2, х.ч.;
- спирт этиловый ректифицированный зерновой для медицинских целей, 95–96 %;
- N-tert-бутилдиметилсилил-N-трифторацетамид, 98 %;
- тест-полоски на основе моноклональных антител;
- тетраметиламмония гидроокись, 25 %-й раствор в метаноле, х.ч.;
- толуол, х.ч.;
- триметилхлорсилан, 98+ %;
- трифторуксусный ангидрид, 99+ %;
- тетраметиламмония гидроксид 25 %-й раствор в метаноле;
- уксусный ангидрид безводный;
- углерод четыреххлористый;
- универсальная индикаторная бумажка, pH 1-14;
- фермент β-глюкуронидаза, 25 KU;
- фермент химотрипсин кристаллический;
- фильтры беззольные d = 9 см, «синяя лента»;
- хлороформ, х.ч.;
- этиловый эфир уксусной кислоты, х.ч.

Стандартные вещества

- барбитал (5,5-диэтилбарбитуровая кислота) >99 % CAS 57-44-3;

- диазепам >99 % CAS 439-14-5;
- диазепам D-5 >99 % CAS 65854-76-4;
- дифениламин >99 % CAS 122-39-4;
- 17 α -метилтестостерон >99 % CAS 58-18-4;
- этилморфин гидрохлорид >99 % CAS 76-58-4.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ И СТАНДАРТНЫХ РАСТВОРОВ

Приготовление 2 % (20 г/л) раствора аммиака

Мерным цилиндром отмеривают 8,82 мл 25 % раствора аммиака водного и доводят водой до 100 мл в мерной колбе.

Приготовление 10 % (100 г/л) раствора аммиака

Мерным цилиндром отмеривают 44 мл 25 % раствора аммиака водного и доводят водой до 100 мл в мерной колбе.

Приготовление 10 % (100 г/л) раствора аммония сернокислого

Взвешивают 10,0 г аммония сернокислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 0,1 М (моль/л) раствора аммония двууглекислого

Взвешивают 0,79 г аммония двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление раствора фермента β -глюкуронидазы

Градуированной пипеткой объемом 2 мл отмеривают 1,5 мл фосфатного буфера с pH 6,8 и добавляют во флакон с ферментом. Перемешивают до полного растворения. Раствор хранят в морозильном отсеке холодильника.

Приготовление 0,1 М (моль/л) раствора калия фосфорнокислого однозамещенного

Взвешивают 1,36 г калия фосфорнокислого однозамещенного, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление карбонатного буфера pH 10

Взвешивают 8,4 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом объеме воды в мерной колбе объемом 500 мл, взвешивают 10,6 г натрия углекислого, растворяют в той же колбе, перемешивают, объем доводят водой до метки, перемешивают, измеряют pH готового буферного раствора.

Приготовление 5 % (50 г/л) раствора натрия двууглекислого

Взвешивают 5,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 8 % (80 г/л) раствора натрия двууглекислого

Взвешивают 8,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл.

Приготовление 10 % (100 г/л) раствора натрия двууглекислого

Взвешивают 10,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 2 М (моль/л) раствора натрия гидроокиси

Взвешивают 8,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться, и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

Приготовление 5 М (моль/л) раствора натрия гидроокиси

Взвешивают 20,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться, и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

Приготовление 10 М (моль/л) раствора натрия гидроокиси

Взвешивают 40,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться, и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

Приготовление 25 % (250 г/л) раствора натрия гидроокиси

Взвешивают 25,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться, и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

Приготовление насыщенного раствора натрия углекислого

Взвешивают 20,0 г натрия углекислого и переносят в коническую колбу объемом 100 мл, прибавляют 50 мл горячей дистиллированной воды. Раствор переносят во флакон с притертой пробкой и оставляют при комнатной температуре до полного остывания. Избыток карбоната натрия выпадает в осадок.

Приготовление 10 % (100 г/л) раствора натрия углекислого

Взвешивают 10,0 г натрия углекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 0,5 % (5 г/л) раствора нафтохинон-4-сульфата

Взвешивают 0,5 г нафтохинон-4-сульфата, переносят в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 2 М (моль/л) раствора серной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на 1/3 заполняют дистиллированной водой. Мерным цилиндром отмеривают 10,7 мл концентрированной серной кислоты и переносят в колбу (вливают малыми порциями при помешивании), объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 0,2 % (2 г/л) раствора смеси ферментов β-глюкуронидазы и химотрипсина

Мерную пробирку со шлифом объемом 10 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют 0,1 М раствором аммония двууглекислого. Взвешивают 0,02 г кристаллического фермента химотрипсина и переносят в мерную пробирку со шлифом, перемешивают до полного растворения. Взвешивают 0,02 г фермента β-глюкуронидазы и переносят в ту же пробирку со шлифом, перемешивают до полного растворения. Объем доводят до 10 мл 0,1 М раствором аммония двууглекислого; перемешивают, раствор хранят в морозильном отсеке холодильника.

Приготовление 0,01 М (моль/л) раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Дозатором пипеточным с переменным объемом на 100 мкл отмеривают 85 мкл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 0,1 н раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Дозатором пипеточным с переменным объемом на 1000 мкл отмеривают 850 мкл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 0,2 н раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Пипеткой, градуированной на 2 мл, отмеривают 1,7 мл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 1 н раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Пипеткой, градуированной на 10 мл, отмеривают 8,5 мл концентрированной соляной кислоты, перемешивают, объем доводят водой до 100 мл.

Приготовление 2 н раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Мерным цилиндром отмеривают 17 мл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 3 н раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Мерным цилиндром отмеривают 25,5 мл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 10 % (100 г/л) раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Мерным цилиндром отмеривают 23 мл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление 2 М (моль/л) раствора соляной кислоты

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют дистиллированной водой. Мерным цилиндром отмеривают 17 мл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление раствора соляной кислоты в метаноле (9:1)

Мерную пробирку объемом 10 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. Дозатором пипеточным с переменным объемом на 1000 мкл отмеривают 1000 мкл концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную пробирку, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 10 мл.

Приготовление смесей:

- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (3:2)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (2:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (3:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1)
- изооктан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1)
- метанол – аммиак (98:2)
- метилен хлористый – гептан – пропанол-2 (7:2:1)
- метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (2:1:0,1)
- метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2)
- метилен хлористый – пропанол-2 – концентрированная соляная кислота (60:40:1)
- метилен хлористый – пропанол-2 (2:1)
- толуол – ацетонитрил (95:5)
- хлороформ – бутанол-1 (9:1)
- хлороформ – пропанол-2 (9:1)
- хлороформ – пропанол-2 (85:15)
- хлороформ – этиловый эфир уксусной кислоты (10:2)
- уксусный ангидрид – пиридин (3:2)
- этанол – хлороформ (1:1).

Для приготовления смесей органических растворителей используют мерные пробирки со шлифами и притертыми пробками объемом от 10 до 20 мл и мерные цилиндры со шлифами и притертыми пробками объемом от 10 до 100 мл. Последовательность отмеривания компонентов смесей регламентирована прописью. После добавления всех компонентов пробирку или цилиндр закрывают притертой пробкой и тщательно перемешивают. При образовании незначительных эмульсий раствор следует профильтровать через слой безводного сульфата натрия для удаления избытка воды.

Приготовление стандартных растворов:

- Приготовление стандартного раствора барбитала (5,5 диэтилбарбитуровой кислоты) в этаноле (0,2 г/л)

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют 96 %-м этиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,02 г барбитала и переносят в мерную

колбу, перемешивают до полного растворения, объем доводят этиловым спиртом до 100 мл.

- Приготовление стандартного раствора барбитала в метаноле (1,0 г/л)

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,1 г барбитала и переносят в мерную колбу, перемешивают до полного растворения, объем доводят метиловым спиртом до 100 мл.

- Приготовление стандартного раствора диазепама в метаноле (2,0 г/л)

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,2 г диазепама и переносят в мерную колбу, перемешивают до полного растворения, объем доводят метиловым спиртом до 100 мл.

- Приготовление внутреннего стандарта D5-диазепама в метаноле (0,01 г/л)

Мерную колбу объемом 25 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. Из ампулы, содержащей стандартный раствор 1 мг/мл диазепама в метаноле дозатором пипеточным с переменным объемом на 1000 мкл отмеривают 250 мкл раствора и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 25 мл.

- Приготовление стандартного раствора дифениламина в метаноле (0,04 г/л)

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,1 г дифениламина и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 100 мл (раствор А). Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. Пипеткой, градуированной на 5 мл, отмеривают 4 мл раствора А, переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 100 мл (раствор Б – 0,04 г/л).

- Приготовление стандартного раствора 17 α -метилтестостерона в этаноле (0,15 г/л)

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют 96 %-м этиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,015 г 17 α -метилтестостерона и переносят в мерную колбу, перемешивают до полного растворения, объем доводят этиловым спиртом до 100 мл.

- Приготовление стандартного раствора этилморфина гидрохлорида в метаноле (0,02 г/л)

Мерную колбу объемом 25 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. Из 5 ампул, содержащих стандарт этилморфина по 10 мг, переносят 50 мг химически чистого вещества, перемешивают до полного растворения, объем доводят метиловым спиртом до 25 мл.

Приготовление сухого карбонатного буфера (натрий углекислый – калий углекислый 2:1)

Взвешивают 10,0 г натрия углекислого и переносят в ступку, взвешивают 5,0 г калия углекислого и переносят в ступку. Смесь тщательно растирают и переносят во флакон темного стекла с притертой пробкой.

Приготовление 5 % (50 г/л) раствора триметилхлорсилана (TMCS) в толуоле

Мерную колбу объемом 100 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют толуолом. Градуированной пипеткой объемом 10 мл отмеривают 5,9 мл триметилхлорсилана и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят толуолом до метки.

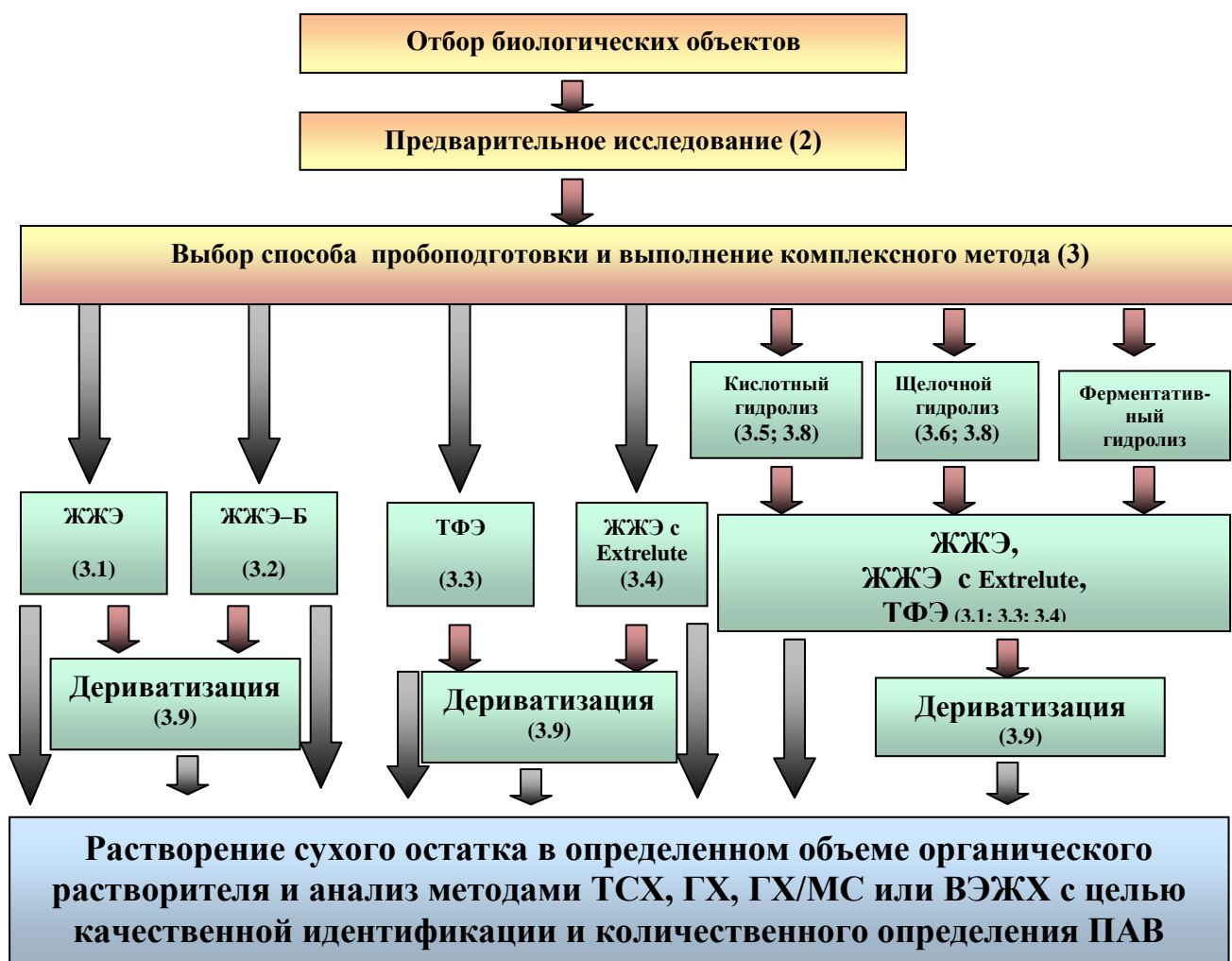
Приготовление раствора трифторуксусной кислоты в метаноле (9:1)

Мерную пробирку объемом 10 мл на $\frac{1}{3}$ заполняют метиловым спиртом. Дозатором пипеточным с переменным объемом на 1000 мкл отмеривают 1000 мкл концентрированной трифторуксусной кислоты и переносят в мерную пробирку, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 10 мл.

Приготовление «хромовой смеси»

Отвешивают 100,0 г калия двуххромовокислого и переносят в коническую колбу из термостойкого стекла объемом 2 л, добавляют 200 мл дистиллированной воды, перемешивают до растворения, затем небольшими порциями добавляют 1 л концентрированной серной кислоты при постоянном перемешивании, охлаждении. Готовый раствор помещают в емкость темного стекла с притертой пробкой.

Технология выполнения комплексного метода, изложенного в настоящей инструкции, состоит из нескольких этапов, выполняемых в соответствии с алгоритмом, изложенным на рисунке.



*В скобках указаны номера разделов данной инструкции, в которых описаны технологии выполнения метода. Рекомендации по использованию способов пробоподготовки, их комплексов и технологий дериватизации в зависимости от поставленной цели исследования отражены в разделе 4 данной инструкции.

1. ОТБОР БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Кровь (не менее 20 мл) отбирают в сухой чистый флакон с добавлением антикоагулянта (гепарин 4–5 капель).

Мочу (не менее 100 мл) собирают в чистую сухую пластиковую или стеклянную посуду без консервантов. Для анализа используют только прозрачные образцы, при необходимости мочу фильтруют или центрифугируют: примеси (отбеливатели или другие окисляющие агенты), попадающие в образцы мочи на преаналитическом этапе, могут давать ошибочные результаты тестирования.

Волосы срезаются ножницами от корней на любом участке головы и помещаются в полиэтиленовый пакетик с клапаном.

Ногтевые пластины срезаются ножницами и помещаются в полиэтиленовый пакетик с клапаном.

Правила отбора, оформления, хранения и доставки биологического материала на химико-токсикологическое исследование регламентируются инструкцией о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них концентрации абсолютного этилового спирта, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ, утвержденной постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 09.08.2011 № 81.

2. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Методом предварительного анализа, позволяющим произвести скрининговый поиск ПАВ, является иммунохроматографический — с применением экспресс-тестов при их наличии для обнаружения конкретного вещества или группы веществ. При использовании экспресс-тестов вероятно получение ложноположительного результата из-за наличия кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры, поэтому *для исключения ошибок при положительном или сомнительном результате в обязательном порядке необходимо подтверждающее химико-токсикологическое исследование другим, более специфичным методом.*

В случае отрицательного результата при исследовании с использованием экспресс-тестов дальнейший анализ проводить нецелесообразно из-за достаточно высокой чувствительности иммунохимического метода.

При положительном результате в качестве дополнительных методов используются:

- метод ТСХ, проводимый после пробоподготовки методом ЖЖЭ;
- ГХ/МС после пробоподготовки методами ЖЖЭ, модифицированной ЖЖЭ-Е с использованием сорбента Extrelut NT или ТФЭ с дериватизацией или без нее;

- ВЭЖХ после пробоподготовки методами ЖЖЭ, модифицированной ЖЖЭ-Е или ТФЭ без дериватизации.

При отсутствии экспресс-тестов, зарегистрированных Министерством здравоохранения РБ и разрешенных для применения, выбор способа пробоподготовки зависит от физико-химических свойств веществ с учетом вероятности нахождения аналитов в образцах биологического материала в связанном состоянии с белками, глюконовой кислотой, сульфатами, а также в зависимости от необходимости обнаружения метаболитов. Пробоподготовка проводится по одной или нескольким описанным ниже технологиям с учетом указанного перечня веществ, которые могут быть выделены из биоматериала при их использовании.

3. ВЫПОЛНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА

3.1. Технология пробоподготовки для выделения ПАВ с использованием метода прямой ЖЖЭ

ЖЖЭ позволяет выделять из биологических образцов (крови, мочи) следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ:

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепаина и продукты их гидролиза;
- производные салициловой кислоты;
- псилоцин, псилоцибин;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- трициклические антидепрессанты;
- синтетические дизайн-амфетамины — производные фенациаламина (в т. ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды — производные 1Н-индол-3-карбальдегида (AB-PINACA, AB-FUBINACA и др.).

Вариант № 1 (выделение ПАВ из мочи и крови для скринингового исследования с целью выявления опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных; циклодола, кетамина, трициклических антидепрессантов; производных барбитуровой и троповой кислот, бензодиазепаина, дибензодиазепаина, фенотиазина, тиоксанта, бутирофенона, клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенациаламина, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-3-карбальдегида).

В экстракционную трубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы и добавляют 0,2 мл (для плазмы 0,1 мл) 2 н раствора соляной кислоты, перемешивают, затем добавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метиловом спирте (0,04 г/л), 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 α -метилтестостерона в этиловом спирте (0,15 г/л), перемешивают и проверяют рН с помощью универсальной индикаторной бумаги. При необходимости доводят рН до 2,0 раствором соляной

кислоты. Экстракцию проводят дважды: первый раз — диэтиловым эфиром; второй — хлороформом (в объемном отношении «экстрагент» – биологическая жидкость 1:1). Время экстракции — 10 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин или шейкере-ротаторе. Содержимое тубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой эфира и нижний слой хлороформа отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в чашку для выпаривания при исследовании мочи или концентрационную чашку при исследовании плазмы. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Сухой остаток содержит вещества кислого характера.

К оставшемуся в тубе биологическому объекту (моче) добавляют 0,2 мл 25 %-го раствора аммиака (для плазмы — 0,1 мл), перемешивают и проверяют рН с помощью универсальной индикаторной бумаги. При необходимости доводят рН до 9,0 25 %-м раствором аммиака. Экстракцию проводят дважды: первый раз — хлороформом; второй — смесью хлороформ – бутанол-1 (9:1) (в объемном отношении «экстрагент» : биологическая жидкость 1:1). Время экстракции — 10 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин. Содержимое тубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Нижний слой хлороформа или смеси хлороформ – бутанол-1 отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в чашку для выпаривания при исследовании мочи или концентрационную чашку при исследовании плазмы. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Сухой остаток содержит вещества основного характера.

Полученные извлечения исследуют методами ТСХ, ГХ и ГХ/МС без дериватизации или с дериватизацией с использованием ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение амфетамина, метамфетамина, их производных и синтетических дизайн-амфетаминов группы фенациламина из мочи и крови).

В экстракционную тубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы, прибавляют 3,0 г натрия хлорида и 1,5 мл насыщенного раствора натрия углекислого, 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метиловом спирте (0,04 г/л), затем перемешивают, проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 9–10). Экстракцию проводят 10 мл смеси растворителей: хлористый метилен – гептан – пропанол-2 (7:2:1). Время экстракции — 10 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин. Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой органического растворителя отбирают одноразовой пластиковой пастеровской пипеткой и переносят в концентрационную чашку, избегая попадания водного слоя. В конечный экстракт добавляют 2–3 капли раствора соляной кислоты в метаноле в соотношении 9:1 для предотвращения потерь ПАВ при выпаривании. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха или азота при температуре не выше 40 °С. Полученное извлечение изучают методами ТСХ, ГХ и ГХ/МС без дериватизации или с дериватизацией для исследования методами ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 3 (выделение трамадола из мочи и крови).

В экстракционную трубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы, добавляют 25 %-й раствор аммиака до рН 11–12 по универсальному индикатору, затем 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метиловом спирте (0,04 г/л), перемешивают. Экстрагируют равным объемом смеси хлороформ – пропанол-2 (9:1). Время экстракции — 5 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин. Центрифугируют 5 мин при 2500 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя отбирают одноразовой пластиковой пастеровской пипеткой и переносят в концентрационную чашку, избегая попадания водного слоя. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха или азота при температуре не выше 50 °С. Сухой остаток растворяют в точном объеме хлороформа и исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС или ГХ/МС.

Вариант № 4 (выделение оксибутирата (*по* бутиролактону) из мочи и крови).

В экстракционную трубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы, добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты (для мочи) или 1,2 мл концентрированной соляной кислоты (для крови), перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 1–2). Затем прибавляют 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 α -метилтестостерона в этиловом спирте (0,15 г/л), перемешивают. Экстрагируют равным объемом хлористого метилена. Время экстракции — 10 мин на планетарном шейкере типа S-3 при 100 об/мин. Центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя отбирают одноразовой пластиковой пастеровской пипеткой и переносят в концентрационную чашку, избегая попадания водного слоя.

Органическое извлечение упаривают в токе теплого воздуха или азота при температуре не выше 30–40 °С до объема около 500 мкл. Упаренное извлечение переносят в виалу, при необходимости доводят объем до 500 мкл метиленом хлористым и исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС или ГХ/МС.

Не допускать выпаривания до сухого остатка во избежание потерь конечного продукта – бутиролактона.

3.2. Технология пробоподготовки для выделения ПАВ методом разрушения связей с белками и последующей ЖЖЭ

Метод разрушения связей с белками с последующей экстракцией органическими растворителями позволяет выделять из биологических объектов (плазмы) ЛС, наркотические средства и психотропные вещества, которые транспортируются в виде комплексов с белками крови.

Вариант № 1 (выделение метадона, трамадола, димедрола и продуктов их метаболизма; производных салициловой кислоты; трициклических антидепрессантов, производных барбитуровой кислоты и бензодиазепина; хлоропирамина и других ЛС).

Отбирают 1 мл исследуемого образца (сыворотки или плазмы) и проверяют рН, при необходимости доводят рН до 7–9 добавлением по каплям 2 %-го раствора аммиака, перемешивают. Отбирают 500 мкл подготовленного

анализируемого образца, переносят в пробирку объемом 1,5 мл. При необходимости добавляют внутренний стандарт [IS] (например, 10 мкл D5-диазепама с концентрацией 0,01 г/л). Затем добавляют 500 мкл холодного (-18 °С и ниже) ацетонитрила. Смесь тщательно перемешивают в течение 10–15 с, используя вортекс. Исследуемый образец помещают на 10 мин в морозильник (-18 °С и ниже, затем центрифугируют пробирку с образцом при 10000 x g (20 °С) в течение 5 мин. Отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в виалу. Полученное извлечение исследуют методами ГХ и ГХ/МС, ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации или с дериватизацией для исследования методами ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей, димедрола и продуктов его метаболизма; производных салициловой кислоты; трициклических антидепрессантов, производных барбитуровой кислоты и бензодиазепина; хлоропирамина и других ЛС).

В экстракционную трубу объемом 12 мл помещают 1 мл плазмы или сыворотки. При необходимости добавляют внутренний стандарт [IS] (например, 10 мкл D5-диазепама с концентрацией 0,01 г/л в метиловом спирте). Затем в трубу добавляют 3 мл ацетонитрила, перемешивают, встряхивают на шейкере 10 мин при 120 об/мин, центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой ацетонитрила отбирают пипеткой и переносят в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 3 мл хлороформа и смесь встряхивают на шейкере 10 мин при 120 об/мин, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой хлороформа (нижний) отбирают пипеткой, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С до сухого остатка. Полученное извлечение изучают методами ГХ и ГХ/МС, ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации или с дериватизацией для исследования методами ГХ и ГХ/МС.

3.3. Технология пробоподготовки для выделения ПАВ методом ТФЭ

ТФЭ без предварительного гидролиза, при использовании картриджей, заполненных различными сорбентами, позволяет выделять из биологических образцов (мочи) следующие индивидуальные вещества и группы химических соединений:

- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- фенциклидин (РСР);
- кокаин и его метаболиты;
- синтетические дизайн-амфетамины;
- производные фенацетиламина (в т. ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты.

Вариант № 1 (выделение производных фенилалкиламина: амфетамин, метамфетамин и их дериваты, дизайн-амфетамины).

В мерную пробирку отбирают 5 мл мочи, прибавляют 3 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 6,0), затем прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают.

Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200 мг/3 мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 6 мл метилового спирта и 6 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного с рН 6,0. Затем загружают 6 мл подготовленного образца мочи со скоростью 2–3 мл/мин. Картридж промывают последовательно 3 мл воды, 3 мл 1,0 М раствора уксусной кислоты и 3 мл метилового спирта. Картридж сушат под вакуумом в течение 10 мин. Элюирование аналитов производят пропусканием через картридж 3 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – концентрированная соляная кислота (60:40:1) со скоростью 2–3 мл/мин. Элюат собирают, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученное извлечение исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации, либо с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение фенциклидина, РСР).

В мерную пробирку отбирают 5 мл мочи, прибавляют 3 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 6,0), затем прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают.

Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200 мг/3 мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 6 мл метилового спирта и 6 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного с рН 6,0. Затем загружают 6 мл подготовленного образца мочи со скоростью 2–3 мл/мин. Картридж промывают последовательно 3 мл воды, 3 мл 0,1 М раствора натрия уксуснокислого и 3 мл метилового спирта. Сушку картриджа производят под вакуумом в течение 10 мин. Элюирование аналитов производят пропусканием через картридж 3 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2) со скоростью 2–3 мл/мин. Элюат собирают, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученное извлечение исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации.

Вариант № 3 (выделение кокаина и продуктов его метаболизма).

В мерную пробирку отбирают 5 мл мочи, прибавляют 3 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 6,0), затем прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают.

Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200 мг/3 мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 6 мл метилового спирта и 6 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного с рН 6,0. Затем загружают 6 мл подготовленного образца мочи со скоростью 2–3 мл/мин.

Картридж промывают последовательно 3 мл воды, 3 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и 3 мл метилового спирта. Сушку картриджа производят под вакуумом в течение 10 мин. Элюирование аналитов производят пропусканьем через картридж 3 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2) со скоростью 2–3 мл/мин. Элюат собирают, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученное извлечение исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

3.4. Технология пробоподготовки для выделения ПАВ методом ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelute NT

ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelute NT позволяет выделять из биологических образцов (крови, мочи) следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ:

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- производные салициловой кислоты;
- нестероидные противовоспалительные средства;
- псилоцин, псилоцибин;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- трициклические антидепрессанты;
- синтетические дизайн-амфетамины — производные фенацетиламина (в т. ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды — производные 1Н-индол-3-карбальдегида (AB-PINACA, AB-FUBINACA и др.).

Вариант № 1 (выделение производных фенилалкиламина амфетамин, метамфетамин и их дериваты, дизайн-амфетамины).

В мерную пробирку отбирают 3 мл мочи, подщелачивают 10 Н раствором едкого калия до рН 11,0 по универсальной индикаторной бумажке, затем прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают. Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT, экспозиция 10 мин. Промывают 10 мл гексана, подкисленного 1 каплей 3 Н раствора соляной кислоты. Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью гексан из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл гексана. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева. Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС без дериватизации либо после дериватизации.

При исследовании методом ВЭЖХ к сухому остатку в концентрационной чашке прибавляют 1,5 мл 8 %-го водного раствора натрия двууглекислого и 1 мл

0,5 %-го водного раствора нафтохинон-4-сульфата, перемешивают, переносят в экстракционную трубу объемом 12 мл, закрывают крышкой и нагревают в термостате при 70 °С в течение 20 мин. Охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 5 мл четыреххлористого углерода и смесь встряхивают на шейкере 10 мин при 120 об/мин, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя (нижний) отбирают пипеткой, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С до сухого остатка. Полученное извлечение исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС.

Вариант № 2 (выделение производных барбитуровой кислоты).

В мерную пробирку помещают 2,5 мл мочи или плазмы, прибавляют 0,5 мл воды дистиллированной, затем 50 мкл стандартного раствора (2,0 г/л) диазепама в метаноле (при методе ВЭЖХ) или 50 мкл стандартного раствора (1,0 г/л) барбитала в метаноле (при методе ГХ/МС), перемешивают, прибавляют 2 капли концентрированной соляной кислоты, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 2,0).

Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Подготовленную пробу мочи или плазмы переносят в колонку с сорбентом Extrelute, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 10 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1); скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл гексана, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева.

Полученное извлечение исследуют методами ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации или с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

Вариант № 3 (выделение ПАВ и лекарственных средств кислого характера — производных салициловой, фенилпропионовой, барбитуровой кислоты и бензодиазепаина).

В мерную пробирку помещают 2,5 мл мочи, прибавляют 0,5 мл воды дистиллированной, затем 50 мкл стандартного раствора (1,0 г/л) барбитала в метаноле, перемешивают, прибавляют 2 капли концентрированной соляной кислоты, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 2,0).

Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 12 мл смеси хлороформ — этиловый эфир уксусной кислоты (10:2); скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева.

Полученное извлечение исследуют методами ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации или с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

Вариант № 4 (выделение ПАВ основного характера — опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных; циклодола, кетамина, трициклических антидепрессантов; производных троповой кислоты, бензодиазепина, дибензодиазепина, фенотиазина, тиоксантена, бутирофенона; клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенацеталамина, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-3-карбальдегида для исследования методом ВЭЖХ-МС/МС).

Отвешивают 60 мг сухого карбонатного буфера (натрий углекислый — калий углекислый 2:1) и помещают в мерную пробирку, приливают 3,5 мл мочи, перемешивают, затем прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают, проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 9,0). Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 3, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 13 мл смеси хлороформ – пропанол-2 (9:1); скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение упаривают до 100 мкл в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева, прибавляют 5 мл хлористого метилена и пропускают через картридж для ТФЭ с полярным сорбентом типа Diol SPE (10 мг). Картридж предварительно кондиционируют последовательным промыванием 1 мл метилена хлористого и 4 мл эфира диэтилового. Картридж просушивают под вакуумом в течение 10 мин. Затем элюируют метиловым спиртом дважды порциями по 500 мкл; скорость пропускания метилового спирта — 1 мл/мин. Элюат выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С. Исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС.

Вариант № 5 (выделение ПАВ основного характера — опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных; циклодола, кетамина, трициклических антидепрессантов; производных троповой кислоты, бензодиазепина, дибензодиазепина, фенотиазина, тиоксантена, бутирофенона; клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенацеталамина, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-3-карбальдегида).

В мерную пробирку объемом 20 мл отмеривают 10 мл мочи, прибавляют 0,5 мл 10 %-го раствора аммония сернокислого, затем 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л), перемешивают, прибавляют по каплям 25 %-й раствор натрия гидроокиси до рН 9,0 по универсальной индикаторной бумажке. Объем доводят дистиллированной водой до 20 мл. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 20, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 40 мл смеси хлороформ —

пропанол-2 (85:15); скорость пропускания раствора 2–2,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение переносят в экстракционную трубу объемом 50 мл и дважды экстрагируют 3 мл 0,2 Н раствора соляной кислоты. Солянокислое извлечение отделяют, переносят в мерную пробирку объемом 20 мл, прибавляют к нему 0,5 мл 10 %-го раствора аммония сернокислого, затем по каплям 25 %-й раствор натрия гидроокиси до рН 9,0 по универсальной индикаторной бумажке. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 20, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 40 мл смеси хлороформ – пропанол-2 (85:15); скорость пропускания раствора 2–2,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Полученное органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке при температуре не выше 60 °С. Исследуют методом ГХ/МС без дериватизации либо после нее.

3.5. Технология кислотного гидролиза с последующей экстракцией органическими растворителями

Кислотный гидролиз с последующей экстракцией при рН 9 позволяет выделять из биологических образцов (крови, мочи) следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ, которые находятся в биологических объектах, как в свободном, так и связанном с глюкокуроновой кислотой состоянии:

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- псилоцин, псилоцибин;
- производные салициловой кислоты;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- синтетические дизайн-амфетамины (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды группы JWH, их структурные аналоги и кислые метаболиты.

В пробирку с завинчивающейся крышкой или пенициллиновый флакон помещают 5 мл биологического образца (плазмы, мочи). Добавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта этилморфина гидрохлорида в метаноле (0,02 г/л), 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 α -метилтестостерона в этаноле (0,15 г/л) и перемешивают, затем добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты (при использовании пенициллинового флакона его помещают в пенал с завинчивающейся крышкой), нагревают 60 мин при температуре 90 °С. Выделение веществ из полученного гидролизата производится методами ЖЖЭ или ТФЭ.

Жидкостно-жидкостная экстракция

Вариант № 1 (выделение ПАВ, указанных в характеристике кислотного гидролиза).

В экстракционную трубу объемом 12 мл вносят 0,6 г натрия углекислого, затем по каплям 3 мл гидролизата, рН доводят до 9–10 по универсальной индикаторной бумажке добавлением 10 %-го раствора натрия углекислого. Добавляют 3 мл этилового эфира уксусной кислоты и перемешивают в течение 10 мин на шейкере при 120 об/мин. Содержимое трубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в концентрационную чашку. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение ПАВ, указанных в характеристике кислотного гидролиза).

В экстракционную трубу объемом 12 мл вносят 0,6 г натрия двууглекислого, затем по каплям 3 мл гидролизата, рН доводят до 8,8–9 по универсальной индикаторной бумажке добавлением 10 %-го раствора натрия двууглекислого. Добавляют 5 мл смеси хлороформ-бутанол (9:1 по объему) и перемешивают в течение 10 мин на шейкере при 120 об/мин. Содержимое трубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в концентрационную чашку. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученное извлечение исследуют методами ГХ и ГХ/МС без дериватизации или с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

Твердофазная экстракция

Гидролизат охлаждают до комнатной температуры, затем добавляют 500 мкл 25 %-го водного раствора аммиака, при необходимости рН доводят до 6,5–7 по универсальному индикатору добавлением 10 %-го раствора аммиака. Затем к образцу прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 4,8. Содержимое флакона центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, центрифугат отделяют от осадка. Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200 мг/3 мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95 %-го этилового спирта и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8). Затем загружают 3 мл подготовленного гидролизата со скоростью 2–3 мл/мин. Картридж промывают последовательно 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 10 %-го раствора этилового спирта. Сушку картриджа производят под вакуумом в течение 20 мин. Элюат I, содержащий вещества кислого характера, получают пропусканием через картридж смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (2:1) дважды по 2 мл со скоростью 2–3 мл/мин; элюат II — двукратным пропусканием через картридж смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й

раствор аммиака (2:1:0,1) по 2 мл со скоростью 2–3 мл/мин. Органические извлечения (элюаты) собирают отдельно, переносят в концентрационные чашки и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40 °С. Полученные извлечения исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ/МС.

3.6. Технология щелочного гидролиза с последующей экстракцией органическими растворителями

Щелочной гидролиз с последующей экстракцией при рН 1,0 или 2,0 позволяет выделять из биологических образцов (крови, мочи) следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ:

- синтетические каннабиноиды — производные 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида;

- кислые метаболиты синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов;

- метаболит тетрагидроканнабинола – 11-нор- δ -9-карбокситетрагидроканнабиноловая кислота.

Флакон БСС 25 или экстракционный флакон объемом 30 мл, экстракционные тубы на 12 мл, концентрационные и выпарительные чашки промывают смесью этилового спирта и хлороформа (1:1), высушивают, заливают «хромовой смесью» до верха на 30 мин. Обработанную лабораторную посуду промывают проточной водой без моющих средств, затем дистиллированной водой и высушивают в сухожаровом шкафу. Навинчивающиеся крышки промывают смесью этилового спирта и хлороформа (1:1), высушивают. После обработки флаконы закрывают навинчивающимися крышками, концентрационные чашки и чашки для выпаривания переворачивают вверх дном.

Необходимую для исследования предварительно обработанную лабораторную посуду промывают метиловым спиртом, высушивают в токе теплого воздуха, затем промывают 5 %-м раствором ТМС в толуоле. Флаконы закрывают навинчивающимися крышками, концентрационные чашки и чашки для выпаривания переворачивают вверх дном и помещают в сухожаровой шкаф на 30 мин при 80 °С.

Обработанную лабораторную посуду остужают до комнатной температуры (флаконы не открывают, чашки не переворачивают).

В подготовленный флакон БСС 25 или экстракционный флакон объемом 30 мл помещают 2 мл метилового спирта, добавляют 4 мл исследуемой мочи, 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 α -метилтестостерона (0,15 г/л) в этаноле и перемешивают. Затем добавляют 0,4 мл 5 М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Флакон закрывают навинчивающейся крышкой. Закрытый флакон помещают в термостатируемую водяную баню при 60 °С на 10 мин. После гидролиза флакон охлаждают до комнатной температуры (не открывая). К жидкости во флаконе прибавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты до рН 2,0 по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение не выше 2,0). Выделение веществ из полученного

гидролизата производят методами ЖЖЭ, ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelute NT 3.

Жидкостно-жидкостная экстракция

После проверки рН во флакон прибавляют 5 мл экстракционной смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1). Экстракцию проводят на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин. Слой органических растворителей отбирают пластиковой пипеткой, переносят в концентрационную чашку и высушивают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С. Экстракцию проводят дважды; органические извлечения объединяют в одной чашке.

При отборе слоя смеси органических растворителей не допускается попадание водной фазы в концентрационную чашку.

Полученное извлечение исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС без дополнительной обработки либо методом ГХ/МС после дериватизации.

Жидкостно-жидкостная экстракция с использованием сорбента Extrelute NT 3

Для проведения процедуры экстракции с использованием сорбента Extrelute к подкисленному гидролизату прибавляют по каплям 10 %-й раствор соляной кислоты до рН 1,0 по универсальной индикаторной бумажке. Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Пипеткой отбирают 3 мл подкисленного гидролизата и переносят в колонку с сорбентом Extrelute, экспозиция 10 мин. Промывают 10 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1). Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью гексан из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл гексана, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева.

Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

3.7. Технология ферментативного гидролиза β-глюкуронидазой с последующей экстракцией органическими растворителями

Ферментативный гидролиз с последующей экстракцией позволяет выделять из биологических образцов (крови, мочи) следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ:

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- псилоцин, псилоцибин;
- производные салициловой кислоты;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- синтетические дизайн-амфетамины (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;

- синтетические каннабиноиды — производные 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида;

- кислые метаболиты синтетических каннабиноидов группы JWH, их структурные аналоги и кислые метаболиты.

Во флакон БСС 25 или экстракционный флакон объемом 30 мл помещают 3 мл мочи, добавляют 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 6,8), затем по 50 мкл растворов внутренних стандартов в метаноле: этилморфина гидрохлорида (0,02 г/л), дифениламина (0,04 г/л), барбитала (0,2 г/л) и 30 мкл раствора β-глюкуронидазы.

Флакон закрывают крышкой и помещают в термостатируемую камеру на 1–2 ч при температуре 45 °С. Флакон охлаждают до комнатной температуры, не снимая крышки. Выделение веществ из полученного гидролизата производят методами ЖЖЭ, ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelute NT 3 или ТФЭ.

Жидкостно-жидкостная экстракция (выделение ПАВ кислого и основного характера, таких как опийные алкалоиды, их производные и синтетические заменители, производные барбитуровой кислоты, фенотиазина, бензодиазепина, тиоксантена и др. для скринингового исследования).

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8), перемешивают, затем прибавляют 0,5 г безводного натрия сернокислого, смесь встряхивают. Во флакон добавляют 5 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (3:1). Проводят экстракцию на шейкере в течение 10 мин при 120 об/мин, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин. Слой органических растворителей отбирают пластиковой пипеткой, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, смоченного гексаном, затем переносят в концентрационную чашку, выпаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С. Экстракцию проводят дважды, органические извлечения объединяют (извлечение № 1).

Оставшийся после экстракции водный гидролизат подщелачивают 10 %-м раствором аммиака до рН 8,5-9,0 по универсальной индикаторной бумажке, затем прибавляют 5 мл смеси метилен хлористый-пропанол-2 (2:1). Проводят экстракцию на шейкере в течение 10 мин при 120 об/мин, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин.

Слой органических растворителей отбирают пластиковой пипеткой, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, смоченного метиленом хлористым, затем переносят в концентрационную чашку, выпаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С. Экстракцию проводят дважды, органические извлечения объединяют (извлечение № 2).

Полученные извлечения исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Жидкостно-жидкостная экстракция применением сорбента Extrelute NT 3

Вариант № 1 (выделение ПАВ кислого и основного характера, таких как опийные алкалоиды, их производные и синтетические заменители, производные барбитуровой кислоты, фенотиазина, бензодиазепина, тиоксантена и др. для скринингового исследования).

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8), перемешивают.

Из подготовленной пробы мочи отбирают 3 мл и переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 3, установленную в систему для экстракции под вакуумом, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 12 мл смеси хлороформ – этиловый эфир уксусной кислоты (10:2). Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева. (Элюат I).

Элюат II получают пропусканием через колонку 12 мл смеси метилен хлористый–пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (2:1:0,1). Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению.

Элюаты переносят в концентрационные чашки и выпаривают в токе азота при температуре 40 °С или токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С. Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение ПАВ основного характера, таких как опиинные алкалоиды, их производные и синтетические заменители, производные фенотиазина, бензодиазепина, тиоксантена и др.).

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 1,3 мл карбонатного буфера с рН 10. Раствор перемешивают, проверяют рН раствора (необходимое значение 8,5–9,0). Если недостаточно, добавляют по каплям карбонатный буфер.

Из подготовленной пробы мочи отбирают 3 мл и переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 3, установленную в систему для экстракции под вакуумом, экспозиция 10 мин. Колонку промывают 10 мл смеси хлороформ – бутанол-1 (9:1). Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Полученное органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке при температуре не выше 60 °С. Исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо методом ГХ/МС после дополнительной дериватизации.

Твердофазная экстракция

Вариант № 1 (выделение ПАВ для скринингового исследования – опиинных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных;

циклодола, кетамина, трициклических антидепрессантов; производных троповой кислоты, бензодиазепина, дибензодиазепина, фенотиазина, тиоксантена, бутирофенона; клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенацаламина, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-3-карбальдегида).

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8), перемешивают. Содержимое флакона центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, центрифугат отделяют от осадка. В канюлю установки для вакуумной экстракции помещают картридж для ТФЭ (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95 %-го этилового спирта и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 4,8. Затем в картридж загружают 3 мл центрифугата со скоростью 1 мл/мин. Промывку картриджа производят последовательно пропусканием 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 10 %-го раствора этилового спирта со скоростью 2 мл /мин. Картридж просушивают под вакуумом в течение 20 мин. Для получения элюата I через картридж пропускают дважды по 2 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (2:1). Элюат II получают двукратным пропусканием через картридж смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (2:1:0,1). Элюаты переносят в концентрационные чашки и выпаривают в токе азота при температуре 40 °С или токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С.

Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение синтетических дизайн-амфетаминов группы фенацаламина – катинон, метилон, бутилон, этилон, меткатинон, нафирон, мефедрон, α -PVP, MDPV, α -PHP, 4- MeOPVP и др.).

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8), перемешивают. Содержимое флакона центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, центрифугат отделяют от осадка. В канюлю установки для вакуумной экстракции помещают картридж для ТФЭ (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 1 мл метанола и 1 мл дистиллированной воды. Затем в картридж загружают 3 мл центрифугата со скоростью 1 мл/мин. Промывку картриджа производят последовательно пропусканием 1 мл дистиллированной воды и 1 мл 0,01 М раствора соляной кислоты со скоростью 2 мл /мин. Картридж просушивают под вакуумом в течение 20 мин. Для получения элюата I через картридж пропускают дважды по 1 мл метанола.

Элюат II получают двукратным пропусканием через картридж смеси метанол – 25 %-й раствор аммиака (98:2). Элюаты переносят в концентрационные чашки и выпаривают в токе азота при температуре 40 °С или токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С.

Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

3.8. Технология пробоподготовки образцов волос и ногтей для выделения ПАВ

Использование нескольких вариантов пробоподготовки позволяет выделять из образцов волос и ногтей следующие индивидуальные вещества и химические группы веществ:

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- псилоцин, псилоцибин;
- производные салициловой кислоты;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- синтетические дизайн-амфетамины (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды — производные 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида;
- кислые метаболиты синтетических каннабиноидов группы JWH, их структурные аналоги и кислые метаболиты.

Вариант № 1 (выделение опиатов и их производных, кокаина, каннабиноидов и кислых метаболитов синтетических каннабиноидов из образцов волос и ногтей методом прямой экстракции).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 3 мл метилового спирта, выдерживают в ультразвуковой ванне 3 ч, центрифугируют при 6–14 тыс. об/мин. Метанол отделяют и упаривают в концентрационной чашке досуха. Сухой остаток растворяют в 150 мкл метанола. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки, прибавляют 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0 и подвергают дальнейшей очистке методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 мг/3 мл. Скорость потока 3–5 мл/мин. Кондиционирование картриджа осуществляют последовательным пропуском 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Подкисляют путем пропускания через картридж 2 мл 1 М раствора уксусной кислоты, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Промывают картридж 3 мл гексана.

Затем проводят экстракцию веществ кислого и нейтрального характера путем пропускания 2 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1) со скоростью 1–2 мл/мин. Полученное извлечение собирают (Элюат I). Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3–5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2). Извлечение собирают отдельно (Элюат II). Элюаты упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С или в токе азота при температуре не выше 40 °С.

Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 2 (выделение опиатов, их производных и синтетических заменителей, барбитуратов, кокаина, каннабиноидов и кислых метаболитов синтетических каннабиноидов из образцов волос и ногтей методом ферментативного гидролиза с последующей экстракцией).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 1,5 мл метилового спирта, выдерживают на вортексе 1 мин. Метанол отделяют. К навеске добавляют 1 мл 0,2 %-го раствора β-глюкуронидазы и химотрипсина в 0,1 М растворе аммония двууглекислого. Выдерживают 12 ч при 40 °С в термостате. Охлаждают до комнатной температуры, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 1 ч. Водную фазу отделяют и подвергают дальнейшей очистке методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 мг/3 мл. Скорость потока 3–5 мл/мин. Кондиционирование картриджа осуществляют последовательным пропусканием 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Подкисляют путем пропускания через картридж 2 мл 1 М раствора уксусной кислоты, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Промывают картридж 3 мл гексана. Затем проводят экстракцию веществ кислого и нейтрального характера путем пропускания 2 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1) со скоростью 1–2 мл/мин. Полученное извлечение собирают (Элюат I). Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3–5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2). Извлечение собирают отдельно (Элюат II). Элюаты упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С или в токе азота при температуре не выше 40 °С.

Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 3 (выделение каннабиноидов; нейролептиков; амфетамина и его производных, дизайн-амфетаминов и других психостимуляторов из образцов волос и ногтей методом щелочного гидролиза с последующей экстракцией).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 1,5 мл метилового спирта, выдерживают 1 мин на вортексе, затем метанол отделяют. К навеске образца в экстракционной трубе прибавляют 1,5 мл 2 М водного раствора натрия гидроокиси, выдерживают 1 ч в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С. Охлаждают до комнатной температуры, затем подкисляют до рН 2–3 добавлением 170 мкл концентрированной соляной кислоты. При необходимости доводят рН до значений 2–3 добавлением по каплям 2Н раствора соляной кислоты. Добавляют 3 мл смеси изооктан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1) и экстрагируют на орбитальном шейкере в течение 5 мин при 120 об/мин. Центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 5 мин. Органический слой отделяют, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С или в токе азота при температуре не выше 40 °С.

Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 4 (выделение опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина, бензоилэксгонина; производных бензодиазепина и других лекарственных средств из образцов волос и ногтей методом кислотного гидролиза с последующей экстракцией).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл. К навеске образца в экстракционной трубе прибавляют 1,5 мл 2 М раствора соляной или серной кислоты, выдерживают 12 ч при температуре 37 °С, охлаждают до комнатной температуры, затем подщелачивают до рН 7–8 добавлением 170 мкл 25 %-й раствора аммиака. Полученное извлечение содержит значительное количество «грязи», поэтому дальнейшую экстракцию проводят методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 мг/3 мл. Скорость потока 3–5 мл/мин.

Кондиционирование картриджа осуществляют последовательным пропуском 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3–5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2). Элюат переносят в концентрационную чашку и упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С или в токе азота при температуре не выше 40 °С.

Полученный элюат исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 5 (выделение опиоидных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей (метадона и др.), кокаина из образцов волос, ногтей методом кислотного гидролиза с последующей экстракцией).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл. К навеске образца в экстракционной трубе прибавляют 1,5 мл раствора концентрированной трифторуксусной кислоты в метаноле (9:1), выдерживают 1 ч в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С, затем 12 ч при температуре 37 °С. Охлаждают до комнатной температуры, подщелачивают до рН 7–8 добавлением 170 мкл 25 %-го раствора аммиака. Извлечение центрифугируют и жидкость отделяют от образца. Полученное извлечение содержит значительное количество «грязи», поэтому дальнейшую экстракцию проводят методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 мг/3 мл. Скорость потока 3–5 мл/мин. Кондиционирование картриджа осуществляют последовательным пропуском 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3–5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2 мин. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25 %-й раствор аммиака (78:20:2). Элюат переносят в концентрационную чашку и упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60 °С или в токе азота при температуре не выше 40 °С.

Полученный элюат исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации либо с дериватизацией при использовании ГХ и ГХ/МС.

Вариант № 6 (выделение производных фенилалкиламина из образцов волос и ногтей методом кислотного гидролиза с последующей экстракцией).

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 мин. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства,

затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60 °С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100–200 мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл. К навеске образца в экстракционной трубе прибавляют 1,5 мл раствора соляной кислоты в метаноле (9:1), выдерживают 1 ч в ультразвуковой ванне при температуре 60 °С, затем 12 ч при температуре 37 °С. Извлечение центрифугируют, жидкость отделяют от образца и переносят в мерную пробирку объемом 5 мл, объем доводят водой до 3 мл, подщелачивают 10Н раствором калия гидроокиси до рН 11,0 по универсальной индикаторной бумажке. Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute, экспозиция 10 мин. Промывают 10 мл гексана, подкисленного 1 каплей 3 Н соляной кислоты. Скорость пропускания раствора 1–1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью гексан из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл гексана. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева. Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС без дериватизации либо после дериватизации.

Для проведения исследования методом ВЭЖХ к сухому остатку в концентрационной чашке прибавляют 1,5 мл 8 %-го водного раствора натрия двууглекислого, 1 мл 0,5 %-го водного раствора нафтохинон-4-сульфата, перемешивают, переносят в экстракционную трубу объемом 12 мл, закрывают крышкой и нагревают в термостате при 70 °С в течение 20 мин. Охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 5 мл четыреххлористого углерода и смесь встряхивают на шейкере 10 мин при 120 об/мин, затем центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя (нижний) отбирают пипеткой, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40 °С до сухого остатка. Полученное извлечение растворяют в метаноле или подвижной фазе, исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС.

3.9. Технология дериватизации для идентификации ПАВ методами ГХ и ГХ/МС

Дериватизация йодметаном (метилирование) используется для выявления производных барбитуровой кислоты и их метаболитов; метаболита тетрагидроканнабинола–11-нор- δ -9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты, синтетических каннабиноидов производных 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида; кислых метаболитов синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов.

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после выделения из биологического материала разными экстракционными методами, добавляют 180 мкл безводного диметилсульфоксида, 40 мкл 25 %-го раствора тетраметиламмония гидроксида в метаноле. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Экспозиция 2 мин при комнатной температуре.

Добавляют 40 мкл иодметана, смесь переносят в подготовленную экстракционную трубу на 12 мл и закрывают навинчивающейся крышкой. Экспозиция 20 мин при комнатной температуре.

В трубу прибавляют 4 мл гексана и проводят экстракцию однократно на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин. Смесь в трубе центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин.

Верхний слой отбирают пастеровской пипеткой и выпаривают досуха в подготовленной концентрационной чашке при температуре не выше 60 °С.

Сухой остаток в концентрационной чашке растворяют в 105 мкл этилового эфира уксусной кислоты (тщательно смывают несколько раз со стенок чашки) и переносят в виалу с коническим дном или со вставкой объемом 250 мкл для исследования методами ГХ или ГХ/МС.

Дериватизация уксусным ангидридом (ацетилирование) используется для выявления опийных алкалоидов, их метаболитов и производных; синтетических опиоидов (метадон, фентанил и его производные и др.), производных фенилалкиламина и их метаболитов (амфетамин и др.); производных 1,4-бензодиазепина и продуктов их гидролиза; псилоцина, псилоцибина; производных салициловой кислоты; бензоилэргонина, кокаина, клофелина, димедрола, трамадола; синтетических дизайн-амфетаминов, в т. ч. PVP, MDPV и др. и их метаболитов).

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после проведения выделения из биологического материала разными экстракционными методами, добавляют 100 мкл смеси уксусного ангидрида с пиридином (3:2). Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном, закрывают крышкой с септой и обрабатывают в микроволновой печи в течение 5 мин при нагрузке 400 В. После обработки флакон открывают и удаляют избыток реактивов нагреванием при 70 °С под пониженным давлением.

Сухой остаток в виале растворяют в 100 мкл метанола (тщательно смывают несколько раз со стенок чашки) и исследуют методом ГХ или ГХ/МС.

Дериватизация трифторуксусным ангидридом (ацилирование) используется для выявления опийных алкалоидов, их метаболитов и производных; синтетических опиоидов (метадон, фентанил и его производные и др.), производных фенилалкиламина и их метаболитов (амфетамин и др.); производных 1,4-бензодиазепина и продуктов их гидролиза; псилоцина, псилоцибина; производных салициловой кислоты; бензоилэргонина, кокаина, клофелина, димедрола, трамадола; синтетических дизайн-амфетаминов, в т. ч. PVP, MDPV и др. и их метаболитов.

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после выделения из биологического материала разными экстракционными методами, добавляют 80 мкл трифторуксусного ангидрида. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном, закрывают крышкой с септой и помещают в сушильный шкаф при 55 °С на 30 мин.

После прогревания виалу открывают и удаляют избыток реактива в токе теплого воздуха до отсутствия запаха ангидрида.

Остаток растворяют в 80 мкл этилового эфира уксусной кислоты, встряхивают и исследуют методом ГХ или ГХ/МС.

Дериватизация пентафторпропионовым ангидридом (PFPAА) с 2,2,3,3,3-пентафлюоропропанолом (PFРОН) (алкилирование/ ацилирование) используется для выявления производных барбитуровой кислоты и их метаболитов; метаболита тетрагидроканнабинола-11-нор- δ -9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида; кислых метаболитов синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов.

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после проведения выделения из биологического материала разными экстракционными методами, добавляют 50 мкл PFPAА и 25 мкл PFРОН. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном, закрывают крышкой с септой и помещают в сушильный шкаф при 90 °С на 30 мин.

После прогревания виалу открывают и удаляют избыток реактива в токе теплого воздуха до отсутствия запаха ангидрида.

Остаток растворяют в 100 мкл этилового эфира уксусной кислоты, встряхивают и исследуют методом ГХ или ГХ/МС.

Дериватизация пентафторпропионовым ангидридом (ацилирование) используется для выявления амфетамина/метамфетамина и их дериватов.

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после выделения из биологического материала различными экстракционными методами, добавляют 0,5 мл смеси толуол – ацетонитрил (95:5) и 25 мкл PFPAА. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном, закрывают крышкой с септой и помещают в термостат при 45 °С на 10 мин.

Смесь в виале охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 1 мл 5 %-го раствора натрия двууглекислого, встряхивают на вортексе, в течение 30–60 с. Отбирают слой органической фазы и исследуют методом ГХ/МС.

Дериватизация триметилхлосиланом (TMS) в присутствии N,O-бис-триметилсилилфторацетамида (BSTFA) (силилирование) используется для выявления опийных алкалоидов, их метаболитов и производных; синтетических опиоидов (метадон, фентанил и его производные и др.), производных фенилалкиламина и их метаболитов (амфетамин и др.); производных 1,4-бензодиазепина и продуктов их гидролиза; псилоцина, псилоцибина; производных салициловой кислоты; бензоилэкгонина, кокаина, клофелина, димедрола, трамадола; синтетических дизайн-амфетаминов (в т. ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболитов; производных барбитуровой кислоты и их метаболитов; метаболита тетрагидроканнабинола-11-нор- δ -9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты, синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида; кислых метаболитов синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов.

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после выделения из биологического материала различными экстракционными методами, добавляют 70 мкл BSTFA, содержащего 1 % TMS. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном, закрывают крышкой с септой и помещают в сушильный шкаф при 70 °С на 30 мин.

После прогревания виалу охлаждают до комнатной температуры и содержимое исследуют методом ГХ или ГХ/МС.

4. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ

Рекомендации по использованию способов пробоподготовки и их комплексов в зависимости от поставленной цели исследования:

- при скрининговом анализе биологического образца мочи без конкретизации цели исследования рекомендуется использовать комплекс, состоящий из трех способов пробоподготовки: прямая ЖЖЭ с получением кислого и щелочного извлечения (глава 4.3.1, вариант № 1); щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.6) и ферментативный гидролиз β-глюкуронидазой с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelut NT (глава 4.3.7);

- при скрининговом анализе биологического образца крови (плазмы, сыворотки) без конкретизации цели исследования рекомендуется использовать комплекс, состоящий из двух способов пробоподготовки: разрушение связей аналитов с белками с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.2) и ферментативный гидролиз β-глюкуронидазой (химотрипсином или химопсином) с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.7);

- при скрининговом анализе биологических образцов волос, ногтей без конкретизации цели исследования рекомендуется использовать комплекс, состоящий из трех способов пробоподготовки: прямая ЖЖЭ с получением кислого и щелочного извлечения (глава 4.3.8, вариант № 1); ферментативный гидролиз β-глюкуронидазой (глава 4.3.8, вариант № 2) и щелочной гидролиз (глава 4.3.8, вариант № 3);

- при целенаправленном исследовании образца мочи с целью обнаружения опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей рекомендуется использовать солянокислый гидролиз с последующей ТФЭ (глава 4.3.5) и дериватизацией трифторуксусным ангидридом (глава 4.3.9) или ферментативный гидролиз β-глюкуронидазой (глава 4.3.7) с последующей ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelut NT (глава 4.3.7, вариант № 2) или ТФЭ (глава 4.3.7, вариант № 1);

- при целенаправленном исследовании образца мочи с целью обнаружения каннабиноидов растительного происхождения рекомендуется использовать щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.6);

- при целенаправленном исследовании образца мочи с целью обнаружения амфетамина/метамфетамина и их производных; синтетических дизайн-амфетаминов — производных фенацаламина (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их

метаболитов рекомендуется использовать комплекс из двух способов пробоподготовки: прямую ЖЖЭ с получением щелочного извлечения (глава 4.3.1, вариант № 2) и ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4, вариант № 1);

- при целенаправленном исследовании образцов крови или мочи с целью обнаружения трамадола и его метаболитов рекомендуется использовать прямую ЖЖЭ (глава 4.3.1, вариант № 3);

- при целенаправленном исследовании образцов крови или мочи с целью обнаружения оксибутирата (*по бутиролактону*) рекомендуется использовать прямую ЖЖЭ (глава 4.3.1, вариант № 4);

- при целенаправленном исследовании образцов крови или мочи с целью обнаружения фенциклидина (PCP) рекомендуется использовать ТФЭ (глава 4.3.3, вариант № 2);

- при целенаправленном исследовании образцов мочи с целью обнаружения кокаина и его метаболитов рекомендуется использовать ТФЭ (глава 4.3.3, вариант № 3);

- при целенаправленном исследовании образцов крови или мочи с целью обнаружения производных барбитуровой кислоты рекомендуется использовать ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4, вариант № 2);

- при целенаправленном исследовании образца мочи с целью обнаружения синтетических каннабиноидов производных 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида рекомендуется использовать щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.6);

- при целенаправленном исследовании образца мочи с целью обнаружения синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-3-карбальдегида (AB-PINACA, AB-FUBINACA и др.) рекомендуется использовать комплекс из двух способов пробоподготовки: прямую ЖЖЭ с получением щелочного извлечения (глава 4.3.1, вариант № 2), ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4, вариант № 4) и щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.6);

- при целенаправленном исследовании образцов крови или мочи с целью обнаружения производных бензодиазепина рекомендуется использовать комплекс из двух способов пробоподготовки: прямую ЖЖЭ с получением кислого и щелочного извлечения (глава 4.3.1, вариант № 1) и солянокислый гидролиз с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.5);

- при целенаправленном исследовании образцов мочи с целью обнаружения дизайн-амфетаминов группы фенациламина (катинон, метилон, бутилон, этилон, меткатинон, нафирон, мефедрон, α -PVP, MDPV, α -PHP, 4-MeOPVP и др.) рекомендуется использовать комплекс из двух способов пробоподготовки: прямую ЖЖЭ с получением щелочного извлечения (глава 4.3.1, вариант № 2) и ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой (глава 4.3.7) с последующей ТФЭ (глава 4.3.7, вариант № 2);

- при целенаправленном исследовании образцов мочи с целью обнаружения ПАВ и лекарственных средств кислого характера – производных салициловой,

фенилпропионовой, барбитуровой кислоты и бензодиазепаина рекомендуется использовать ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4, вариант № 3).

Рекомендации по использованию технологий дериватизации аналитов при проведении пробоподготовки в зависимости от поставленной цели исследования:

Технология дериватизации используется только при проведении анализа методом ГХ/МС и позволяет значительно увеличить чувствительность выявления большинства психоактивных веществ. Рекомендуется использовать следующие способы дериватизации при проведении химико-токсикологических исследований:

- при выявлении в крови или моче наркотических средств и психотропных веществ по схеме (скрининговое исследование) без конкретизации цели исследования рекомендуется использовать:

а) способ дериватизации сухого остатка из щелочного извлечения трифторуксусным ангидридом;

б) способ дериватизации иодметаном сухого остатка после щелочного гидролиза с последующей экстракцией;

в) способ дериватизации трифторуксусным ангидридом сухого остатка после ферментативного гидролиза и последующей экстракции;

- при выявлении каннабиноидов растительного происхождения; синтетических каннабиноидов — производных 1Н-индол-карбальдегида и 1Н-индазол-карбальдегида; производных барбитуровой кислоты рекомендуется использовать способ дериватизации иодметаном;

- при выявлении опийных алкалоидов и их производных рекомендуется использовать способ дериватизации трифторуксусным ангидридом или уксусным ангидридом;

- при выявлении ПАВ, выделяемых методом кислотного гидролиза из волос и ногтей, рекомендуется использовать способ дериватизации пентафторпропионовым ангидридом с пентафтопропиловым спиртом.

Перечень разработанных с участием авторов настоящего нормативного документа инструкций по химико-токсикологическому определению содержащихся в биологическом материале психоактивных веществ (утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь)

Экспресс-тесты на основе моноклональных антител для идентификации наркотических средств и психотропных веществ в биологических пробах (опийных алкалоидов, героина, амфетамина, метамфетамина и их дериватов; каннабиноидов (марихуаны); инструкция по применению № 048-0509

Методика обнаружения и количественного определения опиатов в биологических жидкостях: инструкции по применению № 061-0610.

Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях»; регистрационный № 104-0910.

Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных немедицинским употреблением трамадола; регистрационный № 049-0511.

Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных каннабиноидами; регистрационный № 065-0512.

Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях; регистрационный № 104-0910.

Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикаций, вызванных немедицинским употреблением трамадола; регистрационный № 049-0511.

Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных каннабиноидами; регистрационный № 065-0512.

Методика идентификации и количественного определения фенobarбитала в биологических жидкостях; регистрационный № 077-0713.