

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ)

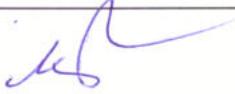
Директор НИИ химии
ННГУ им. Н.И. Лобачевского
Е.В. Сулейманов
«~~27~~» ~~сентября~~ 2020 г.



Методика одновременного определения алкоголя, наркотических
средств, психотропных и других токсических веществ в биожидкостях и
тканях человека

г. Нижний Новгород
2020 г.

Список исполнителей

Должность	Фамилия И.О.	Подпись
Ответственный исполнитель, доцент. каф. аналитической химии, к.х.н.	Мосягин П.В.	

Содержание

1. Приборы и материалы	4
2. Приготовление стандартных растворов	4
3. Пробоподготовка образцов	5
4. Хромато-масс-спектрометрический анализ	5
5. Проверка метрологических характеристик	6
6. Литература	7

1. Приборы и материалы:

Газовый хромато-масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2020 с квадрупольным масс-анализатором, база данных масс-спектров NIST-2017, весы аналитические Shimadzu AUX 220 первого класса точности, микрошприцы хроматографические на 10 мкл, гелий ОСЧ марки 60. Колонка хроматографическая кварцевая капиллярная DB-5MS 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм. Колонка для твердофазной экстракции объемом 10 мл (Bond Elut LRC Certify, Agilent Technologies). Митриптилин, нортриптилин, циталопрам (Lundbeck, Дания), кломипрамин, мапротилин и десметилмапротилин (Novartis, Швейцария), флуоксетин был предоставлен Lilly (Великобритания), миртазапин и десметилмиртазапин (Organon, Нидерланды), сертралина гидрохлорид, малеат десметилсертралина Pfizer (США), венлафаксин и о-десметилвенлафаксин (Wyeth, США). Гептафторбутировый ангидрид (Fluka, Германия). Внутренний стандарт, протоптилина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США), метанол ХЧ (ГОСТ 6995-77), изопропанол (осч 13-5 ТУ2632-121-44493179-08), аммония гидроксид (хч ГОСТ 3760-79), этилацетат ХЧ (ГОСТ 22300-76), спирт этиловый ГОСТ 5962-2013

1. Приготовление стандартных растворов

Готовят исходные растворы с концентрацией 1 мг/мл для каждого аналита и внутреннего стандарта путем растворения соответствующего количества соединения в метаноле. Из этих растворов готовят рабочий стандартный раствор, содержащий аналиты и метаболиты в концентрации 0,1, 1 и 5 мг/мл в метаноле для калибровочных кривых. Рабочий раствор внутреннего стандарта готовят в концентрации 0,2 мг/мл после последовательного разведения в метаноле. Все рабочие стандартные растворы хранят при 4 °С. Готовят шесть калибровочных и три контрольных образца с концентрацией 5, 10, 30, 100, 250 и 500 нг/мл и 15, 150 и 400 нг/мл, соответственно, путем добавления соответствующего количество рабочих стандартных растворов аналитов в метаноле в 1 мл образца биожидкости.

2. Пробоподготовка образцов

Для твердофазной экстракции используют колонку LRC Certify, содержащую смешанный сорбент, состоящий из неполярного сорбента C8 и сильного катионообменного (SCX) сорбента. Экстракцию аналитов из образцов биожидкости выполняют следующим образом. К 1 мл каждого образца добавляют 30 мкл раствора внутреннего стандарта (0,2 мг/мл) и 5 мл фосфатного буфера (0,1 моль/л; pH 6.0). Затем проводят перемешивание и центрифугирование при 2000 об/мин в течение 5 мин. Затем надосадочную жидкость помещают в 2 мл метанола и добавляют 2 мл 0,1-молярного фосфатного буферного раствора (pH 6.0) и медленно пропускают под вакуумом через колонку для твердофазной экстракции со скоростью 1 мл/мин. Затем промывают колонку 2 мл деионизированной воды, добавляют 1,0 мл уксусной кислоты (1,0 моль/л), а затем промывают 3 мл метанола. Колонку затем просушивают в высоком вакууме (10 мм рт. ст.) в течение 5 мин. Элюирование удерживаемых аналитов проводят с добавлением 1,5 мл свежеприготовленной смеси этилацетат : изопропанол : гидроксид аммония (85: 15: 3, % об. / об. / об.). Элюаты дериватизируют добавлением 50 мл гептафторбутирового ангидрида в 100 мл ацетона при 50° С в течение 30 мин. В систему хромато-масс-спектрометра вводят 1 мкл полученного раствора.

3. Хромато-масс-спектрометрический анализ

Используют систему газовый хроматограф – масс-спектрометр Shimadzu GCMS-QP2020 с квадрупольным масс-анализатором. Разделение аналитов выполняют на колонке из плавленого кварца DB-5MS (длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мм), в качестве газа-носителя используют гелий со скоростью потока 1,0 мл/мин. Начальную температуру колонки устанавливают 50 °С и выдерживают в течение 1 мин и затем увеличивают со скоростью 40 °/мин до 300 °С, выдерживают 12 мин. Температуру инжектора устанавливают 240 °С в режиме

без деления потока. Устанавливают температуру источника ионов и интерфейса хроматограф-масс-детектор 230 и 280 °С соответственно.

Ионизацию проводят электронным ударом с энергией электронов 70 эВ. Сбор данных проводится в режиме полного ионного мониторинга (сканирование в диапазоне m/z 40–700) для определения времени удерживания и характеристик масс-фрагментов для каждого аналита, а затем проводят работу в режиме селективного ионного мониторинга.

4. Проверка метрологических характеристик

Проверка селективности проводится путем определения шести различных аналитов в холостых пробах для определения матричного эффекта и любых возможных вмешательств из-за эндогенных соединений. Оценка специфичности выполняется путем добавления в холостые образцы 50 мл смешанных рабочих растворов (10,0 мг / мл) часто контролируемых аналитов в биожидкостях (парацетамол, диазепам, нордазепам, алпразолам, бромазепам, 7-аминофлунизепам, лоразепам, фенобарбитал, кветиапин, оланзапин, хлорпромазин, левомепромазин, бипериден, золпидем, трамадол, амфетамин, метамфетамин, 3,4-метилendioксиметамфетамин, лидокаин, кетамин, норкетамин, эфедрин, D9-тетрагидроканнабинол, 11-нор-9-карбокси-D9-тетрагидроканнабинол, бупренорфин, норбупренорфин, метадон, морфин, кодеин, 6-моноацетилморфин, кокаин, бензоилэксгонин и метиловый эфир экголина), в результате конечная концентрация должна быть концентрация 500,0 нг / мл для каждого соединения, чтобы определить влияние этих соединений на исследуемые аналиты. Оценивается интерференция на хроматограмме по времени удерживания эндогенных и экзогенных соединений и их метаболитов. Предел обнаружения $C_{мин}$ устанавливают по формуле: $C_{мин} = 3C/(S/N)$, где C – концентрация аналита, S – сигнала от аналита с данной концентрацией, N – амплитуда флуктуации шума хроматограммы. Предел определения рассчитывают умножением предела обнаружения на 10. Линейность оценивается по четырем

калибровочным кривым в разные дни в диапазоне 5,00–500,0 нг/мл для всех аналитов, построение графика проводится в осях: отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта – концентрация соответствующего аналита. Линии регрессии рассчитывают с использованием метод наименьших квадратов с весовым коэффициентом $1/x^2$, где x – концентрация каждого аналита. Коэффициенты корреляции (R^2) для всех аналитов должны быть не хуже 0,990. Абсолютное извлечение для каждого аналита рассчитывается по соотношению площади пика аналита, полученного после экстракции из образца к экстракту из соответствующего метанольного стандарта. Абсолютное извлечение определяется для серии из шести опытов. Правильность (процентное отличие полученного результата от теоретического) и прецизионность (выражаемое как относительное стандартное отклонение) определяется путем проведения шести повторных опытов для трех уровней концентрации аналитов в течение четырех разных дней. Критерии приемлемости правильности и прецизионности: в пределах 15%. Внутрисуточная правильность и прецизионность рассчитывается путем выполнения шести повторных опытов для трех уровней концентрации в один день. Прецизионность и правильность внутрисуточная должны быть менее 10%.

Литература

1. Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н. Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила // Журнал аналитической химии. 2015. Т. 70. № 2. С. 216–224.
2. Григорьев А.М., Крупина Н.А. Обнаружение ацетилфентанила в биологических образцах и идентификация его метаболитов методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии // Судебная медицина. 2016. Т. 2. №2. С. 113-115.

3. Ntoupa P.-S.A., Armaos K.P., Athanaselis S.A. et al. Study of the distribution of antidepressant drugs in vitreous humor using a validated GC/MS method // *Forensic Science International*. 2020. V. 317. P. 1-7.
4. Maurer H. H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control // *Journal of Chromatography B*. 1999. V. 733. P. 3–25.
5. Wozniak M.K. et al. Application of gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of amphetamine-type stimulants in blood and urine // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018. V. 148. P. 58–64.
6. Zaitseva K. et al. Determination of a newly encountered designer drug “p-methoxyethylamphetamine” and its metabolites in human urine and blood // *Forensic Science International*. V. 177. 2008. P. 77–84.
7. Orfanidis A. et al. GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples // *Journal of Chromatography B*. 2017. V. 1047. P. 141–150.
8. Kankaanpa A. et al. Single-step procedure for gas chromatography–mass spectrometry screening and quantitative determination of amphetamine-type stimulants and related drugs in blood, serum, oral fluid and urine samples // *Journal of Chromatography B*. 2004. V. 810. P. 57–68.
9. A. Luiz Oenning, et al. A green and low-cost method employing switchable hydrophilicity solvent for the simultaneous determination of antidepressants in human urine by gas chromatography - mass spectrometry detection // *Journal of Chromatography B*. 2020. V. 1143. P. 1-11.
10. M. Katselou et al. Development and validation of a GC–MS method for the determination of hydroxyzine and its active metabolite, cetirizine, in whole blood // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017. V. 145. P. 765–772.