

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Дворская Оксана Николаевна

НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СКРИНИНГУ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
Григорьев Андрей Михайлович,
доктор химических наук

Пермь – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. АНАЛИЗ СПОСОБОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ТОКСИКАНТОВ (обзор литературы).....	16
1.1 Твердофазная экстракция как метод пробоподготовки к анализу: основные стадии, области применения, преимущества использования.....	16
1.2 Характеристика патронов и сорбентов, используемых для твердофазной экстракции.....	22
1.3 Особенности крови и мочи как объектов исследования в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе.....	31
1.4 Анализ публикаций по проведению пробоподготовки биологических объектов методом твердофазной экстракции с использованием различных видов сорбентов.....	32
1.4.1 Использование диатомовой земли.....	32
1.4.2 Применение стирол-дивинилбензольной смолы и ее производных.....	35
1.4.3 Использование различных видов силикагеля с привитыми фазами.....	39
1.5 Общая характеристика и метаболизм отдельных групп токсикологически значимых веществ.....	51
1.5.1 Производные фентанила (ацетилфентанил).....	51
1.5.2 Синтетические каннабимиметики группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22).....	56
1.5.3 Синтетические каннабимиметики группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA).....	65
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	75
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	77
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	77
2.1 Материалы, реактивы, оборудование и объекты исследования.....	77

2.2 Методики проведения пробоподготовки крови.....	82
2.3 Методики проведения пробоподготовки мочи.....	84
2.4 Получение дериватов лекарственных и наркотических веществ при подготовке проб крови.....	87
2.5 Получение дериватов метаболитов синтетических каннабимиметиков, природных каннабиноидов и ацетилфентанила при подготовке проб мочи.....	88
2.6 Режимы работы приборов и программное обеспечение исследований.....	90
2.7 Математическое планирование эксперимента.....	92
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ.....	93
3.1. Выбор модельных соединений для разработки методики скрининга широкого круга токсикантов в крови.....	93
3.1.1 Расчет физико-химических констант модельных соединений.....	94
3.1.2 Сравнение эффективности экстракции модельных соединений из крови методами жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции.....	99
3.2. Оптимизация условий твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови.....	100
3.2.1 Выбор факторов и построение плана проведения экспериментальных исследований методом математического планирования эксперимента.....	101
3.2.2 Влияние исследуемых факторов на эффективность твердофазной экстракции бензоилэкгонина, диазепама, морфина, фенobarбитала, кеторолака из крови	107
3.2.3 Изучение влияния уксусной кислоты на эффективность твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ при скрининге крови.....	116
3.3 Количественная оценка содержания некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и	118

наркотических веществ в крови методом твердофазной экстракции	
3.3.1 Расчет основных физико-химических констант группы нестероидных противовоспалительных средств	120
3.3.2 Изучение эффективности твердофазной экстракции некоторых нестероидных противовоспалительных средств из крови.....	123
3.3.3 Валидация методики количественного определения ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность	125
3.4. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок.....	143
3.5 Результаты использования унифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови при экспертных исследованиях	149
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	156
ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМИМЕТИКОВ ГРУППЫ ЭФИРОВ АЛКИЛИНДОЛ-3-КАРБОКСИЛАТОВ И ГРУППЫ АЛКИЛИНДАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ АМИДА ВАЛИНА В МОЧЕ.....	160
4.1 Идентификация и аналитические характеристики основных метаболитов каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов в моче с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.....	162
4.1.1 Основные метаболиты и маркеры PB-22.....	162
4.1.2 Основные метаболиты и маркеры PB-22F.....	170
4.1.3 Основные метаболиты и маркеры FUB-PB-22.....	177
4.2 Выявление основных метаболитов каннабимиметиков группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина	183
4.2.1 Основные метаболиты и маркеры AB-PINACA	183
4.2.2 Основные метаболиты и маркеры 5F-AB-PINACA	190

4.2.3 Основные метаболиты и маркеры АВ-CHMINACA	200
4.2.4 Основные метаболиты и маркеры АВ-FUBINACA.....	206
4.3 Сравнение методов совместного обнаружения маркеров синтетических и природных каннабиноидов при варьировании способов деконъюгирования, экстракции и дериватизации.....	214
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....	217
ГЛАВА 5. ВЫЯВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ СИНТЕТИЧЕСКОГО НАРКОТИЧЕСКОГО АНАЛЬГЕТИКА АЦЕТИЛФЕНТАНИЛА В МОЧЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ГАЗОВОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	222
5.1 Основные метаболиты и маркеры ацетилфентанила.....	225
5.2 Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила.....	226
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	234
Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических объектах с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием	235
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	237
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	240
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	243
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	291
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	291
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	310
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	338
ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....	361
ПРИЛОЖЕНИЕ 5.....	370

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

В экспертной практике при производстве судебно-химических и химико-токсикологических исследований особенно важным является наличие воспроизводимых, экономичных и реалистичных, с точки зрения имеющегося оборудования, методик пробоподготовки биологических объектов и последующего их анализа. При анализе сложных матриц стадия подготовки образца является наиболее трудоемкой и ответственной, она должна обеспечить необходимые условия чувствительности и чистоты для последующего инструментального анализа. При этом в большинстве случаев на начальной стадии исследования биологических объектов с целью выявления токсикантов необходим скрининг.

Из инструментальных методов, применяемых в скрининге широкого круга токсикологически значимых веществ, наибольшее распространение получил метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). За счёт относительно невысокой стоимости и низких издержек на эксплуатацию оборудование для ГХ-МС включено в обязательный перечень приборной базы судебно-химических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы, химико-токсикологических лабораторий наркологической службы и токсикологических центров. Важными элементами эффективного применения данного метода в работе лабораторных подразделений являются актуальные профильные масс-спектральные библиотеки и соответствующая пробоподготовка исследуемых образцов.

Одним из перспективных вариантов пробоподготовки биологических материалов в практике судебно-химического и химико-токсикологического анализа является твердофазная экстракция (ТФЭ), позволяющая за счёт использования различных типов сорбентов осуществлять изолирование и/или очистку аналитов различной химической природы из биологических объектов. Однако, имеющиеся многочисленные работы зарубежных авторов посвященные,

как правило, частным исследованиям индивидуальных соединений или ограниченных групп веществ, не затрагивают тенденций к оптимизации условий ТФЭ для максимального расширения возможности ее применения в скрининге лекарственных и наркотических веществ. Между тем, в практической деятельности эксперта предпочтительнее использование унифицированной методики с целью поиска широкого круга токсикантов, чем использование индивидуальных методик на каждое вещество.

Следует отметить, что в экспертной практике наиболее распространенным и значимым объектом анализа, наряду с мочой, является кровь. Однако ввиду специфических свойств крови (наличие форменных элементов, белковых веществ, возможность фибринолиза и гнилостных изменений посмертной крови) данный объект является наиболее сложным для анализа. Поэтому разработка методики скрининга токсикологически значимых веществ на примере крови с использованием ТФЭ является актуальной задачей токсикологического анализа.

Из токсикологически значимых веществ в последние годы большое распространение получили синтетические каннабимиметики и синтетические наркотические анальгетики производные фентанила, имеющие статус контролируемых законодательством средств, что привело к необходимости их идентификации в биологических объектах от живых лиц и трупов. Характерной особенностью поведения этих веществ в организме человека является их практически полная биотрансформация, что свидетельствует о необходимости поиска их метаболитов. Следовательно, создание банка данных по биотрансформации и аналитическим характеристикам основных метаболитов психоактивных веществ с использованием эффективных способов пробоподготовки особенно актуально для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

Степень разработанности темы.

Ряд зарубежных авторов (Chen X.H, Wijsbeek J., Franke J.P, de Zeeuw R.A., Zweipfenning P.G. и др.) в 90-е годы 20-го века описали основную процедуру изолирования некоторых лекарственных и наркотических веществ, в основном,

основного характера с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой. Преимущественными объектами исследования были модельные смеси мочи, сыворотки и плазмы крови. Представленные работы, как правило, были направлены на исследование индивидуального вещества, либо на оптимизацию одного из показателей, например, чистоты полученного из биологического объекта экстракта. Chen X.H., Franke J.P., Ensing K., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A. (1992, 1993, 1994), Zweipfenning P.G., Wilderink A.H.C.M., Horsthuis P. (1994), Bogusz M.J. с соавторами (1996) в ряде работ исследовали возможность автоматизации процесса ТФЭ, многократного использования патронов, сравнения воспроизводимости результатов анализа с использованием газовой хроматографии с различными видами детектирования, чистоту экстрактов и др. Однако комплексные исследования, охватывающие весь массив стадий ТФЭ в приложении к скринингу, не были проведены ни за рубежом, ни в России. В связи с этим разработка научно-методологических подходов для обоснования возможности использования ТФЭ как эффективного способа пробоподготовки биожидкостей, позволяющего на этапе скрининга определять широкий спектр токсикологически значимых веществ и их метаболитов, является в настоящее время одной из актуальных проблем судебно-химического и химико-токсикологического анализа и современной фармации в целом.

Целью настоящего исследования является разработка методологических подходов к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Основные задачи исследования

1. Разработать методику скрининга токсикологически значимых веществ в крови с применением ТФЭ и ГХ-МС при помощи модельных соединений.
2. Исследовать возможность применения разработанной методики для количественного определения ряда НПВС в процедуре скрининга крови.

3. Оценить эффективность экстракции патронов для ТФЭ со смешанной фазой ряда производителей для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови.

4. Оценить эффективность применения разработанной методики в экспертной практике при исследовании крови от трупов и живых лиц.

5. Выявить основные метаболиты и предложить маркеры ряда новых синтетических каннабимиметиков (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA) в моче потребителей курительных смесей с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

6. Сравнить различные варианты пробоподготовки мочи для совместного обнаружения метаболитов тетрагидроканнабинола и синтетических каннабимиметиков при варьировании способов деконъюгирования, экстракции и дериватизации.

7. Идентифицировать основные метаболиты синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила, выделяющиеся с мочой, и предложить маркеры, доказывающие факт его употребления с использованием методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

8. Разработать научно-методологический подход к проведению скрининга лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале на основе методов ТФЭ и ГХ-МС.

Методы исследования. В качестве методов пробоподготовки биологических объектов (крови и мочи) использованы твердофазная и жидкость-жидкостная экстракция. Для анализа токсикологически значимых веществ и их метаболитов использованы газовая и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

Для оптимизации процедуры ТФЭ использован метод математического планирования эксперимента с применением многофакторного 3-х уровневого моделирования Бокса-Бенкена.

Для прогнозирования физико-химических свойств исследуемых соединений использован пакет программ "ACD/I-Lab service" (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

Математическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакетов прикладных программ STATISTICA 6.1 и MS Excel.

Научная новизна работы.

Разработана унифицированная методика скринингового исследования крови на основе комплекса научно-экспериментальных исследований с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

Впервые выявлены основные метаболиты ряда синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей; предложены маркеры для установления факта их употребления; получены и описаны физико-химические, газохроматографические и масс-спектральные характеристики их дериватов; установлено, что основные метаболиты данных каннабимиметиков выводятся с мочой в конъюгированном виде;

Впервые идентифицированы основные метаболиты и предложены маркеры ацетилфентанила в образцах посмертной мочи; изучен метаболический профиль ацетилфентанила в моче, описаны основные пути его метаболизма; получены основные аналитические характеристики различных дериватов основных метаболитов ацетилфентанила.

Разработан научно-методологический подход к скринингу токсикологически значимых веществ с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой и последующего анализа различных биологических объектов методом ГХ-МС.

Теоретическая значимость работы заключается в методологическом обосновании скрининга биологических объектов с применением твердофазной экстракции и ГХ-МС с целью поиска широкого круга токсикологически значимых веществ. Сформулированный методологический подход к процедуре скрининга биологических жидкостей позволяет использовать его как для традиционных

(жидкости, органы, ткани), так и для альтернативных (волосы, ногти) объектов судебно-химического и химико-токсикологического анализа.

В процессе изучения метаболизма нового наркотического анальгетика ацетилфентанила и синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22) и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA) выявлены пути биотрансформации данных веществ, которые могут быть использованы для прогнозирования метаболизма их гомологов и аналогов, появляющихся в нелегальном обороте.

Практическая значимость работы и внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования апробированы, признаны пригодными и внедрены в практическую деятельность судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий Республики Беларусь и Казахстана, а также экспертных учреждений РФ гг. Санкт-Петербурга, Самары, Ярославля, Новосибирска, что подтверждено 14 Актами внедрения (Приложение 3).

Приказом Председателя Государственного Комитета судебных экспертиз Республики Беларусь № 70 от 06.05.2017 г. методика скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови включена в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов ГК СЭ РБ (Приложение 3).

Материалы диссертационного исследования внедрены в учебный процесс при реализации программ специалитета по специальности 33.05.01 «Фармация», а также программ дополнительного профессионального образования по направлению подготовки «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» и «Судебно-химический и химико-токсикологический анализ биологических объектов и вещественных доказательств».

По результатам исследования ФГБУ Российским центром судебно-медицинской экспертизы Минздрава России утверждены, выпущены и рекомендованы к использованию в судебно-химическом анализе 4 Информационных письма (Приложение 4):

1. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 21 с.
2. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев. – 17 с.
3. Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 16 с.
4. Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 34 с.

Выпущена монография «Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах» (Приложение 5), где обобщены известные данные о биотрансформации новых ПАВ и приведены собственные исследования о возможных путях метаболизма ацетилфентанила, идентификации и аналитических характеристиках его метаболитов, а также идентифицированных мочевых метаболитах синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов: РВ-22, РВ-22F, FUB-РВ-22 и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина: АВ-PINACA, 5F-АВ-PINACA, АВ-SHMINACA, АВ-FUBINACA. В монографии представлены современные способы пробоподготовки биообъектов, ТФЭ в частности, обеспечивающие извлечение аналитов для их последующего аналитического обнаружения, в том числе, с использованием собственных разработанных методик.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях (2013 – 2018 гг.): I Международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» I International scientific conference АСТЕ'2013, 6 – 7 октября 2013 г., г. Москва; II Научно-практический семинар «Методические и организационно-правовые проблемы деятельности химико-токсикологических лабораторий наркологической службы», 21 – 22 октября 2014 г., ФБГУ ННЦ наркологии Минздрава России, г. Москва; II Международная научно-практическая конференция «Современная химико-токсикологическая экспертиза» II International scientific conference АСТЕ'2015, 6 – 7 октября 2015 г., г. Москва; Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы судебной медицины», 5 – 6 октября 2016 г., г. Минск (на базе центрального аппарата Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь), РБ; VIII съезд врачей клинико-лабораторной службы Республики Беларусь, 10 – 11 ноября 2016 г., г. Минск, РБ; Четвертая научно-практическая конференция по клинической токсикологии Уральского федерального округа «Острые отравления. Токсикологические, наркологические и судебно-медицинские аспекты», 19 – 21 сентября 2018 г., г. Екатеринбург.

Личный вклад автора. Результаты, представленные в работе, получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Лично автором проведены сбор и анализ литературных данных, формирование плана диссертационного исследования, систематизация результатов, их анализ, написание статей, диссертации и автореферата.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 373 страницах машинописного текста, содержит 148 рисунков и 48 таблиц, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), общих выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 424 источника, из них 353 иностранных, и 5 Приложений.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, в числе которых 1 монография, 16 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для

публикации материалов докторских диссертаций, из них 5 – в журналах, индексируемых реферативной базой SCOPUS.

Связь задач с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований Пермской государственной фармацевтической академии (номер государственной регистрации 01.9.50 007417).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно п. 4 – разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Результаты теоретических и экспериментальных исследований по разработке методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с использованием ТФЭ и ГХ-МС.

2. Результаты валидации методики количественного определения некоторых НПВС в крови при проведении процедуры скрининга.

3. Рекомендации по выбору оптимальных с позиций эффективности экстракции и экономической составляющей патронов для ТФЭ со смешанной фазой разных производителей.

4. Результаты экспериментального подтверждения эффективности разработанной методики, отражающие спектр выявленных лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов в реальных образцах посмертной крови и крови от живых лиц.

5. Результаты использования ТФЭ и ГХ-МС для выявления основных метаболитов и маркеров синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA в моче потребителей курительных смесей.

6. Результаты исследования нескольких методов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации для совместного выявления маркеров природных каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков.

7. Метаболический профиль представителя наркотических анальгетиков ацетилфентанила в реальных образцах мочи, газо-хроматографические и масс-спектральные характеристики основных метаболитов и маркеров данного вещества, доказывающих факты его употребления.

8. Научно-методологический подход к проведению скрининга лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале на основе методов ТФЭ и ГХ-МС.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность и признательность заведующему судебно-химическим отделением Пермского краевого бюро судебно-медицинской экспертизы, к.х.н. Катаеву С.С., заведующему судебно-химическим отделением Челябинского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, к.х.н. Мелентьеву А.Б. за сотрудничество, понимание и помощь, оказанную на всех этапах работы над диссертацией.

Автор благодарит научного консультанта диссертационного исследования судебного эксперта-химика Московского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, д.х.н. Григорьева А.М. за профессионализм и поддержку при подготовке диссертации к защите.

ГЛАВА 1. АНАЛИЗ СПОСОБОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ТОКСИКАНТОВ (обзор литературы)

1.1 Твердофазная экстракция как метод пробоподготовки к анализу: основные стадии, области применения, преимущества использования

Метод ТФЭ в настоящее время находит все более частое применение, о чем свидетельствует диаграмма динамики роста ссылок на его использование по репрезентативной базе данных ресурса PubMed [1] (рисунок 1.1).

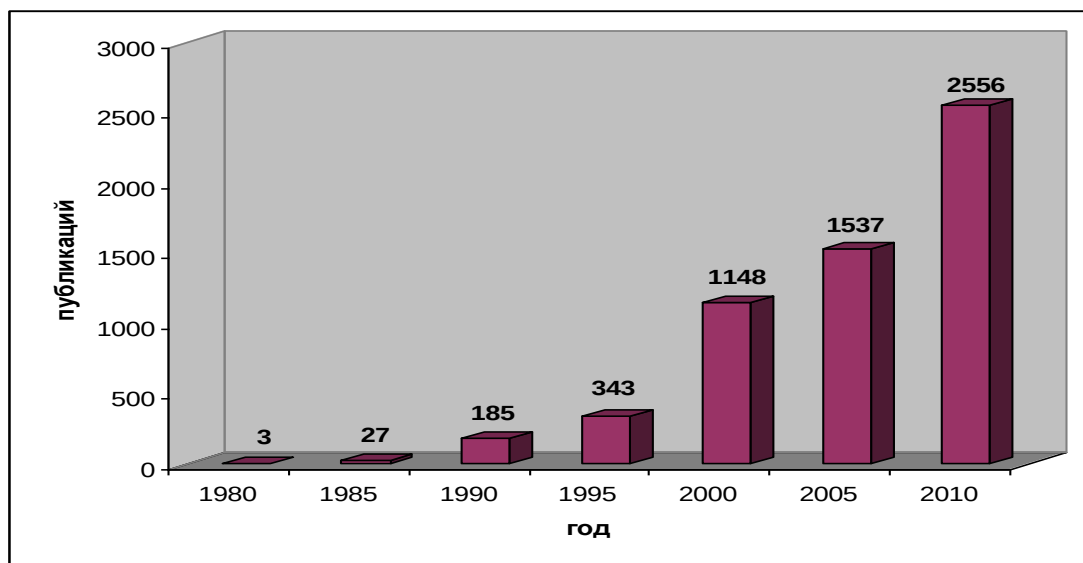


Рисунок 1.1 – Ссылки на использование метода ТФЭ в периодической медицинской литературе ресурса PubMed [1]

Твердофазная экстракция — это метод изолирования, очистки и концентрирования веществ, получивший широкое распространение в аналитической химии. В основе метода ТФЭ лежит принцип обратимой сорбции аналитов из матрицы на твердом сорбенте с последующим их элюированием

подходящим растворителем. При правильном подборе условий метод имеет ряд преимуществ перед традиционной жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ).

Основными целями метода ТФЭ являются:

1. перевод целевых компонентов пробы в другую, более простую матрицу;
2. очистка пробы от нежелательных примесей;
3. концентрирование компонентов пробы для облегчения дальнейших исследований.

Процедура ТФЭ, как правило, состоит из следующих основных этапов: 1) промывка слоя сорбента для элюирования возможных загрязнений; 2) кондиционирование; 3) внесение пробы; 4) промывка слоя сорбента с нанесенными на него соединениями, при элюировании части матричных компонентов; 5) сушка; 6) смыв (элюирование) целевых соединений. Однако, в зависимости от конкретных задач, поставленных перед экспертом, не все они могут быть задействованы, либо могут присутствовать дополнительные стадии. Рассмотрим наиболее часто встречающиеся стадии:

1. Промывку (активацию) слоя сорбента проводят растворителями, обладающими наибольшей элюирующей силой и, при этом, совместимых с растворителями, используемыми на следующей стадии. Для сорбентов с гидрофобным характером фазы обычно применяют метанол (MeOH) или ацетонитрил (ACN); это необходимо для очистки поверхности (слоя) сорбента и удаления возможных загрязнителей, которые могут помешать анализу.
2. Кондиционирование, уравнивание. Кондиционирование адсорбента проводят растворителями, близкими по свойствам растворителю пробы при учете солевого фона и pH. Так, если проба является водной, то картридж кондиционируют водой. При этом удаляется избыток растворителя, применяемый на предыдущей стадии и мешающий процессу сорбции. При использовании ионообменных сорбентов применяют буферные растворы для создания оптимального pH для взаимодействия сорбента и аналита. Отмечено, что выход образца на сухой колонке значительно снижается. Для ТФЭ на некоторых

современных полимерных сорбентах этапы кондиционирования и уравнивания можно исключить [2, 3].

3. Внесение пробы. Под внесением пробы понимают ее пропускание через слой сорбента. Крайне важным моментом является скорость прохождения пробы. Высокая скорость процесса может приводить к потере целевых соединений. При правильном подборе условий содержащиеся в матрице аналиты будут удерживаться на сорбенте. Матрица образца может содержать мешающие компоненты, часть которых пройдет через слой сорбента, а часть свяжется с материалом сорбента. При этом аналиты будут не только сконцентрированы, но и в значительной мере очищены от мешающих примесей [4].

Внесению пробы часто предшествуют процедуры ее подготовки, например, добавление внутренних стандартов, гидролиз конъюгатов, и другие, такие как центрифугирование, обработка ультразвуком (УЗ), осаждение, разбавление вязких матриц водой или буфером, чтобы обеспечить необходимый уровень pH для оптимизации взаимодействий с сорбентом.

4. Промывка и сушка. Целью этого этапа является удаление части мешающих компонентов. На стадии пропускания пробы происходит ее начальная очистка, поскольку только часть загрязняющих компонентов остается на сорбенте вместе с целевыми соединениями. Другая, слабоудерживающаяся часть компонентов матрицы проходит через слой сорбента в слив. Для усиления эффекта предварительной очистки проводят промывку картриджа. Как правило, для промывки используют тот же растворитель, что и для кондиционирования, т.е. при ТФЭ из водных образцов картридж промывают водой [2]. Оптимальным подходом для промывки является поиск растворителя (их смеси), которые будут смывать максимум мешающих веществ из слоя сорбента без потери аналита. Максимально полное удаление мешающих компонентов при сохранении оптимальной степени извлечения целевого соединения является основой успешной разработки методик ТФЭ [3].

Для аналитов, удерживающихся по ионообменному механизму, используют органические промывочные растворители, чтобы удалить примеси, удерживаемые

гидрофобными взаимодействиями. Если аналит также способен к гидрофобному связыванию, удаление полярных примесей, похожих на аналит, при использовании водных или водно-органических промывочных растворителей, может нарушить его связывание по ионному механизму [5]. При обнаружении потерь аналита необходимо уменьшить количество промывочного растворителя, либо его элюирующую силу.

Если при последующих стадиях пробоподготовки необходимо минимизировать присутствие промывочных растворителей в конечном элюате, то промывку завершают сушкой патрона. Для этого через патрон пропускают поток азота (если соединения окисляются на воздухе) или воздуха [4]. Сушка неприемлема, если целевые соединения летучи. Недостатком сушки является длительность процесса, который может занимать до 15 – 20 минут [2].

5. Элюирование. К элюенту (растворителю или смеси для элюирования) предъявляется ряд требований, главным из которых является следующее: он должен обеспечивать количественное элюирование интересующих компонентов с сорбента. Смыв аналитов стараются проводить как можно меньшим объемом элюента, позволяющим полностью элюировать аналиты. Элюент, по возможности, если это необходимо в ходе дальнейшего, например, газохроматографического анализа, должен обладать достаточной летучестью с тем, чтобы можно было его испарить частично (для концентрирования элюата) или полностью с целью растворения сухого остатка элюата другим растворителем или, при необходимости, хранить полученный экстракт в сухом виде. Упаривание элюента необходимо проводить в максимально мягких условиях, учитывая, что среди аналитов могут присутствовать вещества летучие, например, амфетамин [6] или подверженные термической деградации.

На этой стадии также иногда делают добавки к образцу, например, внутреннего стандарта, стабилизатора и т.п. [4].

В случае если элюат предполагается вводить в жидкостной хроматограф напрямую, то элюент должен быть растворим в подвижной фазе или являться одним из ее компонентов. Таким образом, на стадии элюирования также

происходит некоторая очистка пробы, поскольку часть матричных соединений элюируется вместе с аналитом. Добиться полного элюирования всех компонентов пробы, как правило, невозможно, и часть матричных соединений остается на сорбенте картриджа [2].

ТФЭ, являясь перспективным методом изолирования и очистки, имея все оговоренные выше преимущества перед традиционными методами изолирования, нашла применение в различных областях жизнедеятельности человека, связанных с анализом незначительных/следовых количеств веществ в разнообразных матрицах (чаще жидких образцах, либо твердых, которые предварительно подверглись экстракции растворителем), например:

- в пищевой промышленности; в анализе овощей и фруктов на наличие пестицидов, природных загрязнителей (контаминантов) в зерне, кормах, продуктах питания; обнаружении в яйцах, мясе препаратов для лечения животных и др. [7–11];
- в производстве вина и мониторинге его качества при хранении, винном уксусе [12–15];
- в области экологического контроля и обеспечения соблюдения нормативов; в анализе образцов почвы, глины, отложений, осадков и твердых отходов на содержание тяжелых металлов, пестицидов, дизельного топлива, всевозможных веществ, в том числе, фармацевтических препаратов, эстрогенов, УФ-фильтров, используемых в косметических продуктах; микроорганизмов в природной, морской, питьевой воде и сточных водах [16–26];
- обнаружение боевых отравляющих веществ в воде [27];
- в биофармацевтике; при производстве фармацевтических препаратов; в доклинических исследованиях, исследованиях фармакокинетики ЛП, дженериков, их деградации [28] и при очистке от составляющих ингредиентов, например, в кремах [29];
- в анализе лекарственного растительного сырья [30–32], образцов кофе [33], черного чая [34];

- при судебно-химических, химико-токсикологических исследованиях разнообразных вещественных доказательств и биологических объектов на наличие широкого спектра преследуемых законодательством веществ, ЛП и их метаболитов;
- при допинговом анализе. В современном мире, когда спортивные достижения зависят от результатов анализа на содержание запрещенных препаратов, крайне важны максимально достоверные результаты;
- при лечении отравлений в медицинских учреждениях и мониторинге выведения токсикантов.

Многие исследователи при сравнении методов ТФЭ и ЖЖЭ высказали мнение о том, что ТФЭ является прекрасной альтернативой традиционной ЖЖЭ, из преимуществ они отметили [35–41]:

- использование малых количеств образца, что особенно важно в ХТА и СХА, где известна проблема нехватки биологического образца и невозможности его пополнения;
- экономия летучих и опасных органических растворителей является очень актуальной проблемой, т.к. на современном этапе повышения «экологичности» исследований анализ идет по пути минимизации, в том числе, расхода растворителей;
- сокращение времени экстракции образца при использовании серийных анализов, поскольку скорость и экономическая эффективность являются ключевыми проблемами в аналитической токсикологии;
- селективность и специфичность, которых можно добиться при направленной пробоподготовке и правильном подборе фазы сорбента;
- возможность разделения аналитов на одном патроне, используя различные элюирующие растворители;
- увеличение «жизни» колонок в газовой и жидкостной хроматографии в силу получения в результате ТФЭ более чистых, чем при ЖЖЭ, экстрактов;
- улучшение вида хроматограмм: четкость пиков, снижение фоновых помех;

- высокая степень извлечения аналитов;
- отличная воспроизводимость;
- легкость в обращении;
- возможность оптимизации;
- возможность автоматизации процесса.

После длинного латентного периода, когда ТФЭ уже получила теоретическое обоснование, но на практике применялась редко, технологические прорывы в производстве сорбентов и устройств для их применения дали толчок для роста использования ТФЭ.

В настоящее время на рынке хроматографического оборудования широко представлены различные инструменты для ТФЭ иностранных фирм-производителей - J. T. Baker, Macherey-Nagel, Varian, Waters, Phenomenex, Thermo, Agilent и др. [42–50].

1.2 Характеристика патронов и сорбентов, используемых для твердофазной экстракции

Современные патроны (картриджи) для ТФЭ представлены большим числом модификаций двух основных типов: патрона и диска, отличающихся диаметром и толщиной слоя сорбента. Мелкие частицы сорбента (до 60 мкм) закреплены в диске волокнообразующим наполнителем и предназначены для скоростной экстракции. Размер частиц в патроне обычно 60 мкм и более. По сравнению с дисками патроны обладают большей сорбционной емкостью, что играет решающую роль в случае концентрирования следовых количеств аналитов, сильно различающихся по своему сродству к сорбенту, из больших объемов сложных многокомпонентных образцов. Диски удобны в работе с небольшими объемами вязких растворов, например, при концентрировании аналитов из плазмы крови, которую из шприца пропускают через картридж вручную с невысокой скоростью [51].

Для производства сорбентов, применяемых для ТФЭ, используют различные материалы на основе диоксида кремния, углерода, окиси алюминия, полимера стирол-дивинилбензола.

По природе используемого материала сорбенты делят:

1. Сорбенты неорганической природы. Представляют собой полярные сорбенты, обычно используемые для выделения соединений из экстрактов неполярного растворителя. Режим разделения – нормально-фазовый [42].

1.1 на основе оксида алюминия (глинозем). Продукты ALUMINA доступны в кислом (А), нейтральном (N) и основном (В) вариантах. Небольшой размер частиц (25 мкм) обеспечивает высокую эффективность даже в случае использования небольшой массы сорбента. Материал позиционируется более стабильным при высоком рН в сравнении с обычным силикагелем [43];

1.2 на основе силикагеля. Матрица частицы с силикагелем состоит из атомов кремния, соединенных с атомами кислорода силоксановыми связями (кремний-кислород-кремний). Диатомовая земля, являясь естественным источником кремнезема, была использована в ранних формах выбора метода очистки (п. 1.4.1). Все оксиды кремния, используемые в современной ТФЭ, являются синтетическими и пористыми за счет чего имеют большую площадь поверхности и способность к адсорбции. Чистый силикагель считается самым полярным сорбентом для ТФЭ. Его относят к нормально-фазовым сорбентам;

1.3 Florisil – это силикагель с магнезией. Обладает сильной полярностью и подходит для неполярных образцов. Имеет более крупный размер частиц (200 мкм), обеспечивает высокую скорость потока и может быть альтернативой силикагелю при использовании вязкого образца [44–46].

Дешевизна неорганических полярных адсорбентов способствует их применению для адсорбционной очистки проб при проведении рутинных анализов.

2. Сорбенты на основе углерода – активированные угли/графитизированные сажи (Carbon, ENVI-Carb). Относятся к гидрофобным и универсальным сорбентам с большой удельной поверхностью. Их считают

лучшими адсорбентами из водных и водно-органических сред в сравнении с остальными типами адсорбционных материалов, однако отмечен их существенный недостаток – десорбция аналитов с них затруднена, что ограничивает их интенсивное применение [2].

Существуют продукты на основе графитированных углей с кислотной и основной функциональностью ENVICarb-II/PSA и ENVICarb-II/NH₂ (Supelco), Bond Elut Carbon/PSA и Bond Elut Carbon/NH₂ (Agilent) [44], где используются гидрофобный и ионообменный механизмы удерживания аналитов.

В качестве нового материала для ТФЭ на основе углерода Zhao H. с соавторами использовали многослойные углеродные нанотрубки (PMWCNT) [52], которые представляют собой бесшовный цилиндр, полученный при свертывании плоской гексагональной сетки графита. Нанотрубки позиционируются, как наилучший наномодификатор материалов с уникальными физическими свойствами: наноразмерностью и химической универсальностью [53].

3. Полимерные сорбенты на основе стирол-дивинилбензола различной степени пористости и сшивки. Синтетические полимеры включают полистирол-дивинилбензол (PSDVB), полистирол-дивинилпирролидон (PSPVP), диметилакрилоксиметилнафталин-дивинилбензол (DMN-DVB) и смеси этих полимеров для получения желаемых характеристик [5].

Стирол-дивинилбензольный сополимер (SDB) представляет собой гидрофобную смолу, которая может сорбировать многие водорастворимые органические соединения, из-за его высокой площади поверхности и неионного характера, главным образом, силами Ван-дер-Ваальса, но также могут играть роль гидрофобные связи и диполь-дипольные взаимодействия. В последующем появились, так называемые, сверхсшитые полистиролы, отличительной особенностью которых является очень высокая удельная площадь поверхности и, соответственно, высокая способность к сорбции.

3.1 Гидрофобные. В настоящее время неполярный SDB в качестве сорбента для ТФЭ широко представлен производителями хроматографического оборудования: Bond Elut ENV, Bond Elut LMS, Bond Elut PPL, Supelclean ENVI-

Chromp, Strata SDB-L с различными размерами (от 75 до 160 мкм) и сферической формой частиц, пор (от 110 до 450 Å), площадью поверхности (от 500 до 900 м²/г).

Существует более гидрофильный стирол-дивинилбензол SDB-OH, который находит свое применение в патронах Bond Elut Plexa, Isolute ENV, имеющих площадь поверхности 1200 и 1000-1100 м²/г, соответственно. Эти сорбенты, кроме сорбционных микро и мезо-пор, содержат еще и транспортные макропоры.

Сверхсшитую полистирольную природу имеет и сорбент стиролдивинилбензол – этилвинилбензол (SDB-EVB), входит в состав патронов LiChrolut EN (Merck). Площадь его поверхности составляет 1200-1500 м²/г.

Сорбент винилпирролидон-дивинилбензол (VPDB) в составе патронов Oasis HLB (Waters) содержит до 30 % звеньев поливинилпирролидона в SDB-матрице и является более гидрофильным, чем SDB [2].

В продукте Focus производителями заявлен полярный трифункциональный SDB - сорбент на основе амида (донора водородной связи) с усиленной полярностью и способностью к удерживанию основных аналитов [44].

3.2 Комбинированные полимерные сорбенты на основе SDB или VPDB со смешанной обращенно-фазовой и катионообменной (SCX) / анионообменной (SAX) функциональностью, содержатся например, в StrataXC (SDB/SCX); Plexa PCX (SDB-OH/SCX), Oasis MCX (VPDB/SCX); Oasis MAX (VPDB/SAX), Plexa PAX (SDB-OH/SAX) [43, 47].

В качестве комбинированного сополимера производителем заявлен сорбент NEXUS с бимодальной пористостью (100/450 Å) и площадью поверхности 575 м²/г. Большой размер частиц (70 мкм) оптимален для экстракции из проб с высокой вязкостью (лошадиная моча). NEXUS WCX позиционируется продуктом для анализа аналитов с четвертичными аммонийными группами и анаболических стероидов [43].

4. Сорбенты на основе силикагеля с привитыми фазами. Такого рода фазы изготавливаются в ходе реакции сшивки углеродных цепей и скелета кремнезема посредством образования очень стабильной силильной эфирной связи. Силанольные группы, находящиеся на поверхности силикагеля, потенциально

являются точками крепления различных химических групп на поверхности силикагеля. Вводя дополнительные соединения в процесс синтеза силикагеля, можно создать объемно-модифицированные кремнеземы.

4.1 Гидрофобные, состоящие из скелета кремнезема, связанного с углеводородными цепями. Имеют в своем составе связанную с обращенной фазой на основе силикагеля функциональную группу: C1 (метил), C2 (этил), C4 (бутил), C6 (гексил), C8 (октил), C18 (октадецил), C6H11 (циклогексил), C6H5 (фенил). Фаза C18 является самым гидрофобным сорбентом на основе силикагеля и, благодаря высокой степени удерживания неполярных соединений из водных образцов, наиболее широко используемой. Фазы с C1, C2 и др. являются более селективными, чем фаза C18, например, наличие фенильного радикала в качестве привитой фазы повышает удерживание аналитов с сопряженным или ароматическим кольцом, благодаря взаимодействию между электронными облаками колец сорбента и связываемого аналита.

Существует разновидность Unendcapped-сорбентов, имеющих остаточные гидроксильные группы, придающие сорбентам некоторые гидрофильные свойства, например, фаза C18 OH (рисунок 1.2). Для уменьшения полярности эти силанольные группы блокируют триметилсилильными группировками с образованием более гидрофобных (Endcapped) сорбентов [48] (рисунок 1.2).

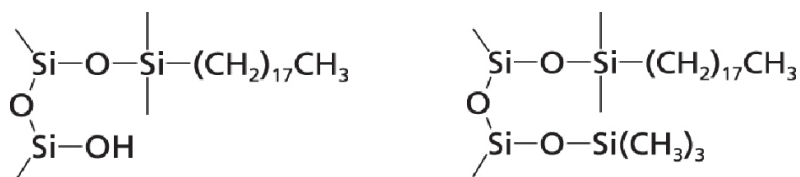


Рисунок 1.2 – Unendcapped (справа) и Endcapped сорбенты (слева)

4.2 Гидрофильные сорбенты, состоят из скелета кремнезема, связанного с углеродными цепями, содержащими полярные функциональные группы: амины, гидроксилы и карбонилы. Соединения удерживаются посредством полярных взаимодействий, в том числе водородной связи, π - π или диполь-дипольного взаимодействия [48] (рисунок 1.3).

Рисунок 1.3 – Полярная диольная фаза на основе силикагеля

4.3 Ионообменные. Ионообменный сорбент состоит из кремнезема, на поверхности которого привиты остатки с ионогенными функциональными группами катионного или анионного характера. Ионнообменные взаимодействия происходят между сорбентом, поверхность которого несет определенный заряд и противоположно заряженным ионом аналита. Ионообменные реакции обычно обратимы и зависят от pH, и от солевого фона среды. Величиной pH и ионным фоном подвижной фазы манипулируют таким образом, чтобы сделать ионогенные группы сорбента и аналита максимально доступными для взаимодействий при сорбции. Ионообменные взаимодействия более сильны относительно гидрофобных и прочнее удерживают аналиты.

Примером ионообменных сорбентов могут служить сорбенты с привитыми анионообменными (амино- (NH_2), триметиламино- (SAX), диэтиламино- (PSA)) и катионнообменными (карбокси- (CBA), пропансульфоокислота (PRS), бензолсульфоокислота (SCX)) группами [48] (рисунок 1.4).

NH ₂	SAX	PSA
CBA	PRS	SCX

Рисунок 1.4 – Ионообменные сорбенты на основе силикагеля с привитыми группами: NH₂, SAX, PSA – анионообменные, CBA, PRS, SCX – катионнообменные

4.4 Смешанные сорбенты. Состоят из матрицы кремнезема чаще всего с двумя типами привитых цепей: гидрофобной углеродной цепи (C8 или C18) и ионно-обменной или полярной группировки (HCX-3, HCX-5, Screen-C, Screen-A, Certify I, Certify II, Evidex, Drug, Verify-CX и др.). Поэтому смешанные сорбенты имеют как гидрофобный, так и ионообменный механизм удерживания и могут быть применены к кислым, нейтральным и основным анализам при варьировании pH. Такие сорбенты называют еще бифункциональными [48] (рисунок 1.5).

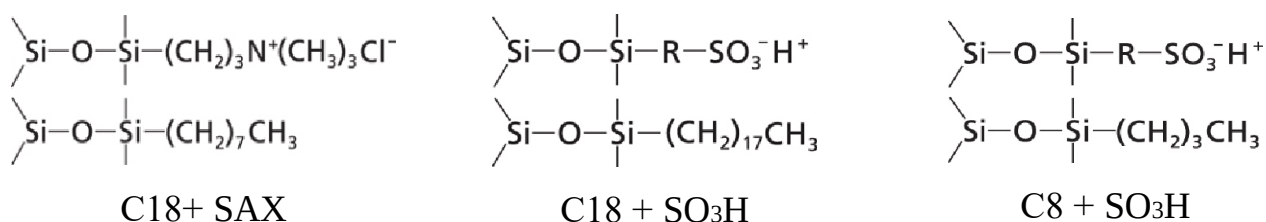


Рисунок 1.5 – Смешанные сорбенты с гидрофобной C18 и триметиламиногруппой (слева), C18 и сульфогруппой (в центре), C8 и сульфогруппой (справа)

Существуют смешанные сорбенты с анионными и катионными группами, например, Strata ABW, в которых представлены сильный катионит (бензолсульфокислота) и анионит (пропиламин) [49].

Представлен мультимодальный патрон ISOLUTE® Multimode, содержащий смешанный сорбент с тремя функциональностями: обращено-фазовым (C18), сильным катионо - и анионообменником [48] (рисунок 1.6).

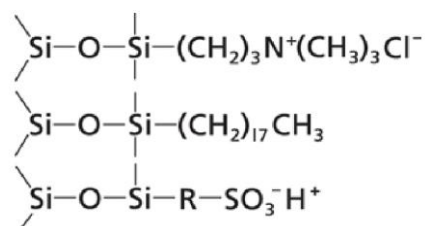


Рисунок 1.6 – Трехфункциональный сорбент патрона ISOLUTE® Multimode

В отношении многофункциональных сорбентов существует мнение, что создание фаз с несколькими функциональными группами может приводить к проблеме нейтрализации действия их друг другом [5].

Смешанные (бинарные) фазы патронов для ТФЭ представляют собой продукт совместной прививки соединений с разными – гидрофобными и ионообменными функциональными группами к силикагелевой матрице, а не просто смесь нескольких разнородных сорбентов. Поэтому они обеспечивают превосходную очистку, экстракцию и воспроизводимость состава образца. Особенности таких патронов следующие:

- привитый слой сорбента содержит как неполярную фазу (C8), так и бензолсульфокислоту (SCX) в качестве катионообменника;
- разработаны для лучшей селективности/очистки образца при выделении основных соединений из биологических жидкостей;
- двойные механизмы удерживания расширяют возможности для сорбции ряда нейтральных, основных, кислых и цвиттер-ионных соединений;
- имеют большую ионообменную емкость для выделения полярных, основных и цвиттер-ионных соединений;
- могут использоваться для фракционирования основных/цвиттер-ионных веществ от кислотных и нейтральных соединений.

Механизм удерживания заключается во взаимодействии ионизированных функциональных групп аналитов с противоположно заряженными функциональными группами сорбента с образованием стабильных ионных пар (рисунок 1.7).

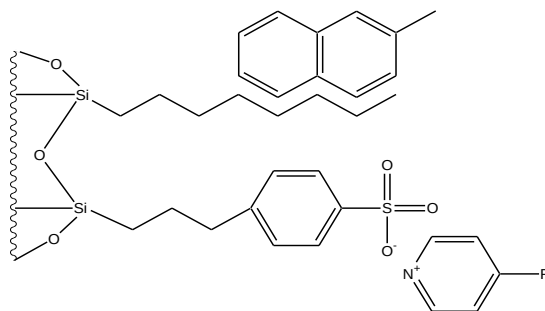


Рисунок 1.7 – Смешанный режим взаимодействия привитых к силикагелю фаз C8 и бензолсульфокислоты с аналитами

Для того чтобы происходило ионообменное удерживание, функциональные группы как аналита, так и сорбента должны быть в ионизированной форме. Это осуществляется с помощью строгого контроля pH образцов. Для аналитов основного характера pH следует отрегулировать, как минимум, на 2 единицы pH ниже pK_a молекулы. Для аналитов кислотного характера pH следует доводить, по меньшей мере, на 2 единицы pH выше pK_a молекулы. При элюировании поступают противоположным образом. Регулируя, таким образом, pH элюента, можно эффективно нейтрализовать одну или обе функциональные группы, нарушающие электростатическое взаимодействие, что позволяет осуществить элюцию [50].

В зависимости от вида сорбента и характера аналитов, механизм разделения на патроне для твердофазной экстракции различен. В ТФЭ используются три основных режима разделения: обращённо-фазовый (гидрофобный, неполярный), нормально – фазовый (полярный), ионный обмен.

В целом, производителями хроматографического оборудования сорбенты смешанного типа в составе инструментов для ТФЭ представлены очень широко, что говорит об их актуальности и частоте применения, в том числе, при токсикологических исследованиях.

Обзор публикаций по проведению подготовки проб разнообразных объектов с использованием различных видов сорбентов для твердофазной экстракции представлен в таблице «Использование ТФЭ для анализа различных аналитов в биоматериале при химико-токсикологических, судебно-химических, фармакокинетических исследованиях, допинг-контроле и пр.» Приложения 1.

ТФЭ показала большую гибкость в разделении многих аналитов из разных матриц. Наиболее распространенными из биологических матриц являются моча, сыворотка, плазма крови, волосы (таблица Приложения 1).

1.3 Особенности крови и мочи как объектов исследования в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе

Цельная кровь является сложным объектом для исследования из-за содержания в ней клеток и белковых веществ. Анализ литературных данных подтверждает высказывания исследователей относительно редкого использования цельной крови в качестве объекта анализа токсикантов методом ТФЭ по причине наличия эритроцитов, которые, как правило, блокируют патрон ТФЭ [41, 54]. Также имеет место проблема связывания определяемых веществ белковыми фракциями и клетками крови. Многие препараты присутствуют внутри клеток крови и/или связаны с ними [55]. Непосредственное внесение крови на колонку ТФЭ может приводить к низкому и/или невоспроизводимому выходу веществ, поэтому перед поступлением в колонку необходимы дополнительные манипуляции с кровью [6].

Еще более сложным объектом является трупная (фибринолизированная, утратившая способность к свертыванию), она часто гемолизована, нередко имеют место гнилостные изменения, что так же значительно усложняет процесс анализа. С этим связано ограниченное количество работ по применению ТФЭ в скрининге НС и ЛП для цельной крови.

Однако в экспертной практике кровь является чаще всего встречающимся объектом. Следует отметить, что 200,0 мл крови, в соответствии с п.73.2. Приказа 346н [56] входит в комплекс биологических объектов, который направляют на анализ при подозрении на отравление ядовитым веществом. Кровь является также образцом для забора у живых лиц для направления на ХТИ с целью определения веществ, вызвавших опьянение [57]. Поэтому, несмотря на сложность обращения с кровью, разработка методик исследования крови является чрезвычайно актуальной задачей СХА и ХТА.

Моча является наиболее доступным биологическим объектом, одним из ее преимуществ, как правило, является возможность отбора пробы в достаточном для исследования объеме. Она содержит небольшое количество белковых

компонентов, что облегчает выделение и анализ исследуемых веществ. Концентрация анализируемых веществ в моче, как правило, выше, чем в других биологических объектах, кроме того, в моче наряду с нативным соединением выявляются и продукты его метаболизма, что повышает надежность идентификации веществ и увеличивает время, в течение которого возможно установить факт приема ПАВ. Моча является наиболее широко используемой матрицей. Входит в комплекс объектов для анализа при судебно-химических исследованиях [56]. Также является необходимым объектом от живых лиц для направления на ХТИ с целью определения средств (веществ) или их метаболитов, вызвавших опьянение [57].

Многие ксенобиотики образуют конъюгаты, которые выводятся с мочой, поэтому крайне важной, часто обязательной стадией пробоподготовки мочи является та или иная форма деконъюгации, на практике осуществляемая в виде кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза [58]. Выбор того или иного вида гидролиза зависит от характера связи в структуре конъюгата и имеет свои особенности.

1.4 Анализ публикаций по проведению пробоподготовки биологических объектов методом твердофазной экстракции с использованием различных видов сорбентов

До появления ТФЭ традиционная методика исследования образцов в практике токсикологического анализа включала в себя ЖЖЭ. Хотя ЖЖЭ является подходящей техникой для большинства случаев изолирования, недостатки ее, например, матричное влияние, образование эмульсий, использование больших объемов опасных растворителей и длительность привели к идее использования ТФЭ, которая может преодолеть некоторые недостатки ЖЖЭ. ТФЭ, в силу разработки новых перспективных сорбентов, стала динамично развивающимся подходом к изолированию в токсикологическом анализе [6].

В таблице «Использование ТФЭ для анализа различных аналитов в биоматериале при химико-токсикологических, судебно-химических, фармакокинетических исследованиях, допинг-контроле и пр.» Приложения 1 представлена подборка публикаций (без претензий на полноту охвата в силу широчайшего использования ТФЭ зарубежными исследователями) с применением разного рода инструментов для ТФЭ при изолировании ряда лекарственных, наркотических, биологически активных веществ из всевозможных матриц, а также очистки полученных извлечений [35, 37, 41, 52, 54, 59–240]. Показано множество публикаций, где используются различные патроны для ТФЭ, их сочетание, сравнение между собой и традиционной ЖЖЭ. Характеристика применяемых сорбентов рассмотрена ранее в п. 1.2. Публикации работ, где в качестве объекта исследования используется кровь, будут рассмотрены в п. 1.4.1 – 1.4.3.

Анализ литературных данных показал, что использование в анализе ТФЭ шло в ногу с появлением на рынке тех или иных экстракционных носителей. Например, первыми опробованными для выделения различных лекарственных и биологически активных соединений из различных матриц были диатомовая земля и смолы Amberlite XAD.

1.4.1 Использование диатомовой земли

Использование диатомовой земли является промежуточной процедурой между ЖЖЭ и ТФЭ. Ее еще называют ЖЖЭ на твердой фазе (SLE). Она включает поглощение водной фазы на диатомовой земле, пористом адсорбирующем материале, химически неактивном и инертном, который выступает в качестве носителя для водной фазы. Регулируя pH, можно элюировать кислотные, нейтральные и основные соединения. Водный образец поглощается на колонке, заполненной сухой диатомовой землей. Это обеспечивает большую поверхность для разделения в элюирующий растворитель, который протекает через иммобилизованный образец под действием силы тяжести, элюируя аналиты. При

элюировании с помощью органических растворителей липофильные вещества извлекаются из водной фазы, которая остается на колонке. В качестве элюирующего раствора могут быть все растворы, используемые при ЖЖЭ, например, эфир, этилацетат (ЭА), хлороформ или их смеси: дихлорметан – изопропанол (ИПС) (85:15) и т.д. Основное достоинство в отличие от ЖЖЭ в том, что полученный элюат не содержит эмульсий [59, 102]. Однако в этом методе так же, как в ЖЖЭ, сохраняются большие объемы (опасных) органических растворителей. Например, для предварительной промывки колонки в работе [114] используется по 320 мл метанола и дихлорметана. Для целей систематического токсикологического анализа при SLE, как правило, используют две колонки: одну для кислотных и нейтральных веществ, вторую – для нейтральных и основных веществ.

Авторы в работе [59] при исследовании 40 проб мочи (сыворотки и крови, с гидролизом и без) сравнили экстракцию кислотных и основных ЛП на колонках Extrelut® и Amberlite XAD-2 и сделали вывод о примерно одинаковых выходах веществ, получении более чистых экстрактов, экономии времени и улучшении показателей при ТСХ относительно классической ЖЖЭ. Lillsunde P. и Korte T. [110] описали процедуру скрининга 300 ЛП и метаболитов в моче с экстракцией при pH 8-9 на колонках Chem Elut и специальные процедуры для бупренорфина, фенциклидина (РСР), бензоилэкгонина (БЭ) и др., в том числе, экстракцию конъюгатов (бенздиазепины, морфин, ТГК-СООН) после кислотного или ферментативного гидролиза.

Anderson W.H. и Fuller D.C. [92] при изолировании слабокислых и нейтральных веществ (в одну стадию) из цельной крови отметили чистоту полученных экстрактов, особенно в отношении липидов, и рекомендовали метод для других объектов: мочи и гомогенатов тканей. Logan B.K. и Stafford D.T. в работе [102] при изучении влияния pH, типа, объема растворителя на экстракционные выходы и чистоту экстрактов из образцов посмертной крови, сделали вывод в пользу использования колонок Extrelut, а не ЖЖЭ.

Martínez M.A. с соавт. в ряде работ при использовании ГХ-АФД [195, 200, 201] сравнивали патроны Chem Elut (при pH 9) с Bond Elut Certify (C8 + SCX) с точки зрения выхода ряда трициклических антидепрессантов, а также препаратов, применяющихся в психиатрической практике, из цельной крови, чистоты полученных экстрактов, чувствительности, точности и меньшего потребления растворителя. Вывод был сделан в пользу патронов со смешанной фазой в процедуре систематического токсикологического анализа.

1.4.2 Применение стирол-дивинилбензольной смолы и ее производных

В процессе адсорбции гидрофобная часть молекулы предпочтительно адсорбируется на поверхности смолы, в то время как гидрофильная часть молекулы остается ориентированной в водную фазу. Затем происходит элюирование адсорбированного вещества выбранными органическими растворителями.

Отмечено, что смола SDB особенно интересна для анализа образцов мочи, поскольку могут быть выделены сульфатные и глюкуронидные конъюгаты [6]. Для колонок с ХАД-2 отмечены хорошие выходы амфотерных и основных соединений [77]. При сравнении шести колонок для ТФЭ (Sep-pak C18, Sep-pak silica, Clin-Elut, Bond-Elut C18, Bond-Elut CN, XAD-2) при экстракции 10 различных ЛП из водных образцов и человеческой плазмы в силу лучших показателей выходов и воспроизводимости для большинства аналитов выбор сделан в пользу картриджей с фазой C18.

Большинство работ в качестве объекта исследования использует мочу, однако описано использование смол Amberlite XAD для выделения ЛП из крови при их скрининге в судебной и клинической токсикологии без предварительного осаждения белков. Bogusz M. с соавт. для систематического токсикологического анализа аутопсийной крови, содержащей 19 из наиболее распространенных ЛП в случаях смертельного и не смертельного отравления, использовали нейлоновые мешочки, содержащие 2 г смолы Amberlite XAD-2. Сделан вывод о чистоте

элюатов, достаточной для ГХ и УФ-СФ, а также, что используемая процедура оказалась более удобной, чем извлечение колонками XAD-2. Данный метод с последующим дифференциальным элюированием авторы использовали в течение 1,5 лет в рутинном анализе [63].

Koves E.M. с соавт. проведено определение лоразепама [100], кокаина и БЭ в крови методом ГХ-МС с использованием смолы Amberlite XAD-2. Сообщается о хорошем выходе (85 %) и линейности полученных результатов [135]. В 1995 году Koves E.M. опубликовано исследование 272 токсикологически значимых препаратов на предмет пригодности изократической ВЭЖХ-ДАД (на различных колонках) в рамках токсикологического скрининга и количественного определения из образцов посмертной крови. Экстракты веществ кислотного характера получали с использованием Amberlite XAD-2, основного характера – ЖЖЭ [136].

Inoue H. с соавт. описан метод определения БДА в цельной крови с использованием ТФЭ и ГХ-МС. 19 БДА и два тиенотриазепина были исследованы в цельной крови на патронах для ТФЭ Oasis HLB (гидрофильно-липофильный сополимер). Пределы обнаружения варьировались от 0,2 до 20 нг/мл крови [176].

Lensmeyer G.L. и Poquette M.A. при рутинном терапевтическом мониторинге иммуносупрессора такролимус использовали для его экстракции из цельной крови дисковые картриджи Empore™SDB-XC, содержащие поли(стиролдивинилбензол)сополимер (в полуавтоматическом режиме) с последующим анализом ВЭЖХ-МС. Отмечены значительные преимущества метода ВЭЖХ-МС перед иммуноанализом, улучшение нижнего предела обнаружения, чувствительности, точности и диапазона линейности [35]. В последующем [207], описан автоматизированный метод терапевтического мониторинга такролимуса, сиролимуса и циклоспорина в крови с использованием картриджей Strata SDB-L (SDVB) и ВЭЖХ-МС в качестве подтверждающего метода после иммуноанализа. Сделан вывод об эффективности, надежности и точности метода на примере анализа 50000 образцов реальной крови.

Lacassie E с соавт. представлен метод определения 29 фосфорорганических пестицидов в крови и сыворотке, включая ТФЭ на картриджах Oasis HLB и ГХ-МС. При сравнении результатов эффективности изолирования пестицидов методами ЖЖЭ и ТФЭ с фазами C18 и HLB, вывод был сделан в пользу фазы HLB (от 40 до 108 %). Оптимальным элюентом признан этилацетат (2 мл) [180]. Позже Raposo R. с соавт. для определения фосфорорганических инсектицидов: ометоата, диметоата, диазинона, хлорпирифоса и др. в образцах посмертной крови представили метод их изолирования на патронах Oasis HLB и анализа ГХ-МС с выходом от 31 до 108% [226].

Последовательное извлечение 68 ЛП кислотного, нейтрального и основного характера из цельной крови с использованием Oasis MCX представлено в работе [194]. Процедура экстракции включала кондиционирование (метанол и вода), трехступенчатую промывку (вода, 0,1 М HCl, вода – метанол (95:5)) и две стадии элюции: для препаратов кислотной и нейтральной природы (ацетон – хлороформ (1:1)), для препаратов основного характера (этилацетат – аммиак (98:2)). Отмечены хорошие выходы 75 % тестируемых ЛП и чистота второго (но не первого) экстракта. Сделан вывод о том, что процедура Oasis MCX не подходит для извлечения бензодиазепинов.

Josefsson M. и Sabanovic A. для пробоподготовки образцов крови, содержащей β -агонисты (фенотерол, сальбутамол, соталол, тербуталин) и β -антагонисты (карведилол, бетаксолол, бисопролол, пропранолол), включая осаждение белка и ТФЭ на картриджах Waters Oasis HLB, а также катионной MCX и анионной MAX фазами полимерных сорбентов со смешанным режимом. Наиболее эффективным для осаждения белков признано сочетание сульфата цинка и этанола, а для процедуры ТФЭ оптимален сорбент Oasis MCX, если целью является охват большого количества аналитов в одном анализе [210].

В работе [233] описывается процедура ТФЭ и ГХ-МС для идентификации и количественного определения 6 «клубных» препаратов: 7-аминофлунизепам, бупренорфин, флунизепам, кетамин, метадон и фенциклидин в цельной крови. Для изолирования использовались патроны Oasis MCX с автоматическим

устройством Aspec XL-271 (Gilson). Авторы делают вывод о надежности, высокой селективности, специфичности и точности метода для всех аналитов. Из 14 рассмотренных образцов крови 10 были посмертными образцами и 4 от живых лиц, подозреваемых в сексуальном насилии. Полученные концентрации варьировались от терапевтических до смертельных.

Для определения 22 ЛП, в том числе, анальгетиков, антиэпилептиков, β -блокаторов, гормонов, регуляторов липидного обмена, НПВС и др. в образцах крови и мочи использовали ТФЭ на патронах Oasis HLB и ГХ-МС. Полученные выходы веществ находились в пределах 85 – 102 %. Авторы отмечают простоту метода, скорость, высокую чувствительность и уменьшение опасности воздействия токсичных растворителей; во всех образцах от человека были обнаружены гормоны эстрон и 17β -эстрадиол, а также ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, кетопрофен и триклозан; флорфеникол, пириметамин и фенилбутазон в объектах от животных [234].

При анализе литературных данных мы отметили работы авторов, которые в своих исследованиях использовали графитированные сажи и сорбенты на основе углерода. Графитированные адсорбенты из углеродной сажи (GCB) обычно представляют собой непористые углероды. Процесс граффитизации приводит к высокой чистоте поверхности с большими свойствами адсорбции и десорбции (если требуется). Наиболее широко используются Carborack C и Carborack B. Отчасти потому, что они были представлены как самые ранние, а также потому, что они хорошо дополняют друг друга диапазоном размеров частиц и, таким образом, каждый из них может эффективно улавливать/освобождать аналит [241]. Отметим универсальность сорбентов на основе углей.

Di Corcia A. с соавторами использовали колонки Carborack B - для качественного и колонки Carborack C – для количественного анализа с последующей ГХ при исследовании фенobarбитала в цельной крови [69]. Carborack B использовали для извлечения 3-гидроксibuтирата из цельной крови, лактата – из плазмы [71].

В работе [139] представлена процедура ТФЭ основных лекарств из цельной крови с использованием картриджей Supelclean-ENVIsarb в сочетании с последующей экстракцией на Bondelut PRS (пропилсульфоновая кислота на основе силикагеля) [44]. Авторы считают перспективным автоматическую подготовку проб образцов крови с высоким уровнем выходов веществ и чистыми экстрактами, т.к. Supelclean-ENVIsarb имеют большую площадь поверхности (100 м^2) и свободны от диффузионных эффектов, что отличает их от пористых графитированных саж (GCB), требующих медленных контролируемых потоков.

1.4.3 Использование различных видов силикагеля с привитыми фазами

Октадецилсилан-содержащие сорбенты (C18, ODS, RP-18, LiChrolut RP-C18). В 70-х гг. XX века на рынке коммерчески доступных продуктов для хроматографии появились картриджи с сорбентом C18 (Octadecyl). Появление обращенной фазы C18 считают началом эры современной ТФЭ. Обращенно-фазовый режим разделения предполагает экстракцию неполярных соединений из водных образцов за счёт Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и является неселективным.

Типичный способ использования картриджа с сорбентом C18: биологическую жидкость перед загрузкой в колонку доводят до подходящего значения pH таким образом, чтобы аналит имел нейтральную форму, и затем помещают в картридж. Матричные соединения частично удаляют из экстракционной колонки путем промывки водой или буфером. Дополнительно осуществляют промывку картриджа с определенным объемом водно-органической смеси для удаления слабоудерживающихся (по сравнению с аналитами) соединений матрицы. Полученная фракция отбрасывается, а затем колонка элюируется смесью органических растворителей, которая собирается для последующего анализа и содержит аналит. Поскольку картридж с фазой C18 используется для экстрагирования анализируемого вещества вместе со всеми эндогенными соединениями с аналогичной гидрофобностью, существует мнение,

что его использование для биологических матриц приводит к большому количеству соэкстрактивных веществ в экстрактах [139].

В доступных нам литературных данных мы нашли значительное количество работ с использованием для экстракции патронов различных фирм с фазой C18. В них представлен широкий спектр определяемых ЛП, наркотиков и других веществ в различных биологических матрицах (таблица Приложения 1) и лишь несколько из них – из крови.

В работе [150] по исследованию сиролимуса (рапамицин – антибиотик-макролид) в цельной крови предложена очистка ЖЖЭ смесью бутилхлорид/диэтиловый эфир, а затем экстракция на патронах Sep-Pak light C18. Анализ проводился методом ВЭЖХ-УФ и использован для определения концентрации в образцах цельной крови здоровых добровольцев и реципиентов при почечной трансплантации, получавших различные дозы рапамицина в качестве иммуносупрессора.

Ford B. с соавт. исследовали ЛП с кислотными свойствами (этосуксимид, фенсуксимид, некоторые барбитураты, дифенилгидантоин, метоин, фенилбутазон, примидон, аспирин, ибупрофен), используя для экстракции из гемолизованной крови сорбент ODS (октадекасилан), элюирование осуществляли метанолом, анализ – методом ГХ-МС. Выходы превышали 80 %; отмечена чистота экстрактов в отношении со-экстрагированных липидов, обычно наблюдавшихся в кислотных экстрактах из гемолизованной крови при ЖЖЭ [37].

I.R. Tebbett для экстракции кодеина, морфина, 6-Мам из цельной крови применял картриджи Bond Elut C18, в качестве элюента – трижды по 500 мкл смеси MeOH – 1 % о-фосфорная кислота – ацетонитрил (50:30:20) и анализировал их методом ВЭЖХ [54].

Gidal B.E. и Lensmeyer G.L. при мониторинге топирамата и оценке его распределения между эритроцитами/белками плазмы провели исследование цельной крови с использованием метода ВЭЖХ после экстракции на ТФЭ дисках и патронах с фазой C18 [169].

Объемное исследование проведено с посмертным материалом девушки 15 лет с предполагаемым суицидом антиаритмическим препаратом флекаинид. Для экстракции аналита из гемолизованной крови, мочи, желчи, содержимого желудка, стекловидного тела применялись картриджи LiChrolut RP-C18 (Merck), выходы составляли около 100 % для крови и мочи, ниже – из ткани печени. Для элюирования использовали 1 мл метанола, последующий анализ проводили ГХ-АФД, ГХ-МС, ВЭЖХ-ДАД. Наряду с флекаинидом (18,73 мг/л в крови, 28,3 мг/л в моче), в моче и желчи обнаружены два его основных метаболита, этанол (0,14 г/л в крови), кофеин (0,66 мг/л в моче), карбамазепин (33,38 мг/л в содержимом желудка), N-дезалкилфлуразепам и БДА (0,14 мг/л в крови и 7,20 мг/л в моче, соответственно). Сделано заключение о том, что самоубийство соответствовало передозировке препаратом флекаинид [197].

Анализ литературных данных позволил сделать вывод о широчайшем применении исследователями различного вида привитых фаз и сорбентов при токсикологических исследованиях, исследованиях лекарственного мониторинга и в допинге, в том числе, на основе силикагеля. Например, они имеют в своем составе связанную с обращенной фазой на основе силикагеля функциональную группу: C1 (метил), C2 (этил), C8 (октил), SCX (бензолсульфоновая кислота), NH₂, PBA (фенилборная кислота), CN, Phenyl, PRS (пропилсульфоновая кислота) и др. (таблица Приложения 1). Отметим работы, где в качестве объектов исследования используется кровь.

Исследование фенопрофена, ибупрофена, индометацина, напроксена, парацетамола, салициловой кислоты из цельной крови представлено методом ВЭЖХ в работе [41]. Оценивали несколько различных картриджей, но выбор сделан в пользу фазы с октилом (Bond-Elut C8) с точки зрения выхода НПВС из крови (более 80%) и чистоты полученных экстрактов относительно ЖЖЭ. В качестве элюента использовалась смесь метанол – 1 % водный аммиак – ацетонитрил (50:30:20) (трижды по 500 мкл). Процесс фрагментации красных кровяных клеток путем обработки УЗ до извлечения предотвратил проблему блокировки патронов.

Tebbett I.R. и McCartney Q.W. использовали Bond Elut C8 для изолирования кокаина и его метаболита бензоилэкгониона из крови и мочи. Отмечено хорошее разделение аналитов методом ВЭЖХ, отсутствие помех из-за эндогенных соединений. В качестве элюента использовали смесь хлороформ – ИПС (4:1) трижды по 500 мкл. Отмечено, что если посмертная кровь очень вязкая, то она может быть разбавлена водой перед обработкой УЗ для облегчения прохождения через колонку и устранения проблемы блокировки пор патрона [95].

В 1985 г. Lensmeyer G.L. и Fields B.L. при фармакокинетических исследованиях использовали колонки Bond Elut CN для экстракции циклоспорина из 1,0 мл сыворотки, плазмы или цельной крови, разбавленной смесью вода – ацетонитрил (70:30) с выходом, в среднем, 90 % для цельной крови и 98 % для сыворотки и плазмы [88]. В последующих исследованиях циклоспорина и 9 его метаболитов в крови ВЭЖХ-УФ, 1 мл цельной крови разбавляли, гемолизировали и наносили на картридж Bond Elut CN, помехи удаляли с помощью четырех промывочных растворов и дополнительного картриджа с сорбентом C18 [91].

В конце 1980-х годов на рынок были выпущены и стали коммерчески доступными патроны для ТФЭ со смешанной фазой, содержащие обращено-фазовые (C8) и катионнообменные сорбенты (SCX). Этот вид фазы был специально разработан для изолирования ЛП с потенциалом злоупотребления. Производителями были представлены процедуры для экстракции различных групп ПАВ, таких как опиаты, амфетамины, барбитураты и др. [242]. В настоящее время патроны со смешанной фазой на основе силикагеля доступны от различных производителей: Bond Elut Certify (Varian, США), Clean Screen DAU (США), Isolute HСХ (Великобритания), TSC (Merck, Германия) и др.

Принимая во внимание тот факт, что токсикологически значимые вещества могут иметь кислотные, нейтральные и основные свойства, быть гидрофобными или гидрофильными, встречаться в биообъекте в неизменном виде или в виде метаболитов, логично предположить, что химически модифицированный кремнезем с гидрофобными и ионообменными группами будет проявлять большую селективность, нежели с одним сорбентом. Смешанный диоксид

кремния, в котором силанольные группы частично дериватизированы алкильными цепями средней длины (C8) и частично катионообменными заместителями (SO_3H), может оказывать, по меньшей мере, два типа взаимодействий: гидрофобные – с алкильными цепями веществ и ионные путем взаимодействия основных веществ с катионообменными группами [6].

Процедура изолирования на патронах со смешанной фазой:

- предварительная обработка образца зависит, прежде всего, от самого образца: мочу или плазму/сыворотку разбавляют подходящим буфером. Для разведенной цельной крови рекомендуется либо депротеинизация, либо УЗ с последующим центрифугированием. Ткань (печень, головной мозг и т. д.) должна сначала быть гомогенизирована, отцентрифугирована, отбирается надосадочная жидкость. Важной характеристикой является pH разбавленного образца. Наиболее широко используется разбавление 0,1 моль/л ФБ с pH 6,0 [121, 122, 134, 143, 147, 149]. При этом некоторые слабоосновные (например, диазепам), нейтральные и слабокислые соединения, такие как барбитураты, находятся в неионизированной форме и удерживаются гидрофобными заместителями сорбента. Сильноосновные вещества протонируются и удерживаются с помощью катионообменной функции сорбента. При этом, соединения с выраженными кислотными свойствами, такие как многие НПВС, депротонируются, ионизируются и, следовательно, не удерживаются. При доведении образцов крови (плазмы/сыворотки) до более низких значений pH, происходит коагуляция белков, что приводит к проблеме прохождения образца через колонку. Этого можно избежать прибавлением 0,1 моль/л фосфорной кислоты. Однако экстракты, особенно экстракты из мочи, при этом не так чисты, как при использовании ФБ pH 6 для разбавления [6];
- промывка и кондиционирование колонки. Экстракционную колонку промывают метанолом, затем кондиционируют водой или буфером. Колонка не должна высыхать перед внесением образца. Образец пропускают в условиях легкого вакуума при скорости потока не более 2 мл/мин;
- промывка патрона и регулировка pH. Патрон обычно промывают 1-2 мл воды, которой считается достаточно для удаления части матрицы из слоя

сорбента [121, 122, 134], а рН экстракционной системы до элюирования доводят до подходящего рН. В кислых элюатах может присутствовать достаточное количество примесей, для лучшего удаления которых в качестве дополнительной промывки можно использовать 20% метанол в воде или буфере [243]. При этом более полярные кислотные и нейтральные вещества могут быть смыты такой процедурой. Для получения воспроизводимого дифференциального элюирования значение рН колонки должно быть доведено до значения рН 3. При более высоком значении рН основные соединения будут элюироваться в первой фракции (нейтральные и кислотные вещества). Более низкие значения рН могут ухудшить экстракцию на сорбенте. Для корректировки рН достаточно 0,5-1,0 мл разбавленной уксусной кислоты;

- высушивание колонки. Сушка колонки важна в случае, когда при последующем анализе вода не допустима, например, при использовании ГХ. Сушку проводят в течение примерно 5 мин путем подключения вакуума к патрону и/или его центрифугированием. Дальнейшую сушку можно проводить путем внесения 0,5-1 мл гексана или 50 мкл метанола с последующим вакуумом (2 мин). Гексан считается хорошим «подсушивателем», однако при его использовании для промывки есть вероятность частичного элюирования гидрофобных веществ, таких например, как бензодиазепины [6];
- элюирование фракции А. Аналиты, удерживаемые гидрофобными группами сорбента, элюируются с использованием умеренно полярного растворителя или комбинации растворителей. Chen и др. авторы [121, 122, 127, 128, 132-138, 143, 179] оптимальным элюентом считают ацетон – хлороформ (1:1). Используются более гидрофобные элюирующие растворители, например: дихлорметан [178, 243], гексан – диэтиловый эфир (40:60) [244], гексан – этилацетат (50:50) [143, 216], ацетон – дихлорметан (1:1) [140, 141], этилацетат – ацетон (1:1) [172]. Менее полярные элюирующие растворители ожидаемо приведут к более чистым экстрактам, но тогда на сорбенте могут быть частично сохранены кислотные и нейтральные вещества. В этом случае необходима промежуточная стадия промывки, например, метанолом. Таким образом, в качестве компромисса для

целей скрининга требуется элюирующий растворитель со средней полярностью. Во избежание токсичных хлорированных органических растворителей, наилучшими будут смесь растворителей ацетона и этилацетата;

- промывка колонки между элюированием фракций А и В. Некоторые авторы [143, 243] считают лишней эту стадию. Промывка полярным растворителем, таким как метанол, может элюировать слабоосновные вещества, все еще сохраняющиеся на сорбенте. Поэтому при использовании для элюирования фракции А растворителя средней полярности, промывки между этапами не требуется и экстракты фракции В будут достаточно чистыми;
- элюирование фракции В. Для элюирования протонированных основных веществ из сайтов катионообменной фракции сорбента обычно используют органические растворители, смешанные с 2%-ным аммиаком. В качестве элюентов широко используются аммиачный этилацетат [121, 122, 127, 128, 143, 179], аммиачный дихлорметан – изо-пропанол [135, 140, 141, 178, 216, 243], аммиачный хлороформ – изо-пропанол [178], аммиачный метанол [158]. Элюирование фракции В может происходить с использованием обоих растворителей последовательно и путем объединения экстрактов. Медленное элюирование имеет решающее значение, так как ионные взаимодействия являются сильными, а процесс уравнивания требует времени;
- испарение. Фракции А и В отдельно выпаривают досуха или до небольшого объема растворителя.

Полярные препараты, такие как кислоты и парацетамол, плохо адсорбируются колонками ТФЭ в условиях использования и могут быть смыты [6].

Следует отметить группу авторов Chen ХН, Wijsbeek J, Franke JP, de Zeeuw RA., использующих в работе патроны со смешанной фазой с целью скрининга кислотных, нейтральных и основных препаратов для систематического токсикологического анализа. Работе с кровью предшествовали исследования плазмы и мочи [121].

Поведение препаратов на патронах Bond Elut Certify указывает на то, что патрон с сорбентом смешанного режима, содержащий гидрофобные и катионообменные функциональные группы, является подходящим выбором для скрининга. В случае неизвестного яда, все виды наркотиков могут быть сохранены на патроне и затем элюированы. Настоящий метод также применялся к другому патрону с диоксидом кремния со смешанной фазой, Clean Screen DAU. Выходы аналитов были выше 86 %; они были сопоставимы: на Bond Elute Certify – 94,5 %, на Clean Screen DAU – 88,7 % [122, 128].

В следующей работе [130] оценивалось использование патронов Bond Elut Certify для выделения морфина из цельной крови. Были опробованы четыре метода предварительной обработки образцов, три метода осаждения белка и УЗ/разведения. Последний вариант дал наилучшие результаты. Образец крови пропускали через патрон при pH 3,3 после обработки УЗ и разбавления 0,1 М ФБ (pH 3,3). На сохранение морфина влияли pH образцов, а потеря морфина во время применения образца была минимизирована низким значением pH (3,3). Слабоудерживающиеся матричные соединения удаляли путем промывки колонки последовательно ФБ, 0,01 М уксусной кислоты (pH 3,3) и метанолом. 2 мл 2 % аммиачного метанола были выбраны для элюирования, выходы морфина были более 80 %.

Оценивалась возможность регенерации колонок и повторного использования патронов Bond Elut Certify [129] для извлечения пентобарбитала, гексобарбитала, мепивакаина, тримипрамина и клоназепама из плазмы. Колонки регенерировали последовательно путем промывки метанолом, 1 % раствором хлористоводородной кислоты, водой и метанолом. Выход аналитов был более 85 % при трехкратном использовании колонки. Однако сорбционные характеристики регенерированных патронов несколько уменьшились с количеством повторов, поэтому патрон, с точки зрения авторов, не должен использоваться более двух или трех раз.

Также авторами рассматривалось применение автоматизации к процедуре ТФЭ для скрининга лекарств в моче и плазме в полуавтоматическом режиме

(Gilson ASPEC) в сочетании с патронами Clean Screen DAU [127] и полностью автоматизированного метода ТФЭ (Gilson ASPEC) для скрининга наркотиков в плазме и цельной крови на патронах Bond Elut Certify [138]. Выходы 19 веществ из плазмы составляли 73 – 96 %, из цельной крови превышали 82 % в обоих случаях.

В работе [133] оценивалась воспроизводимость результатов количественного анализа ГХ-ПИД и ГХ-АФД. Процедура экстракции с использованием патронов для ТФЭ Bond Elut Certify, разработанная для общего скрининга ЛП в системе ГХ-ПИД, была признана подходящей для экстракции основных лекарств из цельной крови и плазмы для анализа ГХ-АФД. Для очистки экстракта из образцов мочи требуется дополнительный этап промывки с 20 % раствором ацетонитрила в воде. Выходы 18 основных препаратов из плазмы, мочи и цельной крови варьировали от 77,7 до 104,5 % [122].

Zweipfenning P.G. с соавт. оценивали воспроизводимость экстракции на патронах Bond-Elut Certify при систематическом токсикологическом анализе цельной крови на примере 13 препаратов с различными физико-химическими свойствами. Патроны кондиционировали 2 мл метанола и 2 мл 0,1 М ФБ (рН 6,0), со скоростью потока около 2 мл/мин. 1 мл крови смешивали с 6 мл 0,1 М ФБ (рН 6,0), в течение 15 мин обрабатывали УЗ и центрифугировали 15 мин при 2000-3000 об/мин. Надосадочную жидкость пропускали через патрон (около 1,5 мл/мин). Патроны промывали 1 мл воды и 0,5 мл 0,01 М уксусной кислоты (рН 3,3). Прибавляли 50 мкл метанола. Кислотно-нейтральную фракцию элюировали дважды 2 мл смеси ацетон – хлороформ (1:1). Основные ЛП элюировали 3 мл этилацетата, содержащего 2 % 25 % раствора аммиака под действием силы тяжести (примерно за 4 мин.). Две фракции собирали отдельно и выпаривали досуха при 40 °С в потоке азота [134].

В работе [158] представлена ТФЭ на патронах Bond-Elut Certify, а также полностью автоматизированная процедура, включающая выделение 17 ЛП (барбитураты, БДА, ТАД, морфин, БЭ) из образца (цельная кровь с минимальной предварительной обработкой, плазма, моча) путем ТФЭ на патронах DAU

(система с лабораторным роботом для подготовки образца), дериватизации (триметилсилилирования), анализа ГХ-МС. Сделан вывод о некоторых сложностях при использовании автоматизированного метода в приложении к систематическому токсикологическому анализу для ГХ-МС.

Методы анализа парацетамола (ацетаминофена) [183] и одновременного определения карбамазепина, этосуксимида, фенобарбитала, фенитоина, примидона и вальпроевой кислоты были разработаны для образцов цельной крови и печени с использованием картриджей Bond Elut Certify и ГХ-МС [173]. 0,2 мл цельной крови разбавляли до 1,6 мл 1 М ФБ (pH 4,5). Смесь обрабатывали УЗ в течение 10 мин. и центрифугировали на 2000-3000 об/мин. Патроны Bond Elut Certify кондиционировали 2 мл метанола, 2 мл 1М ФБ. Образец крови вносили на колонку, промывали 1 мл 1 М ФБ и 1 мл 0,01 М уксусной кислоты, элюировали 2 мл ацетона. Производные бутила были получены с использованием н-йодбутана и тетраметилгидроксид аммония (ТМАГ) в мягких условиях. Выходы для противосудорожных средств были более 50 %, кроме вальпроевой кислоты (42 %), для парацетамола выход составлял более 90 %. Время подготовки образца – менее 2 ч, время работы ГХ – менее 20 мин. Линейность наблюдалась от субтерапевтического до летальных уровней для всех ЛП. Метод был применен к ряду судебных случаев и позволил значительно сократить время анализа при одновременном улучшении качества работы.

Метод одновременного качественного и количественного определения 25 НС (опиатов, кокаина, амфетаминов) и ЛП (трициклические антидепрессанты, фенотиазины, бензодиазепины и др.) в крови, моче, желчи и содержимом желудка представлен Soriano T. с соавт. [178]. Он включал ТФЭ на Bond-Elut Certify, анализ ГХ-АФД и подтверждение ГХ-МС при необходимости. Предварительная обработка УЗ проводилась в течение 15 мин, затем использовали ферментативный гидролиз с β -глюкуронидазой для мочи. Патроны кондиционировали 2 мл метанола и 2 мл 0,1 М ФБ (pH 6). Кислотные и основные соединения экстрагировали на разных патронах при разных уровнях pH: 6 – 6,5 для кислотного и нейтрального экстракта (4 мл метиленхлорида), и 8 – 8,5 для

основного (2 % аммиачный хлороформ – изо-пропанол (80:20)) и бенздиазепинов (2 мл ацетонитрила). Были рассмотрены несколько факторов, влияющих на анализ: внутренние стандарты, pH, УЗ, скорость потока и промывочные растворители. Выходы для тестируемых соединений были выше 61 %.

Целью работы [216] было определение возможности переключения с ЖЖЭ на ТФЭ; для 122 препаратов и метаболитов были определены пределы обнаружения в крови после ТФЭ на патронах Clean Screen DAU и ЖЖЭ. Хотя патроны ТФЭ были дороже процедуры ЖЖЭ, с ТФЭ процесс шел в 2 раза быстрее, т.о. удвоив количество образцов, которые могли быть извлечены одним аналитиком за единицу времени. При этом обнаружены несколько препаратов, не выявленных после ЖЖЭ (прежде всего морфин и БЭ), и ТФЭ позволила экстрагировать слабокислые и нейтральные препараты за одну процедуру.

Для сравнения эффективности экстракции (ЭЭ) и хроматографической чистоты экстрактов исследованы 4 типа патронов для ТФЭ со смешанной фазой (Bond Elut Certify, Isolute Confirm HCH, Chromabond Drug и Bakerbond Narc-2) на примере морфина, 6-МAM и кодеина в крови и сыворотке. Патроны последовательно промывали 5 мл метанола, воды и боратного буфера 0,05 М (pH 8,5). 1 Мл крови или сыворотки (разведенной 1:1 водой и отцентрифугированной) смешивали с 1 мл боратного буфера 0,05 М (pH 8,5), встряхивали и центрифугировали 5 мин. Надосадочную жидкость пропускали через патрон (5 мин). Промывку проводили 2 мл воды, 1 мл ацетатного буфера 0,1 М (pH 4,0) и 2 мл метанола. После высыхания в течение 5 мин под полным вакуумом колонки элюировали 2 мл смеси дихлорметан – изо-пропанол – гидроксид аммония (80:20:2) под действием силы тяжести. Для количественного определения использовали ГХ-МС (ионная ловушка) и ВЭЖХ с АМД. Отмечена значительная разница выхода аналитов (от 8 % до 100 % и более), не связанная с матричным эффектом, а также типом и концентрацией аналита среди всех партий всех марок патронов ТФЭ. Все экстракты были хроматографически чистыми и не содержали мешающих пиков ни в ГХ-МС, ни в ВЭЖХ-исследованиях; в некоторых экстрактах были идентифицированы большие пики пластификаторов. Измерения

скоростей течения одних и тех же образцов крови или сыворотки через патроны ТФЭ одной и той же партии показали очень большую изменчивость случайного характера. Морфометрический анализ частиц показал симметричное распределение размеров частиц только у Chromabond Drug, сопоставимое с данными производителя; в других картриджах обнаружено неоднородное распределение и крупные фракции мелких частиц. Сделан вывод о необходимости улучшения производителями качества патронов ТФЭ со смешанной фазой [144].

Необходимость скрининговых исследований биоматериала на современном этапе токсикологического анализа продиктована также появлением, постоянным расширением и обновлением в незаконном обороте ассортимента новых психоактивных веществ. Наряду с «классическими» наркотиками, ЛП, используемыми с целью злоупотребления, и прочим, что встречается в биообъектах в экспертной практике, в настоящее время во всем мире актуализируется проблема идентификации новых психоактивных веществ. О существенном нарастании их незаконного оборота в последние годы сообщается в ежегодных докладах Европейского центра мониторинга наркотиков (EMCDDA) [245]. В разных регионах РФ наблюдается эффект замещения на нелегальном рынке героина и каннабиса на их синтетические аналоги – фентанилы, каннабимиметики и психостимуляторы (MDPV, PVP, мефедрон и др.).

«Дизайнерские наркотики» – ПАВ, разрабатываемые путем модификации структуры известных наркотиков с целью усиления их наркотического действия или обхода действующего законодательства. Как правило, это синтетические заменители какого-либо натурального вещества, полностью или частично воспроизводящие наркотические свойства последнего (например, синтетические каннабимиметики), либо близкие, но не идентичные по строению вещества, обладающие сходной фармакологической активностью.

Поэтому в экспертной практике желательны такие методики пробоподготовки биообъектов, которые позволяли бы идентифицировать дизайнерские наркотики, причем, как нативные, так и в виде метаболитов.

Следует отметить, что аналитическая диагностика фактов употребления новых ПАВ представляет собой серьезную проблему экспертной практики [246-248] в силу недостаточной информации о самих дизайнерских наркотиках, путях их биотрансформации в организме человека, аналитических характеристиках основных метаболитов и отсутствия методик для обнаружения фактов их употребления.

Ниже будут представлены имеющиеся в литературе данные об ацетилфентаниле (АЦФ) и синтетических каннабимиметиках (СК) группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина. Эти дизайнерские наркотики были взяты нами в разработку по причине их появления в 2012-2014 гг. в биообъектах от живых лиц и в трупном материале на территории Пермского края и Челябинской области.

1.5 Общая характеристика и метаболизм отдельных групп токсикологически значимых веществ

1.5.1 Производные фентанила (ацетилфентанил)

N-(1-фенилэтилпиперидин-4-ил)-N-фенилацетамид, CAS № 3258-84-2, GR-001, ацетилфентанил, дезметилфентанил, ацетилованный аналог фентанила, брутто-формула $C_{21}H_{26}N_2O$, мол. масса = 322,4 г/моль.

Синтезирован в 1968 году, но не одобрен ВОЗ для использования в медицинских или ветеринарных целях [249]. В 2012 – 2013 гг. в РФ и отдельных регионах мира (много сообщений из США) [250–254] зафиксированы нефатальные и летальные случаи после употребления АЦФ, продаваемого через интернет-магазины под различными коммерческими названиями. В РФ он обнаружен в составе курительных смесей, изготавливаемых кустарно. Реализуется в виде порошка, таблеток, пилюль, имитирующих препараты, содержащие опиаты (оксикодон), назального спрея или в виде жидкости для инъекций [254–256]. В России после его включения в ноябре 2012 года в список I

Перечня наркотических веществ [257] стал появляться в незаконном обороте значительно реже. Но после 2012 года появились многочисленные сообщения о нелегальном распространении АЦФ в странах Западной Европы, США и Канаде [256, 258–261]. Есть данные об изъятии крупных партий, до 1,5 – 3 кг. В ряде стран, в том числе и в РФ, входит в список запрещенных для оборота наркотических средств [257, 261–263].

Однако в большинстве западноевропейских стран, США, Канаде, а также в Японии и Китае ацетилфентанил был включен в список контролируемых субстанций только в 2014 и 2015 гг., что объясняет его активное распространение в этих странах 2013 – 2015 годах. На 37-й сессии ECDD (Комитет экспертов по наркотической зависимости) в 2015 г. отмечено, что АЦФ обнаружен в нелегальном обороте в 14 странах, несмотря на его использование только в качестве аналитического стандарта [255].

Результаты исследования на мышах показали, что эффективная доза АЦФ примерно в десять раз ниже, чем у морфина, но в три раза выше фентанила. Однако летальная доза ацетилфентанила (9,3 мг/кг) примерно в 7 раз ниже, чем у фентанила, и в 50 раз ниже, чем у морфина. По итогам изучения анальгетической активности некоторых аналогов фентанила, представленным в работе [264] доказано, что ацетилфентанил (а также α -метил- и 3-метилфентанил) является одним из наиболее опасных аналогов фентанила из-за узкого диапазона безопасных доз. Индекс безопасности (отношение LD_{50}/ED_{50}) для АЦФ (443) значительно ниже, чем у морфина (1424) и у фентанила (10164). Подчеркивается, что ацетилфентанил часто подмешивают к героину, либо его выдают за героин и потребители не знают об этом. При этом они описывают эффекты от ацетилфентанила как более сильные и качественно отличающиеся от героина [265, 266].

Наиболее частым способом употребления ацетилфентанила является внутривенный, однако описаны случаи введения ацетилфентанила с использованием электронных сигарет [267], инфузией [265].

Информация о фармакологических эффектах, производимых ацетилфентанилом, имеется от его нелегальных потребителей с интернет форумов [268], данные о клинических эффектах достаточно скудны. Пострадавшие, как правило, нуждаются в интенсивной терапии с необходимостью интубации и ИВЛ. Типичными клиническими признаками являются снижение сознания, вялость и дезориентация, брадикардия и гипотония, угнетение дыхания и миоз. Отмечается необходимость использования в качестве антидота налоксона и в большей, чем обычно, дозировке [256, 267].

Patton A.L. с соавт. в 2014 г. проведено исследование с использованием микросомальных ферментов печени грызунов и человека и показано, что АЦФ метаболизируется цитохромом P450s до нор-ацетилфентанила (нор-АЦФ). В моче крыс, получавших токсичную дозу АЦФ, были найдены АЦФ и его предсказанный метаболит – нор-АЦФ. Исследование экскреции продуктов биотрансформации АЦФ на крысах показало, что спустя 3 часа после введения дозы 3 мг/кг, концентрация АЦФ и его нор-метаболита достигает 16-17 мкг/мл [268].

При анализе посмертных образцов биологических жидкостей и тканей человека после летальных передозировок (18 случаев) методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС обнаруженная концентрация ацетилфентанила в крови составила от 0,58 до 730 нг/мл (в среднем 160 нг/мл). Только в одном случае концентрация АЦФ была менее 1 нг/мл, в 13 случаях она была более 100 нг/мл [269].

Одновременный анализ биологических жидкостей и тканей показывает примерное распределение ацетилфентанила по организму в посмертных образцах крови, стекловидном теле, моче, печени и находится в пределах 180-700, 131-240, 234-3420 нг/мл, 1000-2400 нг/г, соответственно [270-273].

Более низкие концентрации ацетилфентанила в трупном материале наблюдались, как правило, при комбинированных отравлениях с ибупрофеном, тадалафилом, α -PVP, α -PHP, прегабалином, этанолом, алпразолом, БЭ, левамизолом, дифенгидраминам, декстрометорфаном, мепробаматом, кветиапином, сертралином, 6-Мам, мепирапимом, 4-метокси-PV8 и др. [274-282].

В работах [278, 279] приведены концентрации фентанила и ацетилфентанила и их нор-метаболитов. Средняя концентрация АЦФ (без фентанила, $n = 4$) в периферической крови составляла 0,467 мг/л, нор-АЦФ – 0,053 мг/л. В случаях с АЦФ и фентанилом ($n = 3$), средние концентрации АЦФ – 0,008 мг/л, нор-АЦФ – 0,001 мг/л, фентанила – 0,018 мг/л, нор-фентанила 0,002 мг/л.

Концентрация ацетилфентанила у живых лиц в сыворотке ($N = 7$) составляла 0,6-51,6 (среднее значение 18,3) нг/мл. В 93 % случаев, наряду с АЦФ, были обнаружены другие и/или классические наркотики [256].

Доказано, что ацетилфентанил показывает перекрестную реактивность при иммуноферментном анализе с фентанилом [283-285]. Поэтому крайне необходимы чувствительные методы его подтверждения, для чего чаще всего используется ГХ/МС и ЖХ/МС [259].

Patton A.L. с соавт. [268] разработал метод ЖХ-МС/МС для исследования ацетилфентанила и нор-АЦФ в моче крыс. Zhang X. с соавт. и McIntyre I.M. с соавт. [270, 271, 280] использовали метод ГХ-МС для определения АЦФ и бутирфентанила в посмертных биологических образцах.

Roklis J. с соавт. использовали УЭЖХ-МС/МС для изучения распределения фентанила и ацетилфентанила и их нор-метаболитов в посмертных образцах [278, 279]. В последующем авторы использовали ГХ-МС и УЭЖХ-МС/МС в анализе посмертных образцов после смешанной наркотической интоксикации с обнаружением бутирилфентанила, ацетилфентанила, альпразолама и этанола [281].

Hisatsune K. с соавт. [286] обнаружены ацетилфентанил и α -пирролидиногексифенон (α -РНР) в посмертном образце крови при использовании ЖХ-QTOF/МС, количественную оценку ацетилфентанила проводили методом ГХ-МС. Исследование подтвердило ожидаемые метаболические пути АЦФ, т.е. гидроксирование и деацетилирование.

Методом ГХ-МС и ЖХ-МС были идентифицированы ацетилфентанил и 4-метокси-PV8 в образце мочи. Оба препарата количественно определяли ЖХ-МС/МС [276].

Первоначальное обнаружение производных фентанила методом иммуноанализа и подтверждения ГХ/МС описано для ацетилфентанила [273].

Для идентификации и количественного определения фентанила, норфентанила, ацетилфентанила, фуранилфентанила, 3-метилфуранила и карфентанила [287], а также современных новых опиоидных препаратов количественно в цельной крови и сыворотке и 17 аналитов качественно в моче разработан метод ЖХ-МС/МС [288, 289].

Идентификация и количественное определение мепирапима и ацетилфентанила в подлинных образцах цельной крови человека и мочи с помощью ГХ-МС/МС и ЖХ-МС/МС приведено в работе [282].

Метод УЭЖХ-МС/МС применен для анализа объектов с целью поиска новых аналогов фентанила: ацетилфентанила, β -гидрокситио-, парафторизобутирил-, бутирил-, фуранил- и карфентанила, а также синтетического опиоида U-47700 [290].

ЖХ-МС/МС был использован для целевого скрининга 132 новых психоактивных веществ в волосах, в том числе ацетилфентанил, 25C-NBOMe, MDPV, PB-22 и AB-FUBINACA [291].

Николаева Э.Г. с соавт. для идентификации АЦФ и его метаболитов использовали аутопсийные кровь и мочу. Методами ГХ-МС и ЖХ-МС были обнаружены ряд метаболитов и глюкуронидированные метаболиты для всех моно-, ди- и дигидроксилированных с О-монометилированием метаболитов. Интенсивности хроматографических пиков глюкуронидов в моче были значительно выше, чем у соответствующих им гидроксилированных метаболитов, и (почти в 10 раз) выше, чем пик нативного АЦФ. В образце крови обнаружили моногидроксилированные, дезалкилированный и дигидроксилированные с монометилированием метаболиты. Пик ацетилфентанила был наиболее интенсивным по сравнению с остальными метаболитами [292].

1.5.2 Синтетические каннабимиметики группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов (PB-22, PB-22F, FUB-PB-22)

В октябре 2012 года на территории РФ в изъятых курительных смесях была идентифицирована новая группа соединений – индолкарбоксилаты, представляющие собой сложные эфиры N-алкильных производных индол-3-карбоновой кислоты и 8-оксихинолина [293].

В Японии при исследовании приобретенных через интернет образцов, в период с июля 2012 по январь 2013 г., были выявлены PB-22 и BB-22 [294]. После подтверждения их структуры и (с учетом правил системы ИЮПАК) присвоены акронимы QUPIC и QUCHIC. С января по март 2013 года в Японии был выявлен PB-22F, являющийся N-5-фторпентиловым аналогом QUPIC [295].

Химические структуры выявленных в 2012 и 2013 гг. сложных эфиров 8-гидроксихинолина и алкилиндол-3-карбоксилатов, приведены на рисунке 1.8.

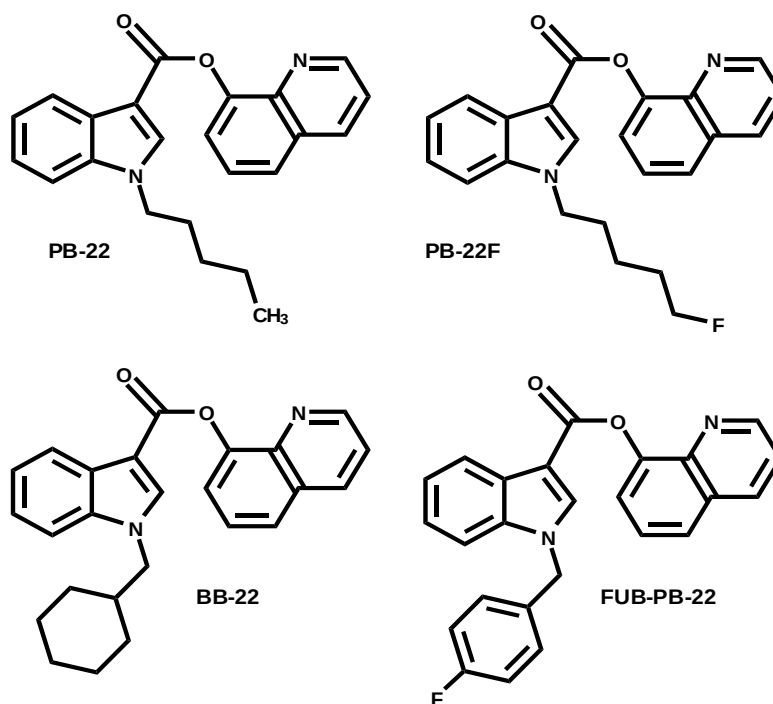


Рисунок 1.8 – Структурные формулы синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, BB-22, FUB-PB-22

PB-22F является фторированным производным PB-22 и отличается от него наличием в 5-м положении N-алкильной цепи атома фтора. BB-22 и FUB-PB-22 представляют собой модификации структуры PB-22, полученные путем варьирования заместителя у атома азота в индольном цикле.

Отсутствие сведений о происхождении указанных синтетических каннабимиметиков (СК) свидетельствует о том, что данные вещества были синтезированы в подпольных лабораториях, занятых разработкой «дизайнерских наркотиков», путем модификации структуры JWH-018 с целью выведения перечисленных соединений из-под действия законодательства в сфере контроля за оборотом наркотических средств и психотропных веществ (рисунок 1.9).

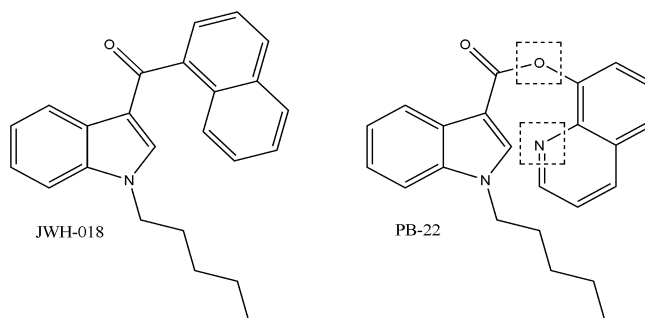


Рисунок 1.9 – Химическая структура каннабимиметиков JWH-018 и PB-22

В настоящее время для указанных СК на территории РФ действуют ограничительные меры, в соответствии с Постановлениями Правительства РФ № 580 от 10.07.2013, № 788 от 09.09.2013 и № 224 от 22.03.2014 [296–298].

Правительство США в январе 2014 г. внесло PB-22 и 5F-PB-22 и их оптические, позиционные и геометрические изомеры, соли и изомеры солей в Список 1 Закона о контролируемых веществах [299], а в 2016 году продлило их статус [300].

Информации о фармакологических свойствах, клинических проявлениях интоксикации и метаболизме индолкарбоксилатов недостаточно. Из описания эффектов на форумах потребителей: эйфория, тошнота, рвота, путаница сознания, нарушение координации, беспокойство; некоторые пользователи сообщили о желании приема повторной дозы и синдроме отмены (головная боль, тошнота,

рвота) с постоянной тягой к повторному использованию (более недели после прекращения приема) [301]. Сообщалось о судорогах от приема 5F-PB-22 [302] и PB-22 [303].

Из клинических проявлений при интоксикации отмечались нарушение сознания, антероградная амнезия (нарушение памяти), тахикардия, судороги, ажитация, зрительные галлюцинации, рвота или слюнотечение вскоре после курения, а также подозрение на серотонинергическую токсичность [304, 305]. В случае фатального исхода зафиксирована печеночная недостаточность, отек легких, гранулематозные воспалительные изменения в легких, острый респираторный дистресс-синдром [306].

В большинстве работ представлено изучение психоактивных эффектов, аналогичных действию марихуаны, производимых синтетическими каннабимиметиками на мышей и крыс [307, 308], активности различных СК на рецепторы CB1 и CB2 [309] и нейрональной активности [310].

В ряде публикаций представлены факты обнаружения синтетических каннабимиметиков в вещдоках [311], употребления каннабимиметиков PB-22, PB-22F, BB-22, FUB-PB-22, в том числе водителями [305] и старшеклассниками [312]. Приводятся данные об обнаруженных концентрациях синтетических каннабимиметиков: 5F-PB-22 в посмертных образцах крови и сыворотки (1,1 – 1,5 нг/мл), по одному случаю с ТГК и этанолом [306]; 0,37 нг/мл в посмертном образце бедренной крови [313].

При исследовании живых лиц после интоксикации синтетическими каннабимиметиками обнаружены 5F PB-22 (7,30 – 400 пг/мл), BB-22 (1,60 пг/мл) [314].

PB22 и PB-22F входят в число наиболее часто используемых потребителями и наиболее часто обнаруживаемых синтетических каннабимиметиков – индол-карбоксилатов в объектах от живых лиц и посмертном материале [304, 312, 314-319].

Большинство представленных работ посвящены, как правило, изучению метаболизма PB-22 и PB-22F *in vitro*, в том числе с использованием гриба

Cunninghamella elegans. Грибковые метаболиты PB-22 и 5F-PB-22 имели сходство с сообщаемыми метаболитами человека *in vitro* с той разницей, что гидролиз сложноэфирной связи не был основным путем метаболизма гриба [317].

Далее приведены известные сведения о метаболизме отдельных представителей каннабимиметиков ряда эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов.

PB-22 (синонимы: QUPIC, QCBL-018, MN-25, LTI-696), хинолин-8-ил-1-пентил-1Н-индол-3-карбоксилат, CAS № 1400742-17-7, брутто-формула $C_{23}H_{22}N_2O_2$, мол.масса = 358,4 г /моль.

Изучение метаболизма с использованием гепатоцитов человека показало, что преобладающим метаболическим путем для PB-22 и PB-22F является гидролиз сложноэфирной связи, который совместно с процессами ароматического и алкильного гидроксирования дает широкий спектр метаболитов 1-пентилиндол-3-карбоновой и 1-(5-фторпентил)индол-3-карбоновой кислот [318]. Для PB-22 идентифицированы 20 метаболитов, большинство из которых образуются при окислении с последующей глюкуронизацией, либо без таковой (рисунок 1.10).

Takayama T. с соавт. с использованием микросом печени человека исследовали, в числе других синтетических каннабимиметиков, метаболизм QUPIC, 5 F-QUPIC [319] и пришли к выводу, что QUPIC и 5 F-QUPIC, будучи сложными эфирами хинолинола, преимущественно подвергались гидролизу с образованием метаболитов типа индолуксусной кислоты.

Проведено сравнительное исследование мочи и слюны в качестве биологических матриц для мониторинга недавнего воздействия наркотиков среди ВИЧ-инфицированных методом ЖХ-МС/МС. Только в одном случае результаты в слюне соответствовали результатам в моче, оба образца содержали АВ-FUBINACA [320]. Отметим факт обнаружения в моче исходных АВ-FUBINACA, PB-22 и 5-F-PB-22 (1,4-3 нг / мл).

Волосы предложены в качестве альтернативного объекта в скрининге 132 новых психоактивных соединений, в том числе АЦФ, 25С-NBOMe, MDPV, PB-22 и AB-FUBINACA методом ЖХ-МС/МС [293].

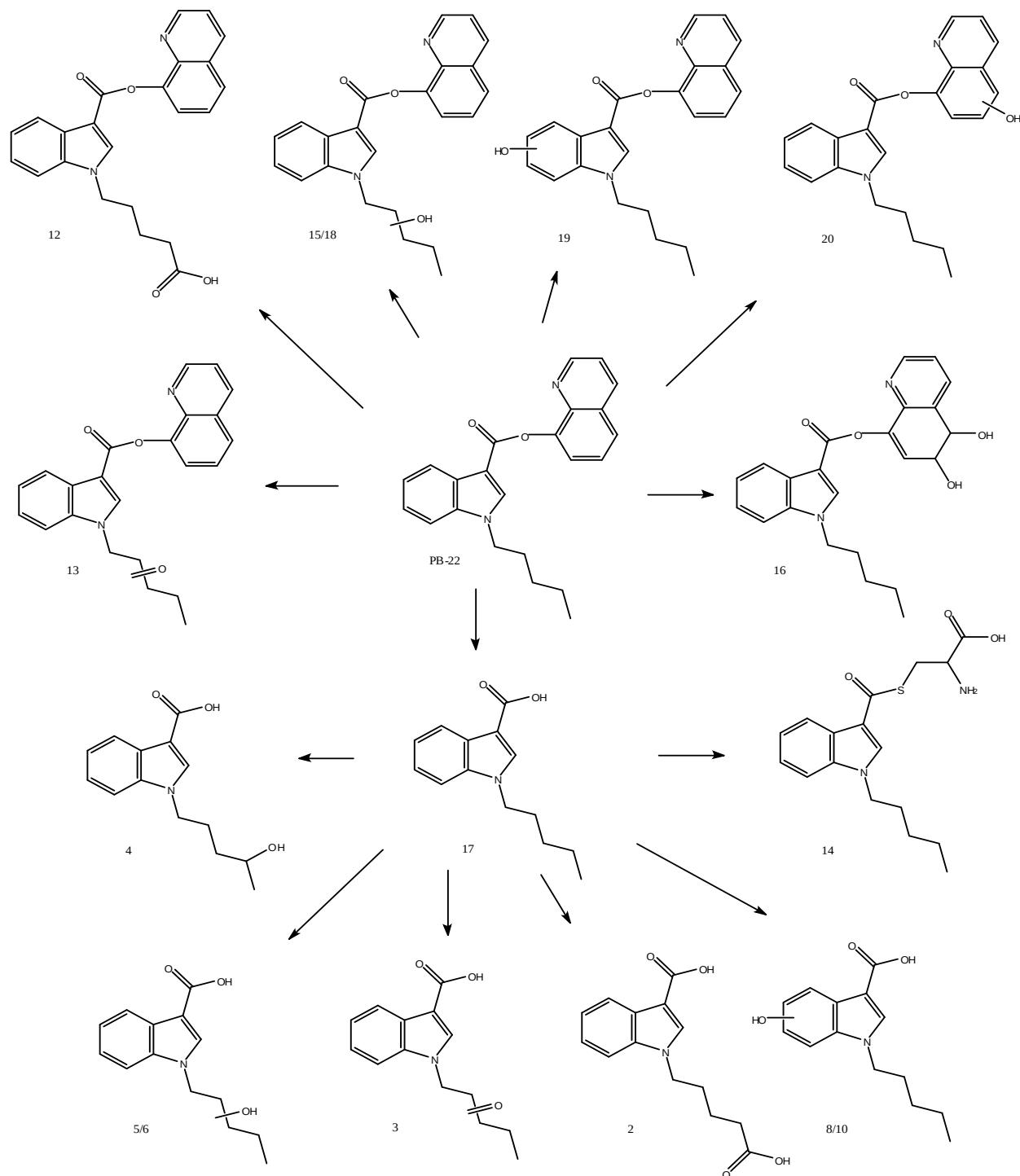


Рисунок 1.10 — Структурные формулы основных метаболитов каннабимиметика PB-22 по данным работы [318] (без учета конъюгированных форм)

PB-22F (синонимы: 5F-PB-22, 5-fluoro PB-22, 5-fluoro QUPIC, QCBL-2201, MN-25F), хиолин-8-ил-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоксилат, CAS № 1400742-41-7, $C_{23}H_{21}FN_2O_2$, мол. масса = 376,4 г/моль.

Основным путем биотрансформации PB-22F, как и у описанного выше аналога PB-22, является гидролиз сложного эфира [318]. Всего для PB-22F было идентифицировано 22 метаболита, большинство из которых образовывались при окислении с последующей глюкуронизацией или без таковой (рисунок 1.11). Окислительное дефторирование PB-22F приводило также к образованию метаболитов, характерных для PB-22.

Diao X. с соавт. проведено исследование метаболизма синтетического каннабимиметика NM-2201 с использованием гепатоцитов человека и в образцах мочи методом ЖХ-МСВР. M17 на рис.1.11 был преобладающим метаболитом после гидролиза мочи β -глюкуронидазой. Авторы рекомендуют его в качестве маркера для подтверждения приема NM-2201 и/или 5F-PB-22 в моче [321].

Рисунок 1.11 – Структурные формулы основных метаболитов каннабимиметика РВ-22F по данным работы [318] (без учета конъюгированных форм)

FUB-PB-22 (синоним QCBL-BZ-F), хинолин-8-ил-1-(4-фторбензил)-1*H*-индол-3-карбоксилат; брутто-формула $C_{25}H_{17}FN_2O_2$, мол.масса = 396,4 г/моль.

FUB-PB-22 появился на рынке летом 2013 года, когда описанные выше каннабимиметики попали в список наркотических веществ, запрещенных на территории РФ.

Diao X. с соавт. [322] проведено исследование метаболизма FDU-PB-22 и FUB-PB-22 с использованием гепатоцитов человека и подтверждения результатов в образцах мочи (после гидролиза β -глюкуронидазой) ЖХ-МСВР. В образцах гепатоцитов человека идентифицированы 7 метаболитов для обоих соединений, вызванных гидролизом сложного эфира и дальнейшим гидроксилированием и/или глюкуронидированием. Для FDU-PB-22 и FUB-PB-22 получен одинаковый метаболит M7 - фторбензилиндол-3-карбоновая кислота (FBI-COOH). M7 и M6 (гидроксилированный FBI-COOH) были основными метаболитами. Они же преобладали в аутентичных образцах мочи после гидролиза β -глюкуронидазой, вследствие чего авторы рекомендуют их в качестве маркеров, присутствующих в моче для документирования факта приема FDU-PB-22 и/или FUB-PB-22. Родительский препарат в образцах мочи человека не был обнаружен. На рисунке 1.12 представлен метаболический профиль FDU-PB-22 и FUB-PB-22 в реальных образцах мочи.

В работе [323] предложен метод ГХ-МС холодной электронной ионизации, который, с точки зрения авторов, позволяет различать пары тесно связанных синтетических каннабимиметиков FUB-PB-22 и FDU-PB-22, 5F-PB-22 и NM-2201, сохраняя при этом способность сравнивать неизвестные аналиты с библиотеками масс-спектров.

Отмечается возможность идентификации маркеров PB-22, PB-22F, FUB-PB-22 методом ГХ-МС как в моче, так и в волосах потребителей курительных смесей [324, 325].

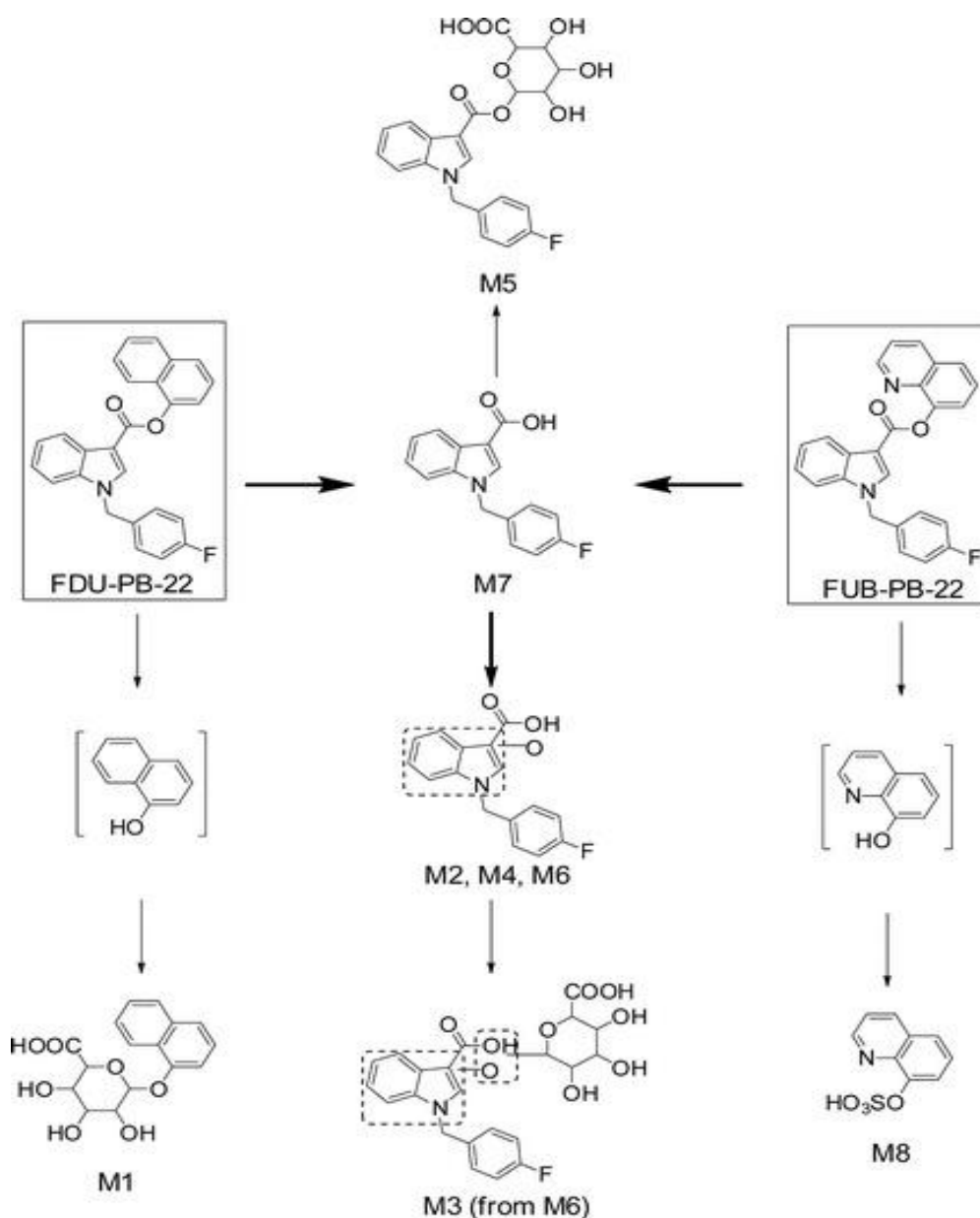


Рисунок 1.12 – Метаболический профиль FDU-PB-22 и FUB-PB-22 в реальных образцах мочи по данным работы [322]

Franz F. с соавт. представлены результаты анализа ЖХ-МС/МС образца волос, во всех сегментах которого обнаружены 5F-PB-22 и АВ-СНМІNАСА, а также их основные метаболиты 5F-PB-22 3-карбоксииндол (M17 рисунок 1.11), PB-22 5-ОН-пентил (M15 рисунок 1.11) и АВ-СНМІNАСА валин (M21 рисунок 1.17). Испытания на стабильность показали, что три «метаболита» также образуются во внешних средах волос после их хранения в разных условиях. Кроме того, 3F-PB-22 3-карбоксииндол и АВ-СНМІNАСА валин были

идентифицированы как продукты деградации синтетического каннабимиметика в дымовом конденсате [326].

1.5.3 Синтетические каннабимиметики группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина (AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA)

Новая группа каннабимиметиков в России появилась на рынке спайсов в 2013 году. Структуры получивших распространение соединений приведены на рисунке 1.13.

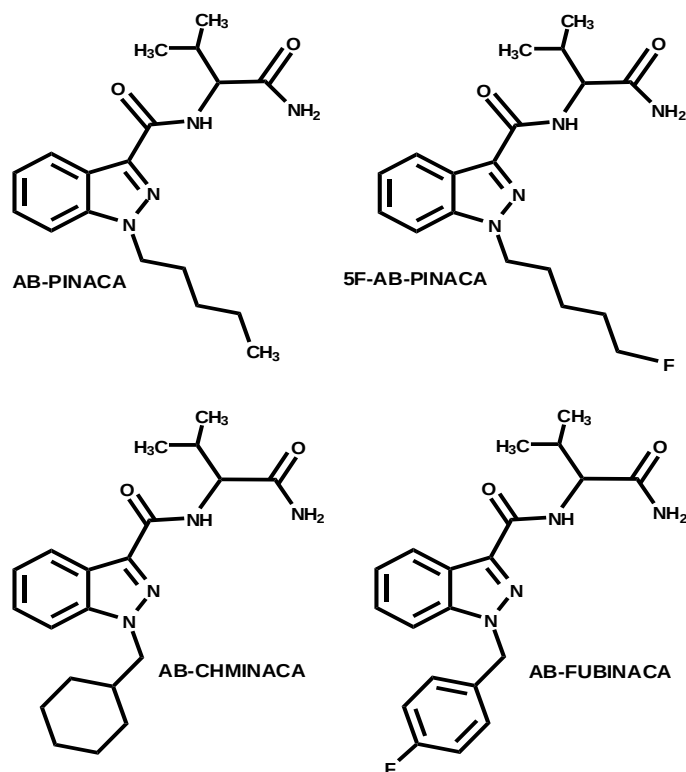


Рисунок 1.13 – Химические структуры синтетических каннабимиметиков AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA

Впервые каннабимиметики AB-PINACA и AB-FUBINACA были идентифицированы в Японии в составе курительных смесей в 2012 году [327]. AB-FUBINACA имеет высокое сродство к рецепторам CB1 ($K_i = 0,9$ нМ), что на порядок больше, чем у JWH-018 [327, 328].

На настоящее время имеется значительное количество работ, посвященных исследованиям фармакотоксикологических эффектов, производимых АВ-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA на мышей и крыс [329-333], в том числе, при введении их аэрозольным путем, учитывая возрастающую популярность курения каннабиса и СК с использованием электронных сигаретных устройств [334, 335].

2-алкил-2Н-индазольный региоизомер АВ-CHMINACA в 2016 г. идентифицирован в Японии. Сравнение агонистической активности АВ-CHMINACA, АВ-FUBINACA, АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA и их соответствующих 2-алкил-2Н-индазольных региоизомеров на CB1 и CB2 рецепторы привело к выводу о меньшей (микромольного уровня) активности региоизомеров на оба рецептора. Вывод сделан в пользу версии, что региоизомеры образуются при подпольном синтезе в качестве примесей к СК [336].

AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA подпадают под действие постановления Правительства РФ № 788 от 09 сентября 2013 г. как N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1Н-индазол-3-карбоксамида и его производные, а АВ-FUBINACA как производное N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(фенилметил)-1Н-индазол-3-карбоксамида [297].

Правительство США в январе 2015 года АВ-PINACA, АВ-CHMINACA и их оптические, позиционные и геометрические изомеры, соли и изомеры солей внесло в Список 1 Закона о контролируемых веществах [337], а в 2017 году продлило их статус [338].

Несмотря на широкое использование различных синтетических каннабимиметиков, патофизиология, связанная с интоксикацией ими, плохо изучена, равно как и их метаболизм, и распределение в крови и органах [339]. В посмертных образцах крови обнаружен АВ-CHMINACA ($7,61 \pm 0,59$ нг/мл) и его метаболиты M21 ($56,73 \pm 4,16$ нг/мл), M20, ($2,29 \pm 0,14$ нг/мл) (рисунок 1.17). Вскрытие выявило тяжелый отек легких, приводящий к гипоксической энцефалопатии и системной гипоксемии.

Сообщено о случае суправентрикулярной тахикардии и бреда после приема электронной сигаретной жидкости, содержащей АВ-FUBINACA и ADB-

FUBINACA; обнаруженные при этом концентрации их в сыворотке - 5,6 и 15,6 нг/мл, соответственно [340]. Зафиксированы следующие клинические симптомы после интоксикации синтетическими каннабимиметиками: тахикардия, мидриаз, сонливость, тошнота, рвота и ажитация, головокружение, дезориентация, одышка и боль в груди, потеря сознания, бледность, парестезия, мышечные судороги и короткие провалы в памяти [341]. Наиболее часто сообщаемыми нейropsychиатрическими симптомами являются ЦНС-депрессия (61 %), дезориентация (45 %), генерализованные судороги (27 %). Высказано предположение о большей токсичности этих каннабимиметиков относительно предыдущих, например, JWH-018 [342].

Диапазон найденных концентрации АВ-CHMINACA (N = 33) и АВ-PINACA (N = 25) в крови водителей составлял 0,6- более 10 и 0,6-41,3 нг/мл, соответственно. В 50 и 60 % случаев, соответственно, наблюдался нистагм, а также невнятная речь, замешательство, отсутствие координации [343].

Описан случай непреднамеренной пероральной интоксикации АВ-PINACA 10-месячного ребенка. В сыворотке обнаружены АВ-PINACA (42 нг/мл), метаболит АВ-PINACA N-пентановая кислота (345 нг/мл) [344].

Наиболее распространенным и чаще других обнаруживаемым в биообъектах из рассматриваемых индазол-содержащих синтетических каннабимиметиков является АВ-CHMINACA [342, 345, 346]. АВ-FUBINACA, в числе прочих ПАВ, обнаружен в письмах заключенным в британские тюрьмы [347].

В работе [348] высказана гипотеза о накоплении синтетических каннабимиметиков в жировой ткани и медленном их высвобождении, как это имеет место с ТГК и родственными ему природными каннабиноидами. В посмертной крови человека, страдающего диабетическим кетоацидозом, обнаружены 11 синтетических каннабимиметиков, в том числе, АВ-CHMINACA, АВ-FUBINACA, 5F-APINACA.

Описан случай обнаружения метаболитов АВ-PINACA и митрагинина в моче агентов полиции после рейда в нелегальные лаборатории [349]. Высказано

предположение об их трансдермальном проникновении в организм человека. Уровни АВ-PINACA и его метаболитов, обнаруженные у агентов в моче, были намного ниже уровней у пациентов с интоксикациями СК. Однако количества, при которых могут возникать последствия для здоровья, неизвестны, и для этих соединений в условиях профессиональной деятельности не существует диапазонов биологического загрязнения.

Представлены данные исследований метаболизма *in vitro* с микросомами печени человека [350-352].

АВ-PINACA – N-(карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1H-индазол-3-карбоксамид, CAS: 1445752-09-9, брутто формула: $C_{18}H_{26}N_4O_2$, мол.масса = 330,4 г/моль.

Результаты исследования метаболизма *in vitro* АВ-PINACA с использованием изолированных микросом печени человека описаны в работе [350], предполагаемые пути биотрансформации приведены на рисунке 1.14. Там же отмечена важная роль в метаболизме АВ-PINACA карбоксилэстераз 1 и 2, при этом бутирилхолинэстераза, находящаяся в сыворотке крови, не влияет на гидролитическое расщепление АВ-PINACA.

Takayama T. с соавт. при помощи микросом печени человека исследовали метаболизм АВ-PINACA и АВ-FUBINACA [319] и сделали предварительный вывод, что окисление АВ-PINACA происходило на 1-пентильном остатке, а у АВ-FUBINACA на N-(1-аминоалкил-1-оксобутановом) фрагменте.

Методом ЖХ-МС/МС предложен анализ модельной смеси метаболитов 32 синтетических каннабимиметиков, включая маркеры АВ-PINACA, АВ-FUBINACA, РВ-22, в моче после ЖЖЭ 1-хлорбутан-ИПС (70:30) [353].

В работе [354] описаны профили метаболизма АМВ и 5F-АМВ с помощью инкубации человеческих гепатоцитов и микросом печени методом ЖХ-МС/МС. Также изучены трудности дифференциации метаболитов АМВ и 5F-АМВ от АВ-PINACA/5F-АВ-PINACA, соответственно, поскольку они являются структурными аналогами.

Маркер АВ-PINACA так же может быть идентифицирован в волосах потребителей курительных смесей [324, 325].

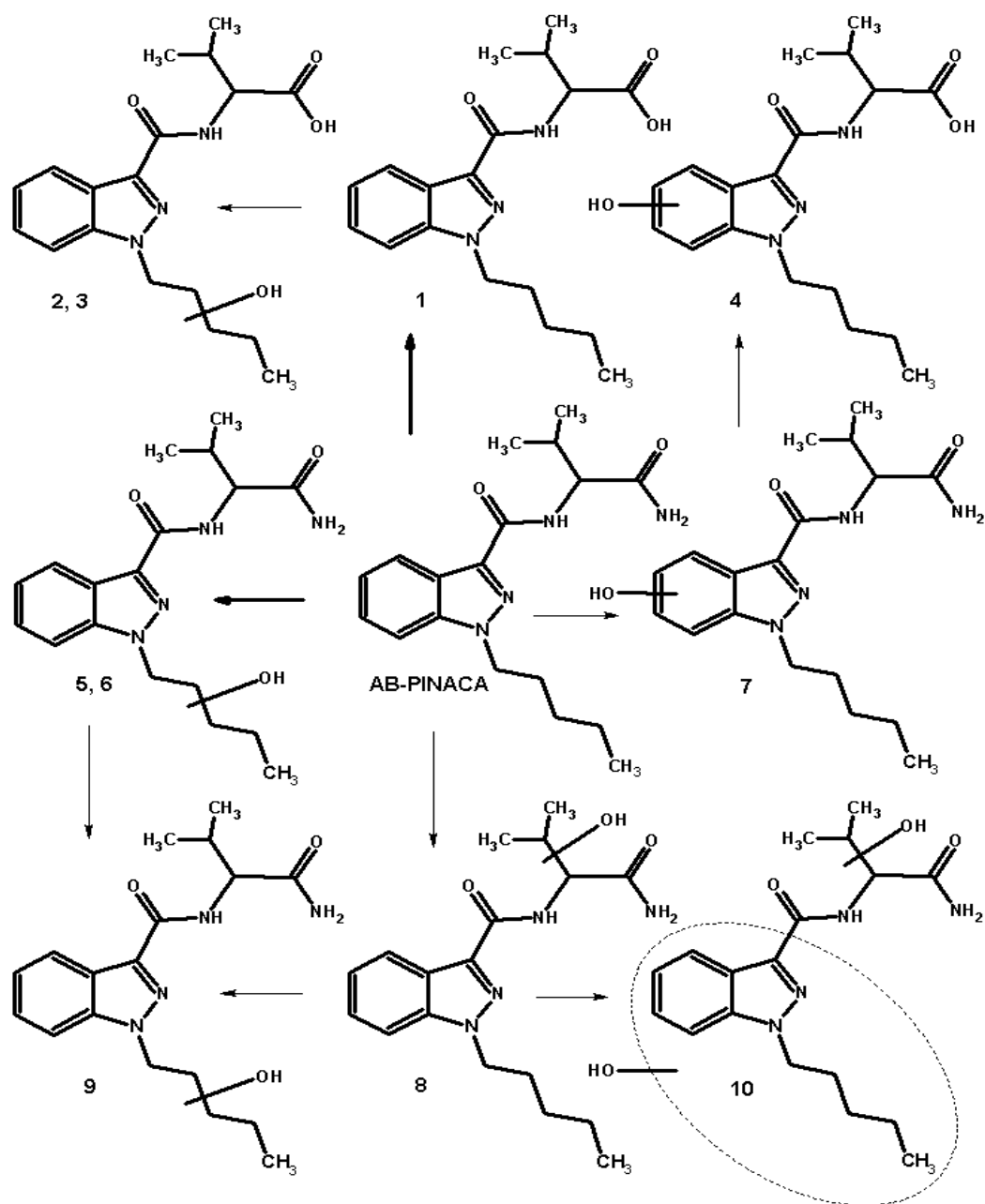


Рисунок 1.14 – Предполагаемые пути метаболизма фазы I АВ-PINACA по данным работы [350] (жирными стрелками выделены основные направления)

5F-AB-PINACA. Модификацией АВ-PINACA является его 5-фторированное производное – 5F-AB-PINACA – N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(5-фторпентил)-1H-индазол-3-карбоксамид (5F-AB-PINACA), брутто формула: $C_{18}H_{25}FN_4O_2$, мол. масса = 348,4 г/моль.

Метаболический профиль каннабимиметика 5F-AB-PINACA после инкубации с гепатоцитами человека описан в работе [351]; было обнаружено 18 метаболитов, в том числе конъюгированных с глюкуроновой кислотой. Основные метаболиты приведены на рисунке 1.15. Авторами отмечено, что метаболиты 10, 11 и 18 не несут информации об оригинальной структуре исходного каннабимиметика, что влияет на правильность интерпретации результатов. Рекомендовано проводить определение метаболита 15, как дополнительного уникального метаболита.

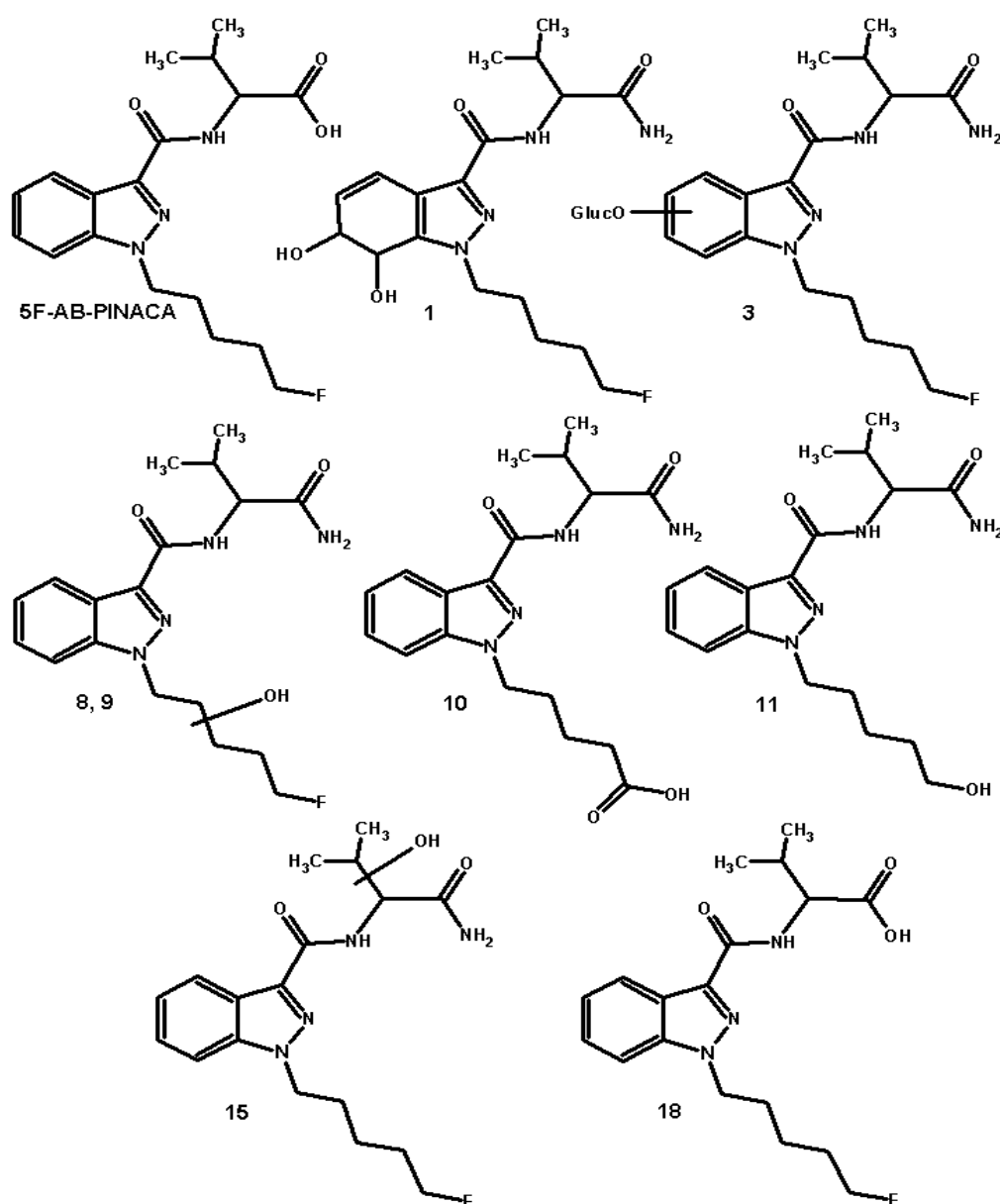


Рисунок 1.15 – Структурные формулы 5F-AB-PINACA и ряда идентифицированных метаболитов по данным работы [351] (Gluc – глюкуронид)

AB-CHMINACA – N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(циклогексилметил)-1H-индазол-3-карбоксамид, CAS: 1185887-21-1, брутто формула: $C_{20}H_{28}N_4O_2$, мол. масса = 356,5 г/моль.

AB-CHMINACA представляет собой модификацию структуры AB-PINACA, полученную путем варьирования заместителя у атома азота 1 в индазольном фрагменте (рисунок 1.16).

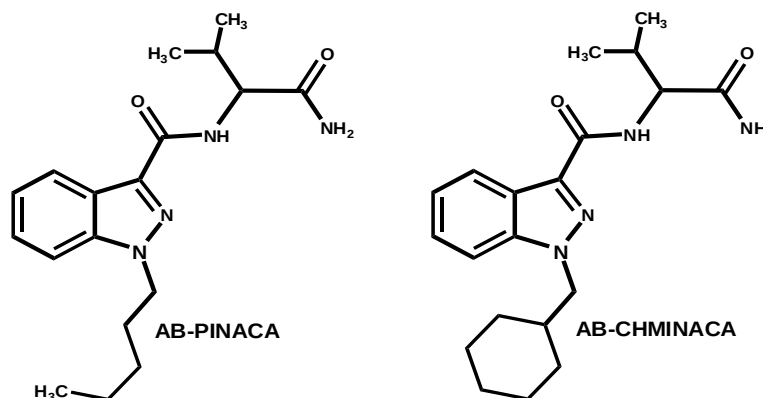


Рисунок 1.16 – Химические структуры AB-PINACA и AB-CHMINACA

Пути метаболизма *in vivo* и *in vitro* каннабимиметика AB-CHMINACA с использованием микросом печени человека описаны в работе [352]; идентифицировано 26 метаболитов, в том числе конъюгированных с глюкуроновой кислотой. Основные метаболиты приведены на рисунке 1.17; авторами отмечается преимущественное конъюгирование метаболитов, имеющих карбоксильную группу. Более половины метаболитов, содержащих карбоксильную группу, подвергаются конъюгации, в то время как моногидрокси- и дигидрокси- метаболиты с терминальной амидной группой образуют конъюгаты в меньших количествах. Большинство метаболитов, выявленных в исследовании *in vitro*, были обнаружены в моче потребителя AB-CHMINACA.

Представлены разработка и валидация метода скрининга и подтверждения ряда синтетических каннабимиметиков в цельной крови человека с анализом ЖХ-МС/МС. Наиболее часто встречающимися были: AB-CHMINACA (18,6 %), АБР-CHMINACA (15 %), XLR-11 (5,5 %), AB-FUBINACA (4,5 %), AB-PINACA (3,9 %) и ADB-FUBINACA (2,3 %) [355].

В исследовании [356] в 15 случаях доказано присутствие АВ-CHMINACA или одного из его предсказанных метаболитов. Образцы сыворотки или плазмы у 13 пациентов имели среднюю концентрацию 8,3 нг/мл, 2 образца содержали АВ-CHMINACA в незначительных количествах (0,3 нг/мл). Все 15 образцов содержали предсказанный метаболит АВ-CHMINACA (M21 рисунок 1.17).

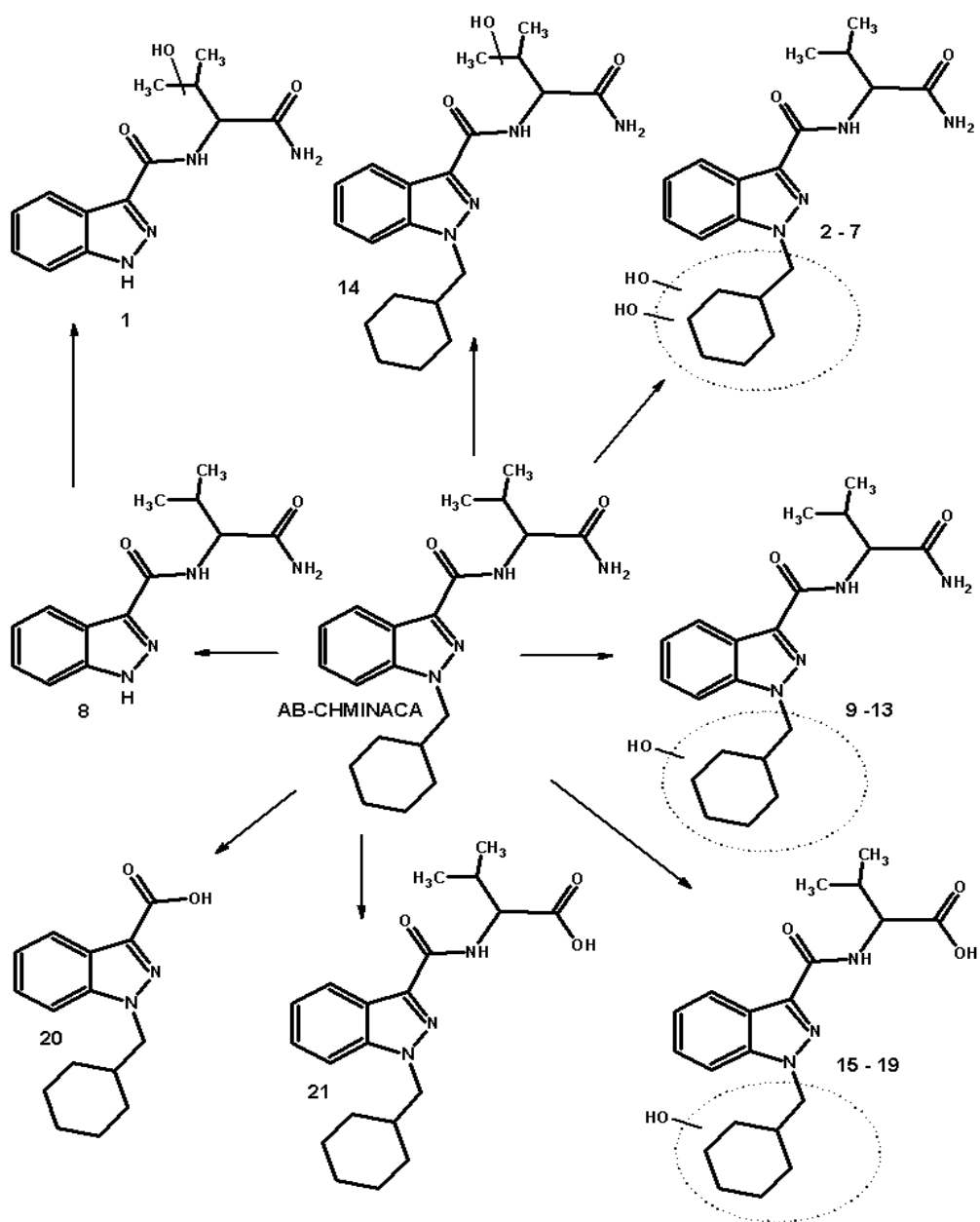


Рисунок 1.17 – Идентифицированные метаболиты фазы I биотрансформации АВ-CHMINACA по данным работы [352]

Метод ЖХ-МС/МС после ЖЖЭ использован в работе [316] для обнаружения и количественной оценки 93 синтетических каннабимиметиков в

сыворотке человека. 33,8 % реальных объектов были признаны положительными по меньшей мере для одного каннабимиметика, из которых MDMB-CHMICA, AB-CHMINACA и 5 F-PB-22 были наиболее часто встречающимися.

AB-CHMINACA является наиболее популярным синтетическим каннабимиметиком в Южной Корее с 2014 года. Представлен ЖХ-МС/МС метод обнаружения AB-CHMINACA и его 6 метаболитов в волосах. В 37 образцах волос пользователей синтетических каннабимиметиков были обнаружены AB-CHMINACA и два его метаболита (M20 и M21 рисунок 2.10). Концентрация исходного препарата была намного выше концентрации метаболитов, и количество AB-CHMINACA M21 было больше, чем AB-CHMINACA M20 во всех образцах. Другие метаболиты не обнаружены [346].

AB-FUBINACA (синоним: MN-35) – N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-[(4-фторфенил)метил]-1H-индазол-3-карбоксамид или N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-(4-фторбензил)-1H-индазол-3-карбоксамид, CAS: 1185282-01-2, брутто формула: $C_{20}H_{21}FN_4O_2$, мол. масса = 368,4 г/моль.

Метаболизм каннабимиметика AB-FUBINACA на изолированных микросомах печени человека описан в работе [350], предполагаемые пути биотрансформации приведены на рисунке 1.18. Отмечена важная роль в метаболизме AB-FUBINACA карбоксилэстераз 1 и 2, при этом бутирилхолинэстераза сыворотки крови на гидролитическое расщепление AB-FUBINACA не влияет.

В исследовании [357] представлены метаболиты AB-FUBINACA *in vivo* в моче крыс и его влияние на экспрессию генов в печени и сердце.

AB-FUBINACA – один из трех СК, чаще всего встречающихся при изъятиях и токсикологическом скрининге наркотиков в Швеции (2013-2014 гг.). Исследован метаболизм при помощи микросом печени; в 28 реальных образцах мочи ВЭЖХ-QqTOF-МС идентифицированы три метаболита (AB-FubOH, гидроксированный по индазольному циклу, M4 и M1 рисунок 1.18) вместе с исходным соединением, подходящие в качестве маркеров приема AB-FUBINACA.

Всего сообщалось о 15 метаболитах АВ-FUBINACA, включая гидроксилирование на индазольном кольце и аминоксобутановой части, деалкилирование и гидролиз первичного амида. Никаких модификаций фторбензильной боковой цепи не обнаружено [358].

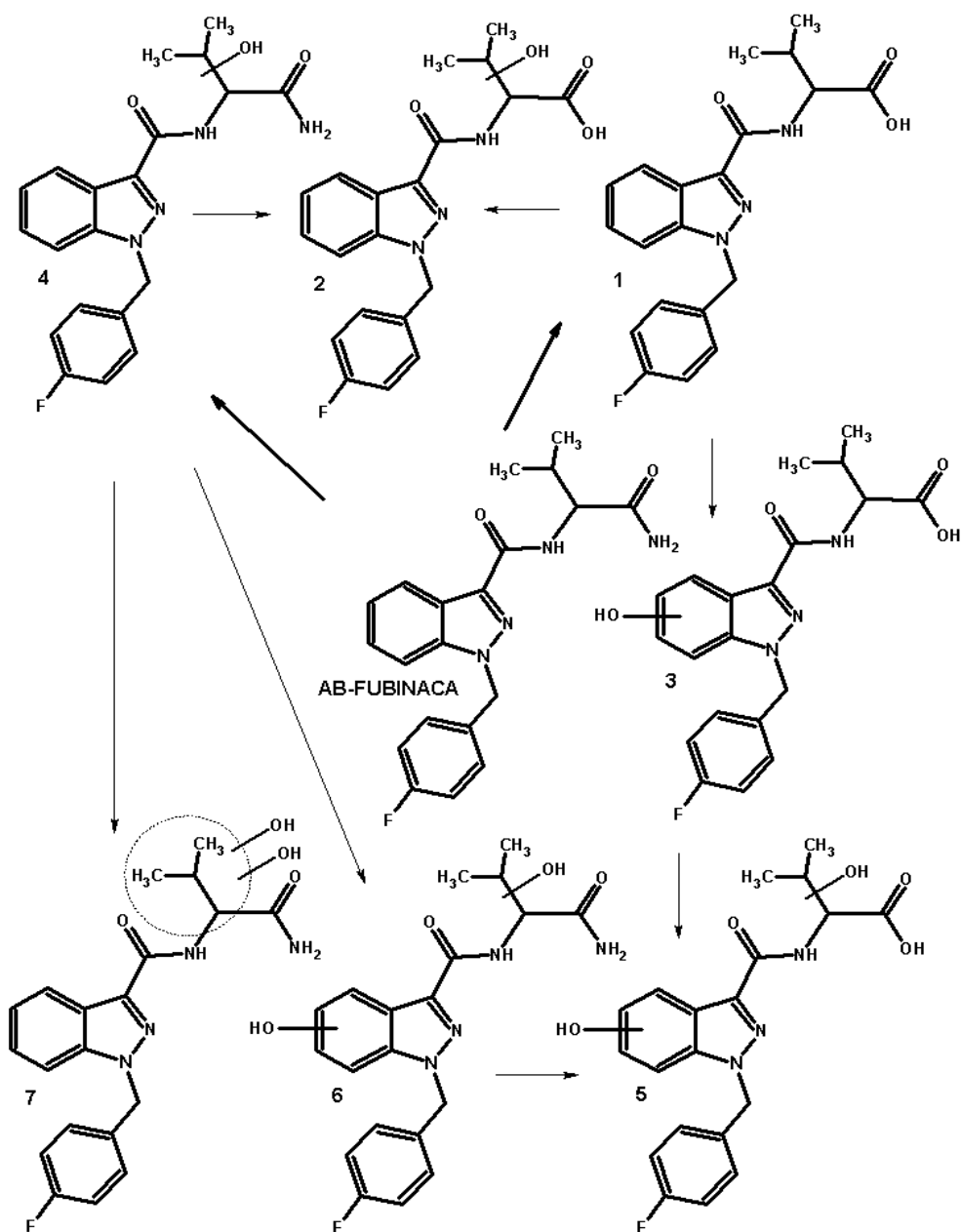


Рисунок 1.18 – Предполагаемые пути метаболизма фазы I биотрансформации АВ-FUBINACA по данным работы [350] (жирными стрелками выделены основные направления)

Представлен количественный метод анализа СК ЖХ-МС/МС в моче после гидролиза β -глюкуронидазой (14 исходных СК и 15 метаболитов, включая серии XLR, AM, JWH, UR, RCS, PB, HU и AB-FUBINACA [359].

Разработан ЖХ-МС/МС скрининг для 69 ПАВ (из них 28 синтетических каннабимиметика) в крови, позволяющий идентифицировать и количественно определить AB-FUBINACA в реальном образце после нефатального отравления [360].

В работе [361] представлен количественный метод скрининга метаболитов в моче часто изымаемых синтетических каннабимиметиков в Норвегии (AB-FUBINACA, AB-PINACA, AB-CHMINACA, AM-2201, АКВ48, 5F-АКВ48, ВВ-22, линейка JWH, PB-22, 5F-PB-22, RCS-4, THJ-2201 и UR-144) с использованием ВЭЖХ-QqTOF-МС после гидролиза β -глюкуронидазой и ТФЭ на планшетах Oasis® HLB PRiME.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературных источников показал, что исследования на наличие токсикантов с использованием ТФЭ носят направленный характер и, как правило, имеют своей целью определение конкретного вещества (иногда его метаболита/ов) или группы веществ (опиаты, барбитураты, трициклические антидепрессанты и др.). В публикациях представлены различные патроны для ТФЭ, часто без объяснения причины их выбора и сравнения с иными; множество разных элюентов и их смесей, промывочных и буферных растворов, различные объемы взятых объектов, сочетание с дополнительными видами очистки, иногда многостадийной и т.п. Публикации, касающиеся скрининговых исследований, немногочисленны, а между тем, именно скрининг широкого круга лекарственных и наркотических веществ является наиболее востребованным в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологических объектов.

2. По литературным данным установлено, что для скрининга веществ кислотного, нейтрального и основного характера первой линией выбора считают бифункциональные смешанные сорбенты на основе силикагеля. Поэтому для

своих исследований широкого круга токсикантов и их метаболитов мы выбрали патроны со смешанной фазой (C8 + катионит).

3. При проведении обзора публикаций отмечено, что большая часть работ посвящена анализу мочи, меньшая – сыворотке и плазме, анализу тканей, волос. При этом только незначительная часть работ посвящена исследованиям крови в силу сложностей, возникающих при ее пробоподготовке. Поэтому разработка методики скринингового исследования крови с использованием ТФЭ для решения актуальной проблемы ХТА и СХА легла в основу наших исследований.

4. Анализ данных литературы позволил сделать вывод о значительном потенциале ТФЭ в отношении исследования биотрансформации новых психоактивных веществ при их постоянно расширяющемся ассортименте в современных условиях рынка наркотических средств.

5. Анализ литературных источников показал широкое использование в химико-токсикологическом анализе различных методов инструментального определения токсикантов, однако для скрининговых исследований предпочтение отдано методу газовой хроматомасс-спектрометрии ввиду универсальности, высокой степени информативности и надежности метода. Кроме того, с учетом распространенности оборудования для ГХ-МС в России, исследования с его участием приобретают особую практическую значимость в экспертной практике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы, реактивы, оборудование и объекты исследования

Оборудование

- Газовый хроматограф 7820 Agilent Technologies с масс-селективным детектором 5975 (Agilent, США). Колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм (Agilent, США);
- система с вакуумной камерой на 12 позиций (Supelco, США);
- форвакуумный насос (AIR CADET, США);
- патроны для ТФЭ Sampli Q Evidex – 200 мг-3 мл (Agilent, США);
- микроволновая печь Rolsen MS1770SA (Россия);
- термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия);
- одноканальный испаритель ПЭ-2300 (ОАО «Экрос», Россия);
- микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия);
- полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4-40, 40-200 мкл и 0,2-1, 1-5 мл.
- газовый хроматограф 7890A Agilent Technologies с трехквадрупольным детектором Agilent 7000B (Agilent, США). Колонка капиллярная HP-5MS, внутренний диаметр 0.25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0.25 мкм;
- газовый хроматограф Agilent 6890, оснащенный автоматическим дозатором Agilent 7683B (Agilent, США). Колонка капиллярная HP-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки 0,25 мкм и масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975;
- газовый хроматограф Shimadzu с масс селективным детектором PQ 5050 с капиллярной колонкой EVDX-5MS длиной 25 м, внутренним диаметром 0,2 мм и толщиной пленки 0,33 мкм;

- жидкостный хроматограф 1200 Agilent Technologies с диодно-матричным и масс-селективным 6120А детекторами. Для аналитических целей применяли хроматографическую колонку (150 х 2,1 мм) с обращено-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C18 Narro-Bore (5 мкм), а для фракционирования – хроматографическую колонку (150 х 4,6 мм) с обращено-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм);
- мембранный фильтр Econofilter 25/0,45 mm RC (Agilent Technologies).

Используемое оборудование сертифицировано, поверено и откалибровано в соответствии с требованиями и стандартами Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии.

Материалы, реактивы

Субстанции, лекарственные препараты:

- амфетамина сульфата субстанция (ГФ X, ФС 513) [363];
- изониазида субстанция (ГФ XII, ФС 42-0236-07) [364];
- кеторолака трометамин субстанция («Чемо Иберика С. А.», Испания);
- кислоты салициловой субстанция (ГФ XIII, ФС.2.1.0033.15) [362];
- кокаина гидрохлорида субстанция (ГФ X, ФС 167) [363];
- морфина гидрохлорида субстанция (ГФ X, ФС 413) [363];
- фенобарбитала субстанция (ГФ XIII, ФС.2.1.0041.15) [362];
- этилморфина гидрохлорида субстанция (ГФ X, ФС 41) [363];
- амитриптилин (ампулы, 2 мл с содержанием амитриптилина гидрохлорида 10 мг/мл, ЗЕНТИВА, Чешская Республика);
- диклофенак (ампулы 3 мл с содержанием натрия диклофенака 25мг/мл, Немofarm, Сербия);
- кетопрофен (ампулы, 2 мл с содержанием кетопрофена 50 мг/мл, Синтез АКОМП, Россия);
- метиндол (ампулы, 2 мл с содержанием индометацина 30 мг/мл, Polfa, Польша);

- реланиум (ампулы, 2 мл с содержанием диазепама – 5 мг/мл, Polfa, Польша);
- ибупрофен (таблетки, 200 мг, Борисовский завод, Россия);
- напроксен (таблетки, 25 мг, Фармстандарт ООО, Россия);
- бензоилэкгонин, экгонин готовили из кокаина гидрохлорида согласно публикации [371], чистота подтверждена методом ГХ-МС;
- N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин были получены препаративно, их чистота подтверждена методом ГХ-МС;

Реактивы для дериватизации:

- 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанол (Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия);
- бис-триметилсилил-трифторацетамид (BSTFA), с 1% триметилхлорсилана (Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия);
- N,O-бис(триметилсилил) ацетамид (BCA) (Sigma-ALDRICH);
- пентафторпропионовый ангидрид (Sigma-ALDRICH);
- трифторуксусный ангидрид (Sigma-ALDRICH);
- пропионовый ангидрид (Ferak, Германия);
- уксусный ангидрид [108-24-7]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- метилйодид (Вектон, Шосткинский завод химреактивов, Россия; Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия);

Реактивы и растворители:

- N-этилбензиламин (Acros Organics, Бельгия);
- тетраметиламмония гидроксид (ICN, США);
- триэтиламин (х.ч.);
- 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота (ICN, США);
- динонилфталат (Merck, Германия)
- β -глюкуронидаза, Type HP-2, From Helix Pomatia, 101400 ЕД/мл (Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия);

- аммиак водный. Аммиака раствор концентрированный 25% (ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15) [362];
- уксусная кислота безводная [64-19-7]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- натрия гидроокись [1310-73-2]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- хлористоводородная кислота 25%. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- калия карбонат [584-08-7]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- натрия гидрокарбонат [144-55-8]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- натрия сульфат безводный [7757-82-6]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- пиридин [110-86-1]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- диметилсульфоксид [67-68-5]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- азот особой чистоты [7727-37-9]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- гелий для хроматографии [7440-59-7]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- метиленхлорид [75-09-2]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- 2-пропанол [67-63-0]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- хлороформ [67-66-3]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- этанол [64-17-5]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- гексан [110-54-3]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- этилацетат [141-78-6]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- метанол [67-56-1]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- бутанол [71-36-3]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- бутилацетат [123-86-4]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362];
- муравьиная кислота [64-18-6]. ГФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 [362].

Пиридин обезвоживали с помощью натрия гидроксида в течение суток и перегоняли; этилацетат – безводным сульфатом натрия; калия карбонат – при 180 °С в течение 2 часов; ацетон и диметилсульфоксид высушивали в течение 1 суток и хранили над молекулярными ситами.

Для проведения эксперимента были приготовлены буферные растворы:

- 0,067 М фосфатный буфер pH 6,0 [366];
- 0,067 М фосфатный буфер pH 5,4 (ГФ XIII, ФС.1.3.0003.15) [362];

- 0,067 М фосфатный буфер pH 4,8 [366];
- буферный раствор pH 3,0 (0,1 М цитратный буфер (pH = 3,0)) (ГФ XIII, ФС.1.3.0003.15) [362];
- 0,1 М цитратный буфер (pH = 4,0) [366];
- 0,05 М буферный раствор ацетата аммония (pH 3,8) [367].

Для проведения эксперимента были приготовлены спиртовые растворы стандартов:

- динонилфталат 1 мг/мл в качестве внешнего стандарта (ISTD);
- индометацин 0,1 мг/мл, кеторолак 0,02 мг/мл, салициловая кислота 0,1 мг/мл, фенobarбитал 0,2 мг/мл;
- amitриптилин 0,02 мг/мл, амфетамин 0,02 мг/мл, diaзепам 0,02 мг/мл, морфин 0,01 мг/мл;
- изониазид 0,06 мг/мл;
- кокаин 0,01 мг/мл, бензоилэкгонин 0,01 мг/мл, экгонин 0,005 мг/мл;
- гексенал 0,2 мг/мл в качестве внутреннего стандарта (BC);
- этилморфин 0,02 мг/мл (BC);
- N-этилбензиламин 0,01 мг/мл (BC);
- ибупрофен, напроксен 0,2 мг/мл;
- кетопрофен, диклофенак, кеторолак, индометацин 0,1 мг/мл;
- 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота 1 мкг/мл;
- N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин 0,5 мг/мл;
- N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин 0,5 мг/мл.

Объекты исследования

Модельные смеси цельной крови и мочи с различной концентрацией выбранных для исследования лекарственных и наркотических веществ. Для приготовления модельных образцов использовалась кровь и моча здоровых доноров, не употреблявших в течение месяца лекарственных и наркотических веществ.

Биологические объекты – реальные образцы крови и мочи от живых лиц и трупов, поступивших в СХО на судебно-химическое исследование.

Интактную кровь до исследования хранили при – 18 °С. Пробы мочи до исследования хранились при + 4 °С.

2.2 Методики проведения пробоподготовки крови

Пробоподготовка крови методом ТФЭ. Во флакон вносили 0,5 мл крови и прибавляли по 50 мкл спиртовых растворов индометацина (0,1 мг/мл), кеторолака (0,02 мг/мл), салициловой кислоты (0,1 мг/мл), фенobarбитала (0,2 мг/мл), амитриптилина (0,02 мг/мл), амфетамина (0,02 мг/мл), диазепама (0,02 мг/мл), морфина (0,01 мг/мл), изониазида (0,06 мг/мл), кокаина (0,01 мг/мл), бензоилэкгонины (0,01 мг/мл), экгоны (0,005 мг/мл), 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН в соответствии с кодированным уровнем). Флаконы плотно закупоривали винтовыми крышками с резиновой прокладкой и помещали в ультразвуковую баню на 5 минут. Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, центрифугат отделяли от осадка с использованием полуавтоматической пипетки-дозатора.

Процедура твердофазной экстракции (базовый уровень, все факторы имеют уровень 0). Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95 % этанола и 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 5,4). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно со скоростью 2-3 мл/мин по 1 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 5,4), 0,01 М раствора уксусной кислоты и 10 % этанола. Сушку патрона проводили под вакуумом в течение 20 минут.

Элюат I. Элюировали дважды по 2 мл смеси н-гексан – этилацетат (3:1). Промывку осуществляли 1 мл 50 % раствора метанола.

Элюат II. Элюировали дважды по 2 мл смеси дихлорметан – 2-пропанол–25 % аммиак (3:1:0,1).

Процедура твердофазной экстракции (после оптимизации). Кондиционирование сорбента проводили путем последовательного пропускания

через картридж 2 мл 95 % этанола и 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку осуществляли последовательно со скоростью 2-3 мл/мин: 1 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8), 1 мл 10 % этанола. Сушку патрона проводили под вакуумом в течение 20 минут.

Элюат I. Элюировали дважды по 2 мл смеси н-гексан – этилацетат (2:1).

Элюат II. Элюировали дважды по 2 мл смеси дихлорметан – 2-пропанол – 25 % аммиак (2:1:0,1).

Для оценки эффективности экстракции к элюатам I и II прибавляли 20 мкл спиртового раствора 1 мг/мл динонилфталата (ДНФ). Далее элюаты I и II испаряли в токе азота при 40 °С.

Пробоподготовка крови с использованием оптимизированной методики скрининга. Во флакон вносили 0,5 мл крови, прибавляли по 20 мкл спиртовых растворов внутренних стандартов этилморфина гидрохлорида (0,02 мг/мл) и N-этилбензиламина (0,01 мг/мл), и 50 мкл спиртового раствора гексенала (0,2 мг/мл) (п. 2.1), 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8). Флаконы плотно укупоривали винтовыми крышками с резиновой прокладкой и помещали в ультразвуковую баню на 5 минут. Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут, 2 мл центрифугата отделяли от осадка с использованием полуавтоматической пипетки-дозатора.

Дальнейшая обработка соответствовала методике **процедуры твердофазной экстракции (после оптимизации)**.

Пробоподготовка крови для количественной оценки некоторых НПВС. К образцам крови по 0,5 мл прибавляли 50 мкл спиртовых растворов внутреннего стандарта (гексенал 200 мкг/мл), 20 или 200 мкл смеси стандартов НПВС, содержащей: ибупрофен и напроксен (0,2 мг/мл), кетопрофен, диклофенак, кеторолак и индометацин (0,1 мг/мл) и по 2 мл 0,067 М буфера фосфатного (рН 4,8). Флаконы плотно укупоривали винтовыми крышками с резиновой прокладкой и помещали в ультразвуковую баню на 5 минут. Дальнейшая

обработка соответствовала методике **процедуры твердофазной экстракции (после оптимизации)**.

Элюирование осуществляли дважды порциями по 2 мл (тип и состав 4 элюентов приведены в п. 3.3.2).

К элюату прибавляли 20 мкл спиртового раствора 1 мг/мл ДНФ. Далее элюат испаряли досуха в токе азота при 40 °С.

2.3 Методики проведения пробоподготовки мочи

Подготовка проб мочи с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ для исследования метаболитов синтетических каннабимиметиков. К пробам мочи объемом по 0,5 мл прибавляли по 50 мкл спиртовых растворов внутренних стандартов: этилморфина гидрохлорида (0,02 мг/мл), N-этилбензиламина (0,01 мг/мл) и гексенала (0,2 мг/мл). Далее проводили предварительную подготовку образцов с применением ферментативного гидролиза. К смеси добавляли 250 мкл 0,067 М фосфатного буфера рН 6 и 25 мкл β-глюкуронидазы, флакон укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и выдерживали при 45 °С в течение 2 часов.

К образцам мочи без гидролиза и к смеси после гидролиза прибавляли 2 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 4,8). Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяли от осадка с использованием полуавтоматической пипетки-дозатора.

Кондиционирование сорбента осуществляли путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95 % этанола и 2 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 4,8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку проводили последовательно: 1 мл 0,067 М фосфатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 10 % этанола. Сушку патрона производили под вакуумом в течение 10-15 минут. Элюат I получали двукратным пропусканием через патрон смеси н-гексан–этилацетат (3:1) по 2 мл. Элюат II – двукратным пропусканием через патрон смеси дихлорметан – 2-пропанол – 25 % аммиак (4:1:0,1) по 2 мл. Элюаты I и II испаряли в токе азота при 40 °С.

Методики определения природных каннабиноидов, синтетических каннабимиметиков, скрининга с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ

Метод 1 (методика определения классических каннабиноидов). Во флакон объемом 10 мл помещали 1 мл метанола, 1 мл мочи, прибавляли 50 мкл раствора 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в этаноле (1 мкг/мл) и 25 мкл смеси стандартов N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина (0,5 мг/мл) и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина (0,5 мг/мл) в этаноле, 100 мкл 50 % раствора NaOH и перемешивали. Флакон плотно укупоривали винтовыми крышками с резиновой прокладкой и помещали в термоблок на 10 минут при 60 °С. После охлаждения флакон вскрывали, прибавляли 6 н раствор HCl до pH 2-3 и дважды экстрагировали смесью н-гексан-этилацетат (7:1) порциями по 5 мл. Верхний слой отделяли с использованием полуавтоматической пипетки-дозатора, выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °С).

Метод 2 (методика определения синтетических каннабимиметиков с использованием щелочного гидролиза). Во флакон помещали 2 мл мочи, прибавляли 50 мкл раствора 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в этаноле (1 мкг/мл) и 25 мкл смеси стандартов N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина (0,5 мг/мл) и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина (0,5 мг/мл) в этаноле, 100 мкл 50 % раствора NaOH и перемешивали. Флакон плотно укупоривали винтовыми крышками с резиновой прокладкой и помещали в термоблок на 10 минут при 60 °С. После охлаждения флакон вскрывали, прибавляли 6 н раствор HCl до pH 2-3 и дважды экстрагировали смесью н-гексан-этилацетат (7:1) порциями по 5 мл. Верхний слой отделяли с использованием полуавтоматической пипетки-дозатора, выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °С).

Метод 3 (скрининговая методика с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ). К пробам мочи объемом по 0,5 мл прибавляли 50 мкл раствора 1 мкг/мл 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты в

этаноле и 25 мкл смеси стандартов по 0,5 мг/мл N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина в этаноле. Предварительную подготовку образцов с применением ферментативного гидролиза и ТФЭ проводили аналогично п. 2.3 до стадии сушки патрона. Затем элюат I получали двукратным пропусканием через патрон смеси *n*-гексан – этилацетат (2:1) по 2 мл. Элюат II – двукратным пропусканием через патрон смеси дихлорметан – 2-пропанол – 25 % аммиак (2:1:0,1) по 2 мл. Элюаты I и II испаряли в токе азота при 40 °С.

Подготовка образцов мочи при исследованиях метаболитов ацетилфентанила

Подготовка образцов мочи с использованием ЖЖЭ и кислотного гидролиза. К 1 мл мочи добавляли 50 мкл раствора этилморфина гидрохлорида (0,02 г/л) в этаноле, 0,2 мл конц. HCl. Флакон герметично укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и нагревали на кипящей водяной бане 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляли 0,25 мл 30 %-ного раствора NaOH и 100 мг NaHCO₃ до образования насыщенного раствора последнего. Проверяли pH раствора (pH = 8,4-8,8) и экстрагировали 5 мл смеси хлороформ-бутанол (9:1). Встряхивали в течение 10 мин и затем центрифугировали со скоростью 3000 об/мин. 5 мин. Органический экстракт пропускали через безводный сульфат натрия, выпаривали в токе азота досуха при температуре не выше 40 – 50 °С.

Подготовка образцов мочи с использованием ТФЭ и ферментативного гидролиза. К пробе мочи объемом 1 мл прибавляли раствор этилморфина гидрохлорида (0,02 г/л) в этаноле, 1 мл 0,067 М фосфатного буферного раствора с pH 4,8, 20 мкл глюкуронидазы, смесь выдерживали в течение 60 мин при 55 °С. Дальнейшую пробоподготовку проводили согласно **подготовке проб мочи с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ для исследования метаболитов синтетических каннабимиметиков.**

Фракционирование экстрактов мочи. Фракционирование экстракта из 5 мл мочи после кислотного гидролиза проводили на жидкостном хроматографе. Сухой остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы (20 об. % метанола, 80 об. % 0,2 %-ного водного раствора муравьиной кислоты), фильтровали через мембранный фильтр Econofilter 25/0,45 mm RC и пробу объемом 50 мкл вводили в колонку хроматографа с помощью автоматического дозатора. Температура колонки 40 °С. Элюенты – 0,2 %-ный водный раствор муравьиной кислоты (А) и метанол (В), расход элюента 1 мл/мин, градиентный режим: в течение 20 мин содержание компонента А изменяли от 80 до 60 об. %. Начиная со 2 минуты, отбирали фракции по 0,5-1 мл, ориентируясь на показания диодно-матричного детектора. Фракции разделяли на 5 частей для анализа методом ВЭЖХ и получения разных производных, удаляли растворитель в токе азота.

2.4 Получение дериватов лекарственных и наркотических веществ при подготовке проб крови

Метилирование. К сухому остатку элюата I прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20 – 25 мг безводного карбоната калия, флакон герметично закрывали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и нагревали при 60 °С в течение 1 часа в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фазу реакционной смеси, переносили в виалу и испаряли в токе азота при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата, 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС.

Ацетилирование и этерификация. Стадия 1 (ацетилирование). К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида (замывая стенки флакона, далее везде по тексту), флакон плотно укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и выдерживали 30 минут при 80 °С. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (до 40 °С).

Стадия 2 (этерификация). К сухому остатку прибавляли 20 мкл 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанола и 60 мкл уксусного ангидрида, флакон плотно

укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и выдерживали 30 минут при 60 °С. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (до 40 °С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата, 1 мкл вводили в инжектор ГХ-МС.

2.5 Получение дериватов метаболитов синтетических каннабимиметиков, природных каннабиноидов и ацетилфентанила при подготовке проб мочи

Дериватизация метаболитов синтетических каннабимиметиков

Метилирование осуществляли аналогично п. 2.4.

Ацетилирование. К сухому остатку элюата II прибавляли 40 мкл безводного пиридина и 60 мкл уксусного ангидрида, виалу плотно укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ – печи с мощностью 560 Вт в течение 5 минут. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (не выше 40 °С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель хромато-масс-спектрометра.

Получение триметилсилиловых эфиров. К сухому остатку элюата I или II прибавляли 100 мкл BSTFA, содержащего 1 % триметилхлорсилана, флакон герметично закрывали винтовой крышкой с резиновой прокладкой, перемешивали на микровстряхивателе и нагревали при 80 °С в течение 60 мин в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Получение производных (дериватов) метаболитов синтетических каннабимиметиков и природных каннабиноидов

Метод 1 (методика определения классических каннабиноидов). К сухому остатку экстракта прибавляли 180 мкл безводного диметилсульфоксида и 20 мкл 25 % метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида, перемешивали, через 2 минуты прибавляли 30 мкл иодистого метила, флакон укупоривали винтовой крышкой с резиновой прокладкой и выдерживали 20 минут при комнатной температуре. Далее к дериватизационной смеси прибавляли

4 мл гексана и экстрагировали 5 минут (при интенсивном перемешивании). Гексановый экстракт отделяли при помощи полуавтоматической пипетки-дозатора и выпаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха (40 °С). Сухой остаток дериватизированного образца растворяли в 75 мкл этилацетата и 3 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

Метод 2 (методика определения синтетических каннабимиметиков с использованием щелочного гидролиза). Метилирование осуществляли аналогично п. 2.4.

Метод 3 (скрининговая методика с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ).

Метилирование осуществляли аналогично п. 2.4. Далее после перенесения жидкой фракции реакционной смеси в чистую вialsу прибавляли 20 мкл спиртового раствора 1 мг/мл ДНФ и испаряли в токе азота при 40 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1-2 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

Ацетилирование осуществляли аналогично п. 2.5. Далее после охлаждения флакон вскрывали, прибавляли 20 мкл спиртового раствора 1 мг/мл ДНФ и выпаривали избыток реагентов в токе азота (не выше 40 °С). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель хроматографа с масс-спектрометрическим детектором.

Дериватизация экстрактов мочи при исследовании метаболитов ацетилфентанила

Ацетилирование. К сухому остатку элюата прибавляли 50 мкл смеси (3:2) уксусного ангидрида с пиридином, емкость закрывали и нагревали в термоблоке в течение 20 мин при 80 °С. После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в потоке азота при 40–50 °С.

Получение пропионовых производных. К сухому остатку элюата прибавляли по 40 мкл пропионового ангидрида и триэтиламина, емкость закрывали и нагревали в термоблоке в течение 20 мин при 90 °С. После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в потоке азота при 40–50 °С.

Получение пентафторпропионовых и трифторуксусных производных. К сухому остатку элюата прибавляли по 50 мкл безводного этилацетата и соответствующего ангидрида, емкость закрывали и нагревали в термоблоке в течение 30 мин при 60 °С. После остывания емкость открывали и удаляли избыток реактивов в токе азота при 40–50 °С.

Получение триметилсилильных производных. К сухому остатку элюата в полипропиленовой пробирке прибавляли по 50 мкл безводного этилацетата и БСА, пробирку нагревали в термоблоке в течение 20 мин при 70 °С.

2.6 Режимы работы приборов и программное обеспечение исследований

Режим работы газового хроматографа Agilent 7820 с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором 5975

Скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин, ввод пробы в режиме split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода). Температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 250 и 280 °С. Температура колонки начальная 70 °С в течение 2 мин и прогрев до 280 °С со скоростью 20 град/мин, выдержка при конечной температуре 14,5 мин. Напряжение на умножителе масс-спектрометрического детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора. Температура источника ионов 230 °С, энергия ионизации 70 эВ. Регистрация масс-спектров для метильных и ацетильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42 – 450 а.е.

Режим работы газового хроматографа Agilent 6890 с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором 5975 (для выявления метаболитов ацетилфентанила).

Температура устройства ввода 260 °С, ввод пробы без деления потока с задержкой включения делителя 2 мин в соотношении потоков 1/20. Расход газа-носителя (гелий) 1,3 мл/мин, режим постоянного потока. Температура колонки: начальная 80 °С (1 мин), нагрев со скоростью 40 град/мин до 200 °С и нагрев со скоростью 12,5 град/мин до 300 °С с выдержкой при конечной температуре 6 мин.

Температура источника ионов 230 °С, энергия ионизации 70 эВ. Регистрация масс-спектров в режиме сканирования ионов от 50 до 650 а.е.м. Напряжение на электронном умножителе на 200 В выше величины автоматической настройки.

Режим работы газового хроматографа 7890А с трехквадрупольным детектором Agilent 7000В (Agilent, США) (для исследований метаболизма СК АВ-FUBINACA) аналогичен режиму для ГХ Agilent 6890. Температура ионного источника 230 °С, температура квадрупольей 150 °С. Энергия ионизации в ионном источнике 70 эВ, энергия столкновительной диссоциации подбиралась для получения наиболее информативного спектра иона-предшественника. Третий квадруполь работал в режиме сканирования от 50 до 330 m/z. В ходе эксперимента в ячейку подавались гелий с потоком 2,25 мл/мин и азот 1,5 мл/мин.

Режим работы газового хроматографа Shimadzu с масс-спектрометрическим детектором PQ 5050 (для выявления метаболитов ацетилфентанила после триметилсилилирования) аналогичен описанному для ГХ Agilent 6890, кроме расхода газа-носителя, который составил 1 мл/мин.

Режим работы жидкостного хроматографа 1200 Agilent с диодно-матричным и масс-спектрометрическим 6120А детекторами (для выявления метаболитов ацетилфентанила). Температура колонки 40 °С.

Разделение выполняли двумя подвижными фазами А (5 mM буферный раствор ацетата аммония с рН 3,8) и В (метанол) согласно программе: 20 % В, линейный градиент до 80 % В (0-20 мин), линейный градиент до 90 % В (20-30 мин), регенерация колонки при 20 % В (30-36 мин). Скорость потока 0,25 мл/мин.

Масс-спектрометрический детектор работал в режиме химической ионизации при атмосферном давлении с регистрацией положительных ионов. Поток газа-осушителя (азот) 5 л/мин, давление на распылителе 20 psi, температура осушающего газа 350 °С, испарителя 250 °С, напряжение на капилляре 2000 В, ток коронного разряда 4 мкА. Регистрацию протонированных молекул ионов метаболитов вели как в режиме детектирования выбранных ионов при напряжении на устройстве фрагментации 50 В, так и в режиме сканирования

положительных ионов от 120 до 500 а.е.м. при напряжении на устройстве фрагментации 150 и 200 В.

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ *AMDIS* (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST) и ее приложений - интерпретатора масс-спектров и субструктурного идентификатора с использованием библиотек масс-спектров *SWGDRUG*, *NIST11*. Индекс удерживания (RI) определяли для неподвижной фазы *HP-5* по *n*-алканам. Количественные результаты получали с использованием программы *ChemStation E.02.01.1177*.

Результаты расчетов значений физико-химических величин pK_a , $LogP$, $LogD$ исследуемых соединений получены с использованием "ACD/I-Lab service" (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) по программам *ACD/LogP v4.5*, *ACD/pK_a v4.56*, *ACD/LogD v4.56*, *ACD/Adsorption Coefficient v4.0*.

Обработку результатов исследований проводили с помощью пакетов прикладных программ *STATISTICA 6.1* и *MS Excel*.

2.7 Математическое планирование эксперимента

С целью оптимизации условий проподготовки крови методом ТФЭ, сокращению временных, трудовых и материальных затрат был применен математический метод планирования эксперимента (МПЭ) - многофакторный трехуровневый метод моделирования Бокса-Бенкена.

Моделирование Бокса-Бенкена представляет собой мультивариативный метод для подбора оптимальных значений исследуемых факторов (варьируемые в задаче переменные, которые влияют на изменение параметра оптимизации), а также статистическую обработку полученных данных с последующей поисковой оптимизацией [368 – 371]. МПЭ подразумевает процедуру выбора числа и условий постановки опытов, необходимых и достаточных для решения поставленной задачи с требуемой точностью и проведение математической обработки полученных результатов. МПЭ обеспечивает оптимальное управление экспериментом при неполном знании механизма явления.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

3.1. Выбор модельных соединений для разработки методики скрининга широкого круга токсикантов в крови

Одной из проблем применения ТФЭ для скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества, в частности трупной крови, является характер матрицы, не позволяющий получить, в большинстве случаев, плазму вследствие гемолиза крови, высокой вязкости, а также присутствия форменных элементов и фрагментов клеточных мембран, блокирующих фильтрующие материалы патронов и/или сами сорбенты.

Предварительное исследование возможности использования для ТФЭ дисковых картриджей применительно к цельной крови на примере дисков SPEС МРЗ привело к неудовлетворительным результатам вследствие высокой вязкости исследуемых образцов и блокирования пор дисков для ТФЭ частицами объекта [372, 373]. Поэтому исследования были продолжены на патронах для ТФЭ. Для дальнейшего исследования в этом направлении были использованы коммерчески доступные патроны для ТФЭ SampliQ Evidex. Патроны серии SampliQ Evidex известного бренда относятся к классическим патронам с сорбентом на основе силикагеля со смешанной привитой фазой, включающей катионит (привитые к силикагелю сульфогруппы) и гидрофобную фазу С8 (октил), что позволяет варьировать механизм удерживания, приводя к лучшему разделению аналитов.

Скрининг веществ в биологическом материале, по сути, является компромиссом в подборе условий извлечения и изолирования в отношении широкого круга веществ.

Оптимальные условия экстракции аналитов из исходных матриц зависят от комплекса факторов: значений константы диссоциации, показателя липофильности и, связанного с ним, коэффициента распределения вещества между подвижной и неподвижной фазой в патроне. Некоторые из этих физико-химических показателей могут быть найдены в литературных источниках. Количественную оценку недостающих характеристик можно получить, используя специализированные компьютерные программы. Обобщенный учет этих характеристик позволяет группировать соединения по свойствам, и в дальнейшем выбирать условия для проведения максимально эффективного изолирования.

В качестве модельных, таким образом, был выбран ряд соединений, охватывающих широкие диапазоны ионизируемости и липофильности.

3.1.1 Расчет физико-химических констант модельных соединений

Для прогнозирования поведения соединений основного и кислотного характера с различными показателями гидрофобности/гидрофильности, выбранных в качестве модельных, проведены расчеты их физико-химических характеристик: показателя константы диссоциации (pK_a), коэффициента распределения октанол/вода (далее по тексту липофильность, LogP) и коэффициента адсорбции (K_{oc}) для выбранных значений pH .

Результаты расчетов pK_a , LogP и K_{oc} приведены в таблице 3.1.

Полученные данные позволяют сделать следующий вывод – оптимальный диапазон значения pH среды, при выделении перечисленных веществ с учетом применяемого типа патронов для ТФЭ, ожидаем в интервале от 3 до 6. Определяется это значением pK_a сульфогрупп сорбента – около 1, и величиной pK_a морфина, равной 8,14, таким образом, чтобы значение pH находилось на 2 единицы выше значения pK_a сорбента и настолько же ниже значения pK_a морфина.

При значениях среды pH в интервале от 3 до 6, амфетамин, амитриптилин и морфин нацело ионизированы и будут взаимодействовать с примененным

сорбционным материалом за счёт ионных взаимодействий. Вклад гидрофобных взаимодействий для них будет снижен по сравнению с нейтральными формами.

Таблица 3.1 – Результаты расчетов значений pK_a , LogP , K_{oc} модельных соединений при исследуемых значениях pH

Соединение	LogP*	pK _a	Значение K _{oc}			
			pH 3,0	pH 4,0	pH 4,8	pH 6,0
Соединения кислотного характера						
Салициловая кислота	2,06	3,0	158	29	5	1
Индометацин	3,10	4,18	1090	697	223	17,3
Кеторолак	2,08	4,47	310	239	102	9,22
Фенобарбитал	1,71	7,63	203	203	202	198
Соединения основного характера						
Диазепам	2,96	3,4	279	780	938	973
Изониазид	-0,89	3,79	1	4,77	7,13	7,8
Кокаин	3,08	8,97	1	1	1	2,11
Амитриптилин	6,14	9,24	41,5	41,8	43,4	71,7
Амфетамин	1,81	9,94	1	1	1	1
Соединения амфотерного характера						
Морфин	0,43	9,50 8,14	1	1	1	1
Бензоилэкгонин	2,72	3,35 10,83	1,09	1,95	2,20	2,26
Экгонин	-0,60	3,60 11,43	1	1	1	1

* значения LogP приведены для нейтральной формы соединения

Ионизация изониазида при pH = 4,8 составляет лишь 9 %, при pH = 4,0 – около 50 %, в то же время в интервале значений pH от 4 до 6 могут наблюдаться слабые гидрофобные взаимодействия с сорбентом. Диазепам, фенобарбитал и индометацин будут удерживаться сорбентами посредством гидрофобных взаимодействий, при этом в интервале pH от 3 до 4,8 не будет иметь значение

характер ионизации веществ. Салициловая кислота в соответствии с расчетами имеет максимальное значение сорбции при минимальном значении $pH = 3$, при этом данное значение pH совпадает с pK_a анализируемого соединения.

На основе анализа данных литературы и собственных исследований нами был составлен протокол исследования крови, включающий пробоподготовку крови до этапа ТФЭ и процедуру ТФЭ на патроне SampliQ Evidex (таблица 3.2).

Основные этапы пробоподготовки крови и ТФЭ для предварительного исследования ряда модельных соединений в крови с применением различных буферных систем приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Протокол этапов пробоподготовки крови для патронов SampliQ Evidex

Этап	Процедура
Пробоподготовка крови до ТФЭ	Во флакон вносили 0,5 мл крови, прибавляли по 50 мкл стандартов индометацина, кеторолака, салициловой кислоты, фенобарбитала, амитриптилина, амфетамина, диазепама, морфина и 2 мл соответствующего буферного раствора, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяли от осадка
ТФЭ	
Кондиционирование	Через патрон пропускали 2 мл 95 % этанола и 2 мл соответствующего буферного раствора
Загрузка образца	Со скоростью около 0,75 мл/мин
Промывка	Последовательно пропускали через патрон: 1мл соответствующего буферного раствора и 1 мл 10 % раствора этанола
Сушка	Сушка патрона проводилась под вакуумом в течение 20 мин
Элюирование 1	Дважды по 2 мл смеси н-гексан – этилацетат (3:1)
Элюирование 2	Дважды по 2 мл смеси дихлорметан – 2-пропанол–25% аммиак (4:1:0,1)
Элюаты I и II собирали по отдельности, испаряли в токе азота при температуре не выше 40 °С и подвергали дериватизации	

Для исследования использовали следующие буферные системы:

1. 0,1 М цитратный буфер (рН = 3,0); 2. 0,1 М цитратный буфер (рН = 4,0);
3. 0,067 М фосфатный буфер (рН = 4,8); 4. 0,067 М фосфатный буфер (рН = 6,0).

В таблицах 3.3 и 3.4 приведены значения полученных экспериментальных данных эффективности экстракции (ЭЭ) модельных соединений при различных значениях рН в диапазоне от 3 до 6.

Определение ЭЭ проводили путем оценки соотношения площадей хроматографических пиков базовых ионов определяемых веществ и внешнего стандарта динонилфталата (ДНФ) в исследуемых образцах крови после экстракции и в образцах сравнения (без проведения экстракции). Учитывая, что площадь хроматографического пика иона это величина прямо пропорциональная количеству определяемого соединения, введенного в прибор, расчет эффективности экстракции проводили по формуле:

$$ЭЭ = \frac{S_{MC} \cdot S_{ДНФ_{st}}}{S_{ДНФ} \cdot S_{MC_{st}}} \cdot 100\%, \text{ где}$$

ЭЭ – эффективность экстракции, %;

S_{MC} – площадь хроматографического пика иона с соответствующей величиной m/z для модельного соединения при анализе исследуемого образца;

$S_{ДНФ}$ – площадь хроматографического пика иона с величиной m/z 149 ДНФ при анализе исследуемого образца;

$S_{MC_{st}}$ – площадь хроматографического пика иона с соответствующей величиной m/z для модельного соединения при исследовании образца сравнения;

$S_{ДНФ_{st}}$ – площадь хроматографического пика иона с величиной m/z 149 ДНФ при исследовании образца сравнения.

Как видно из полученных результатов, величина рН среды в интервале значений от 3 до 6 практически не влияет на эффективность экстракции амфетамина и фенobarбитала. В тех же интервалах рН наблюдаются достаточные для надежной идентификации выходы амитриптилина (35–63 %), диазепама (31–97 %) и индометацина (14–87 %). Для морфина оптимальные результаты получены с фосфатным буфером при значениях рН, равных 4,8 и 6.

Таблица 3.3 – Эффективность ТФЭ модельных соединений, определяемых в элюате I, на патронах SampliQ Evidex ($P = 0,95$; $n = 3$)

pH*	Вещества кислотного и слабоосновного характера, % (RSD, %)			
	фенобарбитал	индометацин	диазепам	салициловая кислота
3,0	80,1 ($\pm 0,3$)	63,7 ($\pm 1,9$)	36,4 ($\pm 5,0$)	7,6 ($\pm 0,9$)
4,0	56,3 (± 18)	14,8 (± 18)	45,4 (± 32)	1,9 (± 63)
4,8	107,5 ($\pm 4,4$)	86,7 ($\pm 7,1$)	97,4 ($\pm 3,4$)	0,60 ($\pm 6,6$)
6,0	79,4 ($\pm 0,7$)	48,2 ($\pm 9,2$)	31,3 ($\pm 8,9$)	0

* соответствует примененному буферному раствору (pH = 3 и pH = 4 – цитратные; pH = 4,8 и pH = 6 – фосфатные).

Таблица 3.4 – Эффективность ТФЭ модельных соединений, определяемые в элюате II, на патронах SampliQ Evidex ($P = 0,95$; $n = 3$)

pH*	Вещества основного характера, % (RSD, %)			
	амфетамин	амитриптилин	изониазид	морфин
3,0	70,7 (± 13)	35,3 (± 20)	0	2,1 ($\pm 9,4$)
4,0	89,7 (± 11)	45,8 ($\pm 3,5$)	0,83 (± 89)	36,4 (± 25)
4,8	94,2 ($\pm 8,4$)	63,1 ($\pm 7,2$)	1,43 (± 20)	94 ($\pm 9,9$)
6,0	89,8 ($\pm 0,6$)	46,5 ($\pm 4,3$)	0,44 (± 87)	70,5 ($\pm 4,0$)

* соответствует примененному буферному раствору (pH = 3 и pH = 4 – цитратные; pH = 4,8 и pH = 6 – фосфатные).

Максимальный выход салициловой кислоты наблюдается при величине pH = 3, что соответствует теоретическим предпосылкам. Для изониазида при величине pH = 4,8 наблюдается незначительный, но максимальный выход при минимальной величине относительного стандартного отклонения (± 20 %).

В процессе исследования было так же отмечено, что использование цитратного буфера в процедуре ТФЭ проб крови, с последующей дериватизацией

(путем ацетилирования) элюата II, приводит к «осмолению» пробы. Последнее может иметь негативные последствия при дальнейшем анализе полученной пробы.

Для уменьшения потерь слабоудерживаемых веществ в процессе ТФЭ на этапе промывки после загрузки образца использовались минимальные объемы (по 1 мл) промывочных растворов: фосфатный буфер и 10 % этанол.

3.1.2 Сравнение эффективности экстракции модельных соединений из крови методами жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции

Для сравнения эффективности, параллельно с ТФЭ проводили жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) из 0,5 мл крови с добавлением модельных соединений при значениях pH = 2 (хлороформ) для веществ кислотного характера и pH = 9,3 (хлороформ- бутанол 6:1) для веществ основного характера [372].

В таблице 3.5 приведено сравнение эффективности экстракции методами ТФЭ (ФБ pH = 4,8) и ЖЖЭ.

Таблица 3.5 – Сравнение эффективности ЖЖЭ и ТФЭ на патронах SampliQ Evidex модельных соединений (P = 0,95, n = 3)

Соединение	Эффективность, % (RSD, %)	
	ЖЖЭ	ТФЭ*
Амфетамин	27,9 (± 32)	94,2 (± 8,4)
Изониазид	0,48 (± 173)**	1,43 (± 20)
Фенобарбитал	30,7 (± 10,1)	107,5 (± 4,4)
Амитриптилин	9,9 (± 5,8)	63,1 (± 7,2)
Диазепам	19,6 (± 4,5)	97,4 (± 3,4)
Морфин	44,9 (± 11,5)	94,0 (± 9,9)
Индометацин	3,2 (± 29,7)	86,7 (± 7,1)
Салициловая кислота	63,9 (± 7,9)	0,57 (± 6,6)

* для варианта с применением буферного раствора pH = 4,8;

** изониазид был определен в одном из трех параллельных образцов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что метод ТФЭ для большинства модельных соединений имеет более высокие уровни значений эффективности экстракции в сравнении с методом ЖЖЭ. Только для салициловой кислоты эффективность экстракции при использовании метода ЖЖЭ значительно превышает результаты приведенного метода ТФЭ, что объясняется подавлением диссоциации этого соединения в условиях ЖЖЭ.

Использование патронов SampliQ Evidex для гидрофильных веществ слабоосновного характера (изониазид) и среднелипофильных веществ кислотного характера (салициловая кислота) показало низкую эффективность их экстракции при изученных условиях.

Результаты предварительного исследования показали, что применение для пробоподготовки цельной крови патронов для ТФЭ SampliQ Evidex на основе сорбентов со смешанной фазой позволяет проводить скрининг крови на вещества кислотного и основного характера с широким диапазоном липофильности.

Таким образом, исследованиями подтверждено, что построение алгоритма скрининга крови с применением патронов SampliQ Evidex возможно. При этом необходимо учитывать, что слабоосновные гидрофильные вещества и вещества кислотного характера со значением pK_a ниже 3,8 (от гидрофильного до среднелипофильного характера) будут слабо удерживаться указанным сорбентом и их обнаружение в рассматриваемых условиях возможно только при значительных, то есть токсических и летальных концентрациях [374].

3.2. Оптимизация условий твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови

Целью дальнейшего этапа работы явилось определение оптимальных условий пробоподготовки образцов крови методом ТФЭ с последующим ГХ-МС исследованием для цели скрининга лекарственных и наркотических веществ. Оптимизацию условий проведения ТФЭ выполняли с помощью математического

планирования эксперимента (МПЭ) с применением многофакторного 3-х уровневого моделирования Бокса-Бенкена.

3.2.1 Выбор факторов и построение плана проведения экспериментальных исследований методом математического планирования эксперимента

В качестве параметра оптимизации нами была выбрана эффективность экстракции (ЭЭ).

Был применен 7-факторный (для соединений основного характера) и 5-факторный (для соединений кислотного характера) 3-уровневый план Бокса-Бенкена.

В качестве существенных факторов, влияющих на параметр оптимизации, в нашем случае, эффективность твердофазной экстракции крови, были выбраны следующие:

- значение pH фосфатного буфера (ФБ), используемого на этапах процедуры ТФЭ (рНФБ);
- объем буферного раствора, используемого для промывки сорбента после загрузки образца (VФБ);
- концентрации уксусной кислоты (УК) и этанола, также применяемых для промывки сорбента после загрузки образца (СУК и СЭ, соответственно);
- полярность элюентов I и II, используемых для элюирования двух фракций аналитов с сорбента (гексан : этилацетат и метилхлорид : пропанол-2 : 25% аммиак, соответственно);
- концентрация метанола, используемого для промывки сорбента между стадиями элюирования аналитов (СМ).

Ограничения на значения факторов определены следующим образом:

- $4,8 \leq \text{pH} \leq 6,0$;

- концентрация УК $\leq 0,1$ моль/л, либо ее отсутствие (считается, что УК способствует усилению взаимодействия ионизированных аналитов основного характера с сульфогруппами сорбента);
- концентрация этанола, ≤ 20 %, либо его отсутствие (способствует очистке от мешающих компонентов матрицы);
- в первом элюирующем растворе соотношение гексан : этилацетат от 2:1 до 4:1;
- во втором элюирующем растворе соотношение метиленхлорид : пропанол-2 : 25% аммиак – от 2:1:0,1 до 4:1:0,1;
- концентрация метанола, ≤ 100 %, либо его отсутствие (способствует чистоте 2 экстракта).

Математическая модель, описывающая зависимость ключевого параметра оптимизации (эффективность экстракции) от значений влияющих факторов, описывается функцией $\omega=f(x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6, x_7)$ для соединений основного характера и $\omega=f(x_1, x_2, x_3, x_4, x_5)$ для соединений кислотного характера. При применении методов планирования экспериментов вводится стандартизованный масштаб (кодирование переменных), который позволяет оценить сравнительное влияние каждого фактора. В таблице 3.6 приведены регулируемые факторы при проведении ТФЭ и уровни их варьирования.

Исследование эффективности экстракции (ЭЭ, %) модельных соединений проводилось по схеме трехфакторного планирования экспериментов с применением плана Бокса-Бенкена (7/1/62 – 7 факторов, 1 блок, 62 опыта). Для получения математической модели процесса ТФЭ были реализованы две повторности плана Бокса-Бенкена после его рандомизации. В таблицах 1 и 2 Приложения 2 приведены матрицы планирования факторного эксперимента с кодированными и реальными величинами, соответственно. ЭЭ модельных соединений приведена в таблицах 3 – 13 Приложения 2.

В таблице 14 Приложения 2 приведены времена удерживания производных модельных соединений и стандарта, и характеристические ионы, площадь которых использовалась для количественного определения.

Таблица 3.6 – Регулируемые факторы при проведении ТФЭ и уровни их варьирования

Фактор	Кодированные уровни		
	-1	0	+1
X1 – pH 1/15М фосфатный буфер, pHФБ	4,8	5,4	6,0
X2 – объем буфера, VФБ, мл	1	2	3
X3 – концентрация уксусной кислоты, СУК, моль/л	–	0,01	0,1
X4 – концентрация этанола, СЭ, %	0	10	20
X5 – элюент I смесь гексан : этилацетат, Г:ЭА,	2:1	3:1	4:1
X6 – концентрация метанола, СМ, %	–	50	100
X7 – элюент II смесь: метиленхлорид : пропанол-2 : 25% аммиак, ДХМ:ИПС:NH ₃	2:1:0,1	3:1:0,1	4:1:0,1

«–» – этап отсутствует.

Для проверки качества аппроксимации уравнений регрессии были рассчитаны: коэффициент множественной корреляции r , коэффициент детерминации r^2 , фактический критерий Фишера ($F_{факт}$), уровень значимости критерия Фишера (p) и стандартная ошибка (SS). Полученные данные приведены в таблице 3.7.

Значения коэффициентов множественной корреляции менее 0,3 для изониазида, салициловой кислоты указывают на отсутствие прямой связи между ЭЭ и рассмотренными факторами. Коэффициент множественной корреляции r , вычисленный для моделей морфина, амитриптилина, амфетамина, кокаина, фенобарбитала и индометацина находится в диапазоне $0,3 < r < 0,5$, что говорит о слабой прямой зависимости ЭЭ от изменений варьируемых в исследовании факторов.

Значение величины r для модели кеторолака в пределах $+0,5 \leq r \leq +0,7$ соответствует прямой умеренной взаимосвязи. Коэффициент множественной корреляции для моделей бензоилэкгонин, диазепам определяется в интервале значений $+0,7 < r < +1$, что свидетельствует о прямой существенной (сильной)

связи между результативным показателем эффективности экстракции и набором факторных показателей.

Таблица 3.7 – Проверка адекватности и достоверности моделей регрессии для обоснования параметров проведения ТФЭ

Соединение	r	$F_{факт}$	r^2	p	SS
Основного характера:					
Бензоилэкгонин	0,714	8,00	0,5092	0,000	6,46
Диазепам	0,838	18,2	0,7025	0,000	22,3
Морфин	0,459	2,05	0,2103	0,065	33,0
Амитриптилин	0,315	0,850	0,0992	0,552	5,88
Амфетамин	0,427	1,72	0,1821	0,124	5,76
Кокаин	0,459	2,06	0,2108	0,064	8,36
Изониазид	0,237	0,458	0,0561	0,860	0,85
Кислотного характера:					
Салициловая кислота	0,278	0,936	0,0772	0,465	1,24
Фенобарбитал	0,498	3,70	0,2484	0,006	17,8
Кеторолак	0,626	7,21	0,3917	0,000	12,1
Индометацин	0,430	2,54	0,1850	0,038	5,60

Коэффициент детерминации r^2 показывает, какая доля вариации результативного показателя (ω) связана с вариацией факторных показателей. Коэффициент детерминации принимает значения от 0 до 1 и чем ближе значение коэффициента к 1, тем сильнее зависимость, причем при $r^2 > 0,5$ модель можно считать приемлемой. Как видно из таблицы 4.7, коэффициенты детерминации r^2 для бензоилэкгонина и диазепама интерпретируются как хорошее соответствие модели полученным данным, что говорит о высокой точности аппроксимации.

Статистическую надежность множественной регрессии оценивали с помощью общего критерия Фишера (F -критерия), который проверяет нулевую

гипотезу (H_0) о статистической незначимости параметров регрессионных уравнений. Для этого сравнивали фактические значения F -критерия ($F_{\text{факт}}$) (таблица 3.7) с табличным ($F_{\text{табл}}$) [375] по заданным уровню значимости и числу степеней свободы ($\alpha = 0,05$, т.е. 5%). Для соединений основного характера ($df_1 = 7$ и $df_2 = 54$) $F_{\text{табл}} = 2,23$. Для соединений кислотного характера ($df_1 = 5$ и $df_2 = 56$) $F_{\text{табл}} = 2,41$.

Поскольку в регрессионном анализе для бензоилэкгонины, диазепама, фенобарбитала, кеторолака, индометацина $F_{\text{факт}} > F_{\text{табл}}$, то с вероятностью более 95% принимается гипотеза о том, что полученные значения не случайны и сформированы под влиянием существенных факторов. Таким образом, признается статистическая значимость регрессионных уравнений и их параметров для перечисленных модельных соединений.

Полученные результаты регрессионного анализа для морфина, амитриптилина, амфетамина, кокаина, изониазида, салициловой кислоты по критерию Фишера сводятся к выводу о том, что для этих анализируемых соединений вероятность случайного формирования F -критерия больше принятого стандарта $\alpha = 0,05$ (5%), $F_{\text{табл}} > F_{\text{факт}}$ и, соответственно, полученные значения могли появиться случайно, т.е. сформироваться под влиянием несущественных факторов.

Полученные коэффициенты регрессии (β) для модельных соединений приведены в таблице 3.8.

Как видно из приведенных данных (таблицы 3.7 и 3.8), для модельных соединений влияние большинства исследуемых факторов на ЭЭ отсутствует или оно не значительно. Выраженное влияние для некоторых соединений на ЭЭ имеют факторы X_3 и X_4 .

Факторы и их сочетание, приводящие к наибольшим значениям полученных величин ЭЭ для исследуемых веществ, представлены ниже в виде диаграмм.

Таблица 3.8 – Множественная регрессия (линейная) для модельных соединений

Соединение	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7
Основного характера:							
Бензоилэкгонин	-0,17	-0,07	0,682*	-0,04	-0,01	-0,06	0,049
Диазепам	-0,05	0,050	0,808*	0,200*	0,013	0,028	0,007
Морфин	0,069	-0,03	-0,11	0,116	-0,01	-0,10	-0,41*
Амитриптилин	0,015	0,032	-0,06	0,249	0,010	-0,17	-0,09
Амфетамин	0,090	0,067	0,057	0,038	0,272*	-0,27*	0,122
Кокаин	0,047	-0,11	-0,09	0,193	0,034	-0,25*	-0,31*
Изониазид	0,023	-0,07	0,113	0,037	-0,16	0,091	0,070
Кислотного характера:							
Салициловая кислота	-0,03	-0,23	0,145	-0,01	0,011	-	-
Фенобарбитал	-0,16	-0,11	0,174	-0,41*	-0,02	-	-
Кеторолак	-0,19	-0,02	0,575*	-0,14	-0,05	-	-
Индометацин	-0,08	0,092	0,360*	0,165	-0,11	-	-

* отмечены значения коэффициентов регрессии, вносящих наибольший вклад

- – этап отсутствует

Как видно из приведенных данных (таблицы 3.7 и 3.8), для модельных соединений влияние большинства исследуемых факторов на ЭЭ отсутствует или оно не значительно. Выраженное влияние для некоторых соединений на ЭЭ имеют факторы X3 и X4.

Факторы и их сочетание, приводящие к наибольшим значениям полученных величин ЭЭ для исследуемых веществ, представлены ниже в виде диаграмм.

Для наглядного представления изучаемых влияний и взаимодействий факторов и дальнейшей оценки значимости влияющих факторов строили карты Парето для стандартизованных эффектов (рисунки 3.1, 3.3, 3.5, 3.7 и 3.10) (L – линейные эффекты, Q – квадратичные).

Для визуальной оценки наилучшего сочетания параметров проведения ТФЭ для модельного соединения, которое соответствует области поверхности, принимающей максимальное значение, представлено графическое изображение в виде контурных диаграмм и поверхностей отклика (рисунки 3.2, 3.4, 3.8 и 3.11). На рисунках 3.6 и 3.9 приведены диаграммы маргинальных средних и доверительных интервалов зависимости эффективности экстракции морфина от фактора X7 и фенobarбитала от фактора X4, соответственно.

3.2.2 Влияние исследуемых факторов на эффективность твердофазной экстракции бензоилэкгониина, диазепама, морфина, фенobarбитала, кеторолака из крови

Бензоилэкгонин

Из анализа полученной вследствие расчетов карты Парето (рисунок 3.1) следует, что изменение значений факторов X1 и X3 ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ бензоилэкгониина.

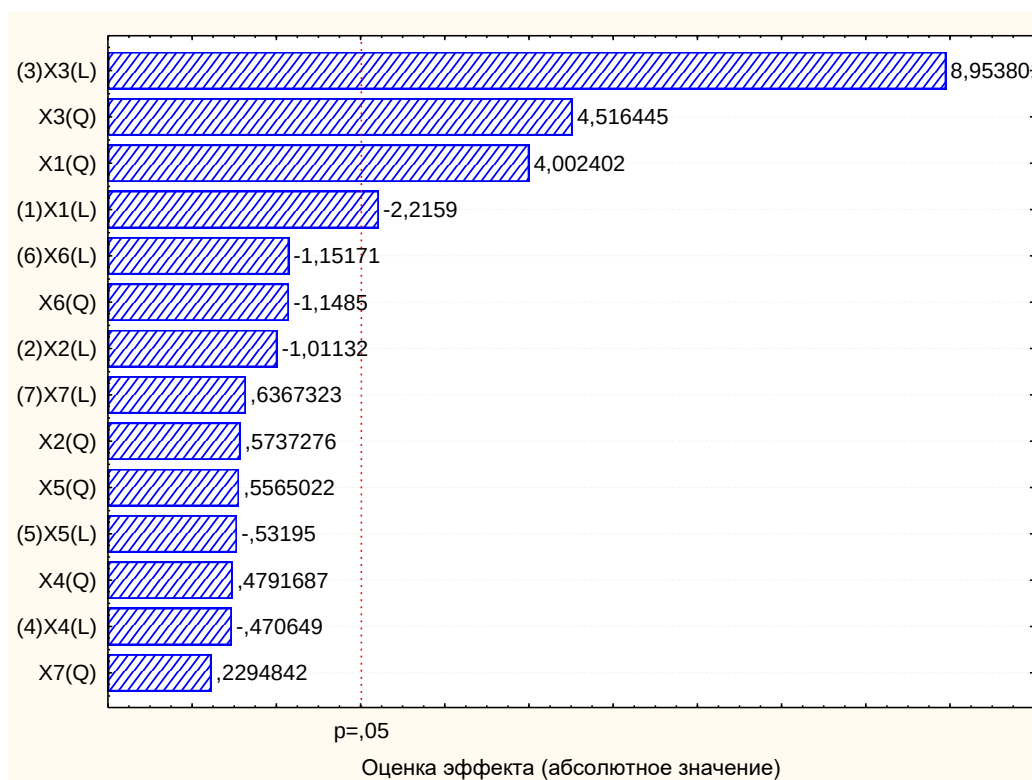


Рисунок 3.1 – Карта Парето стандартизованных эффектов для бензоилэкгониина

На рисунке 3.2 приведены поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ бензоилэкгонины от факторов X1 и X3.

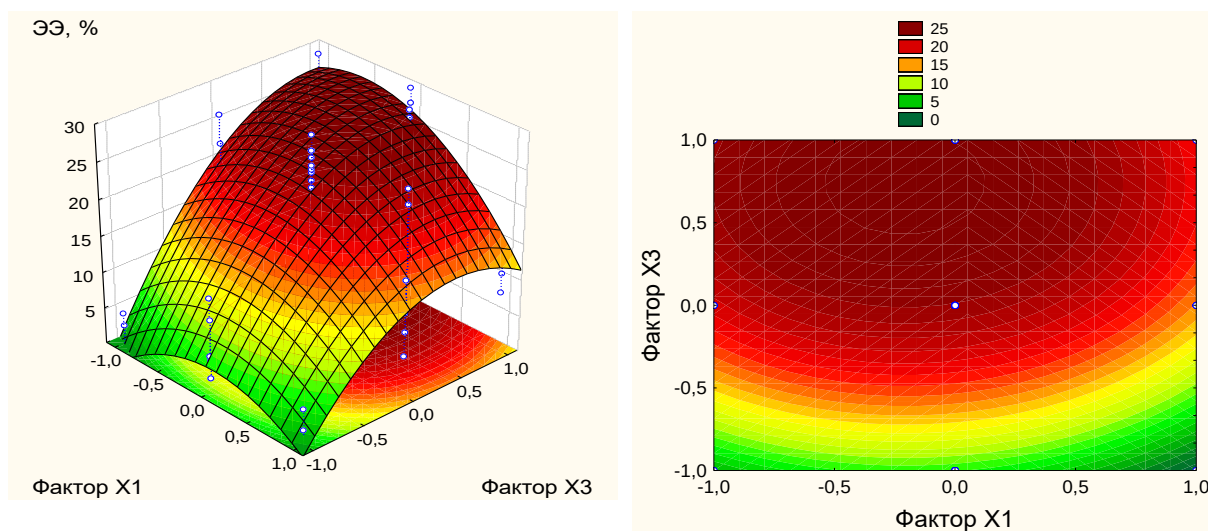


Рисунок 3.2 – Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ бензоилэкгонины от факторов X1 и X3

Из контурной диаграммы следует, что выраженное значение имеет фактор X3 и с увеличением концентрации уксусной кислоты растет ЭЭ бензоилэкгонины. Фактор X1 имеет меньшее влияние и имеет оптимальное значение показателя кислотности в диапазоне pH= 4,8 – 5,4.

Диазепам

Анализ карты Парето (рисунок 3.3) показал, что изменение значений факторов X3 и X4 ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ диазепама. На рисунке 3.4 приведена поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ диазепама от факторов X3 и X4. Как следует из диаграмм, выраженное значение имеет фактор X3, и с увеличением концентрации уксусной кислоты ЭЭ диазепама для элюента I резко снижается, при этом растет ЭЭ диазепама для элюента II. Применение уксусной кислоты для промывки патронов приводит к перераспределению диазепама между элюатами I и II. Фактор X4 имеет меньшее

влияние и с ростом концентрации этанола в растворе для промывки сорбента наблюдается снижение ЭЭ диазепама.

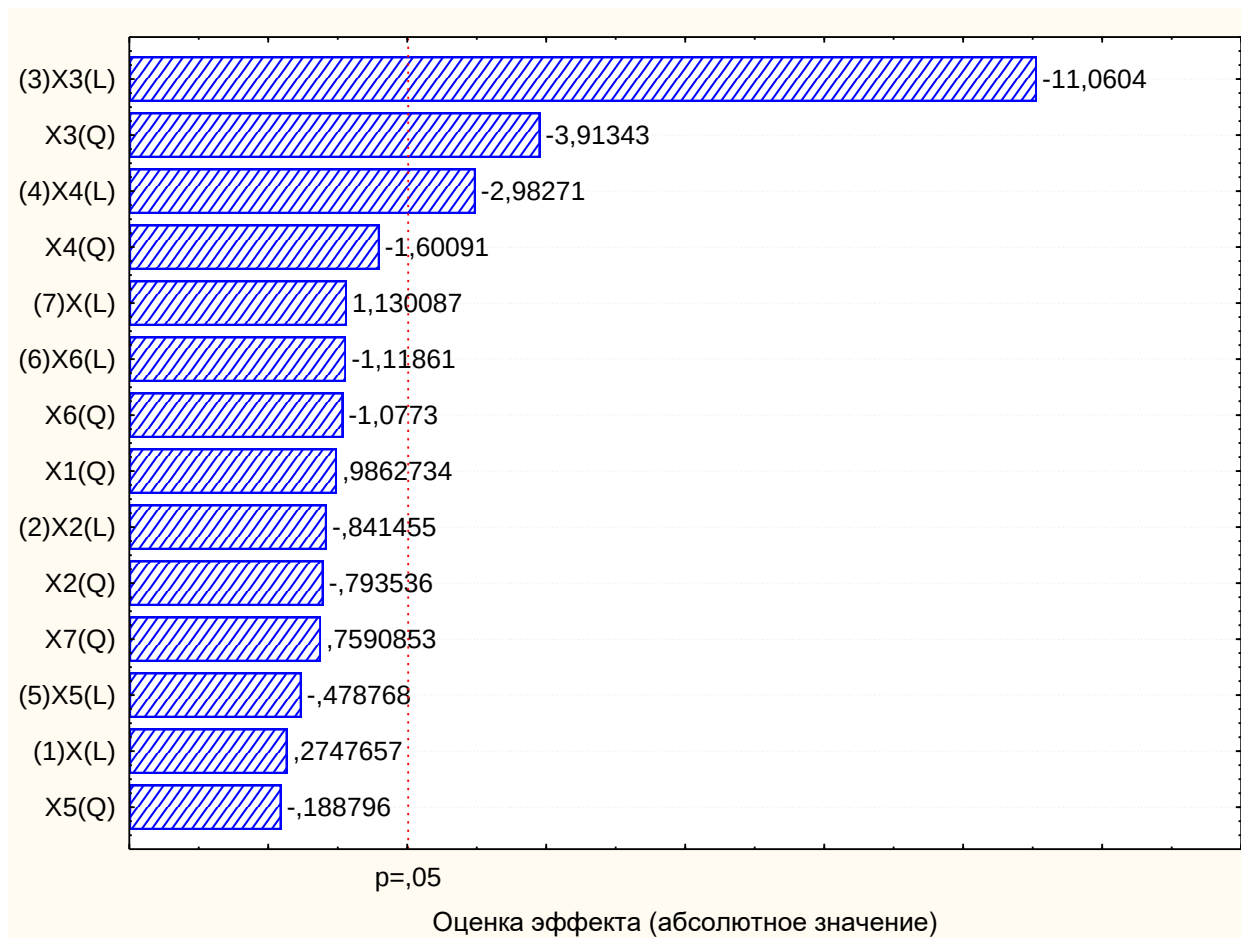


Рисунок 3.3 – Карта Парето стандартизованных эффектов для диазепама

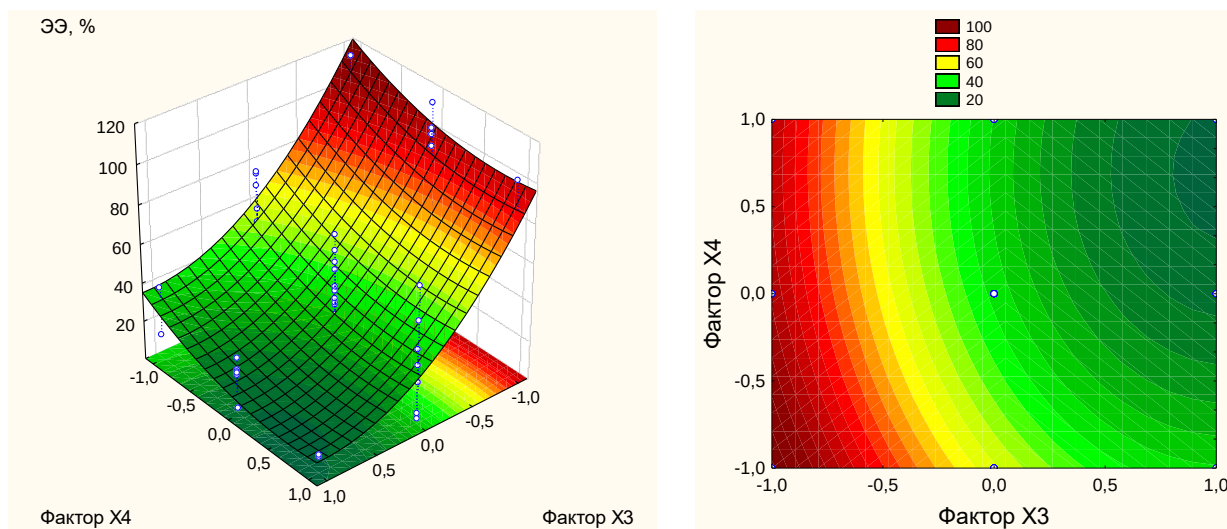


Рисунок 3.4 – Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ диазепама от факторов X3 и X4

Морфин

В соответствии с полученной картой Парето (рисунок 3.5) - изменение значения фактора X7 значительно влияет на величину ЭЭ морфина.

Следует отметить, что результаты оценки регрессии показали высокие значения стандартной ошибки (33 %) для модели морфина. Последнее является следствием наличия фактора или факторов, которые выбранной моделью не учитываются, но влияют на оценку адекватности и достоверности модели.

На рис. 3.6 приведена диаграмма маргинальных средних с доверительными интервалами зависимости ЭЭ морфина от фактора X7. Из диаграммы видно, что увеличение полярности элюента II (фактор X7) ведет к возрастанию ЭЭ морфина. Аналогичное влияние полярности элюента II нами наблюдалось при изучении ТФЭ золпидема и его метаболитов [378].

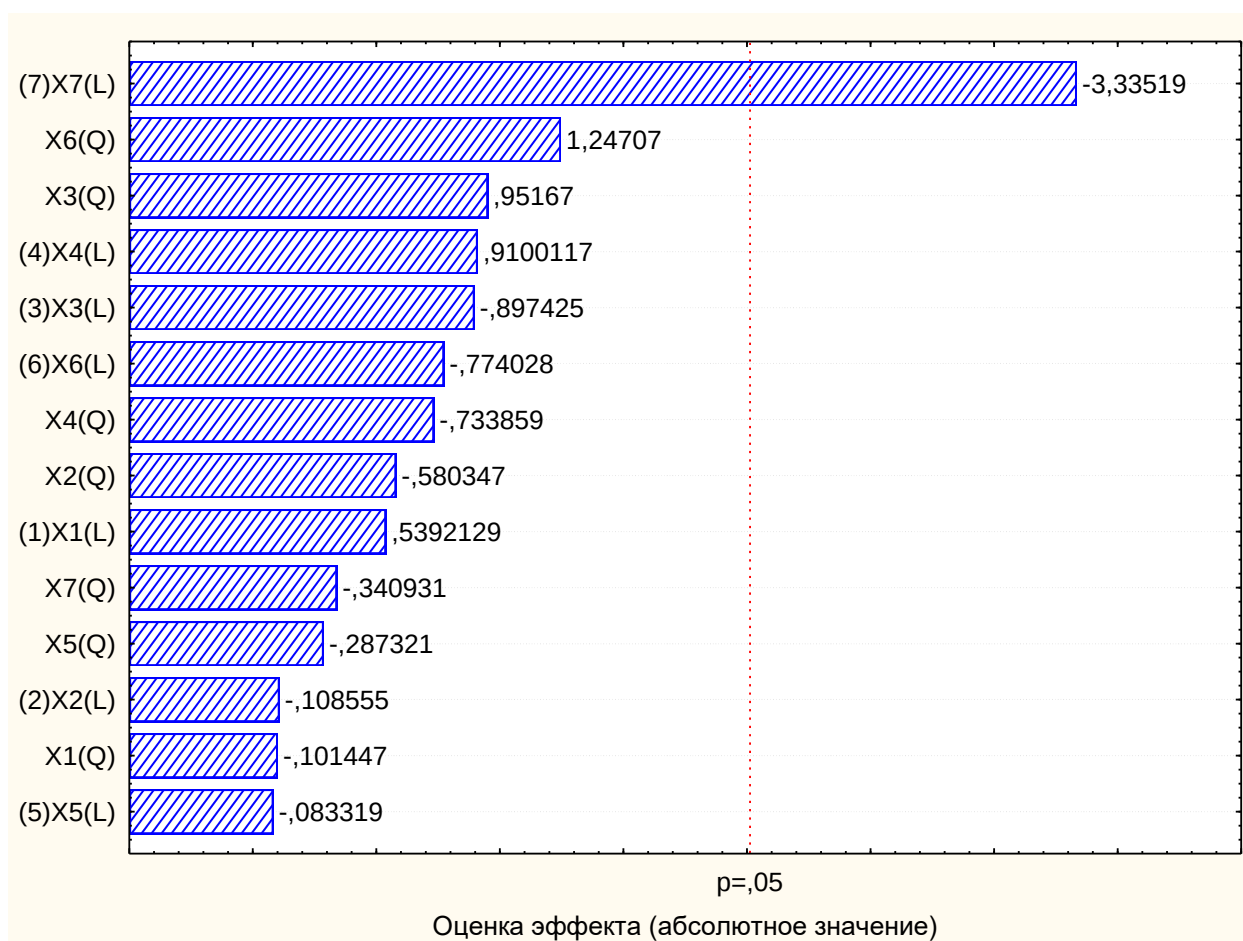


Рисунок 3.5 – Карта Парето стандартизованных эффектов для морфина

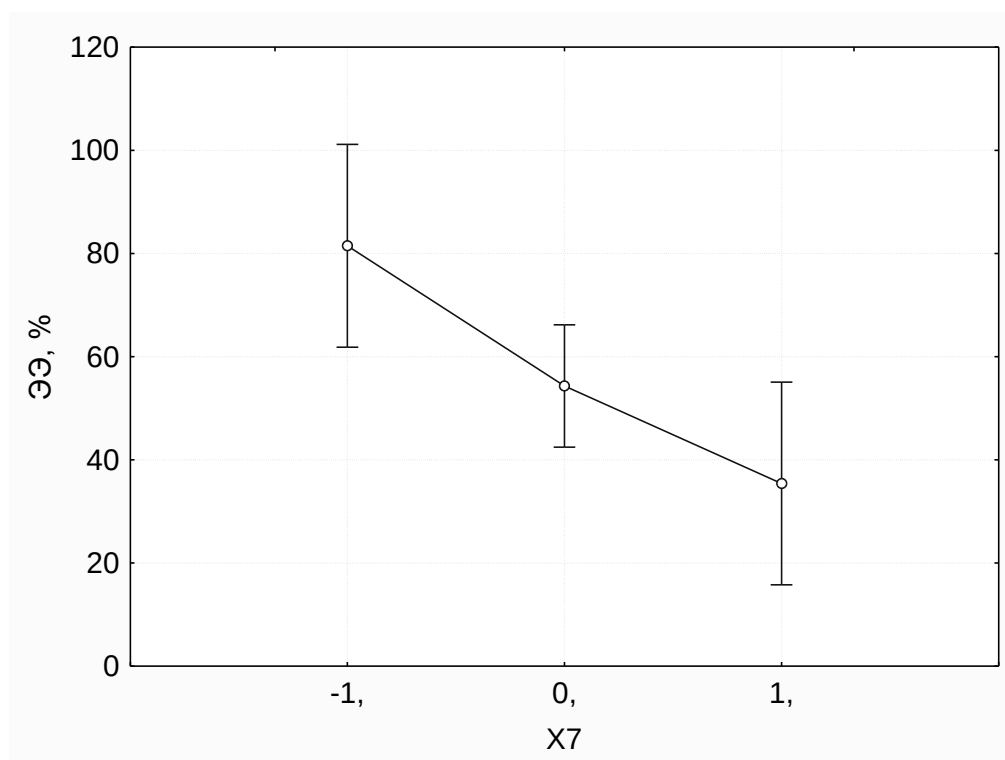


Рисунок 3.6 – Диаграмма маргинальных средних и доверительных интервалов зависимости ЭЭ морфина от фактора X7

Фенобарбитал

Из анализа полученной карты Парето (рисунок 3.7) следует, что изменение значений факторов X4 (линейная зависимость) и X1 (квадратичная зависимость) ведет к значимому влиянию на величину ЭЭ фенобарбитала.

Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ фенобарбитала от факторов X1 и X4 приведена на рисунке 3.8. На рис. 3.9 приведена диаграмма маргинальных средних с доверительными интервалами зависимости ЭЭ фенобарбитала от фактора X4. Из диаграммы видно, что снижение концентрации этанола (фактор X4) ведет к возрастанию ЭЭ фенобарбитала.

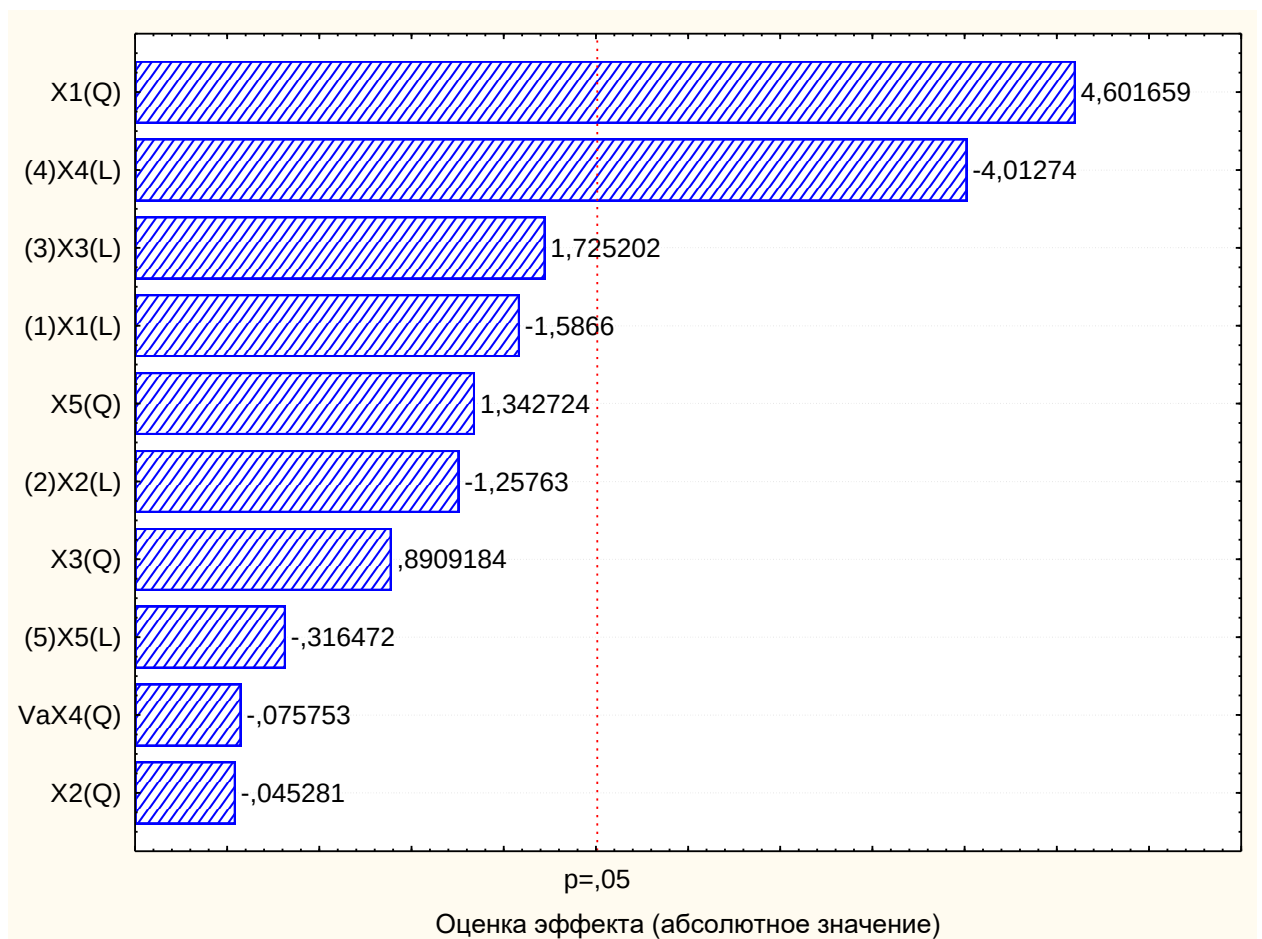


Рисунок 3.7 – Карта Парето стандартизованных эффектов для фенобарбитала

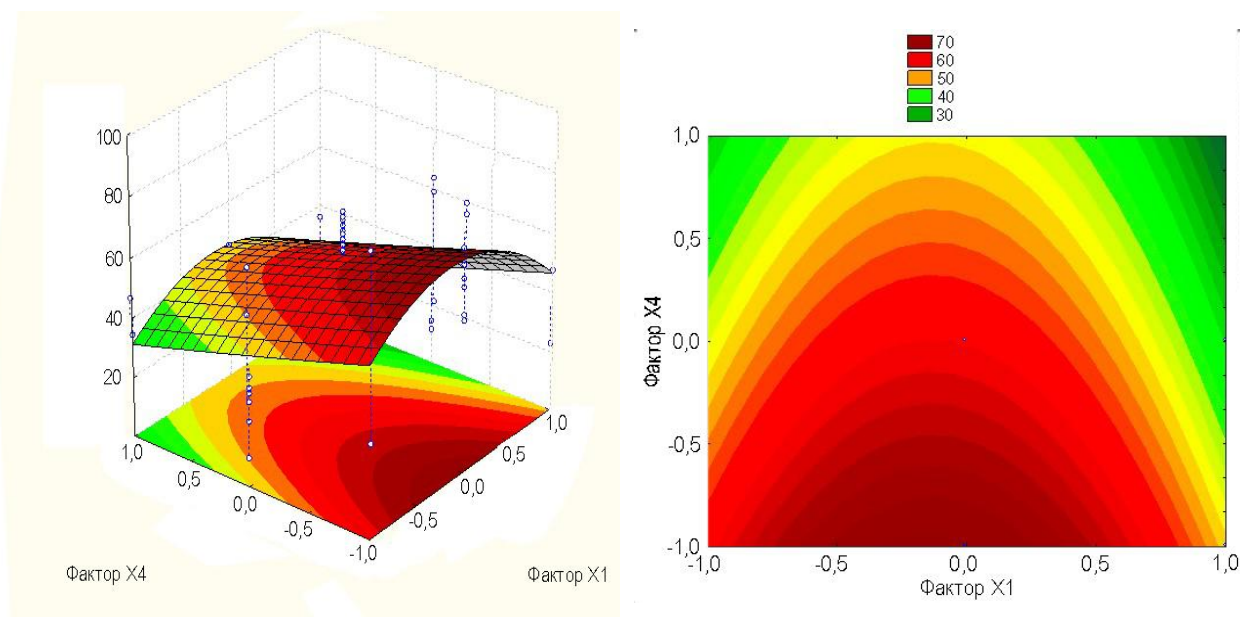


Рис. 3.8. Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ фенобарбитала от факторов X1 и X4

Как видно из рисунка 3.8, наибольшее влияние имеет фактор X4, так, с увеличением концентрации этанола в растворе для промывки сорбента ЭЭ фенобарбитала снижается. Фактор X3 дает незначительное увеличение ЭЭ фенобарбитала с ростом концентрации уксусной кислоты в растворе для промывки.

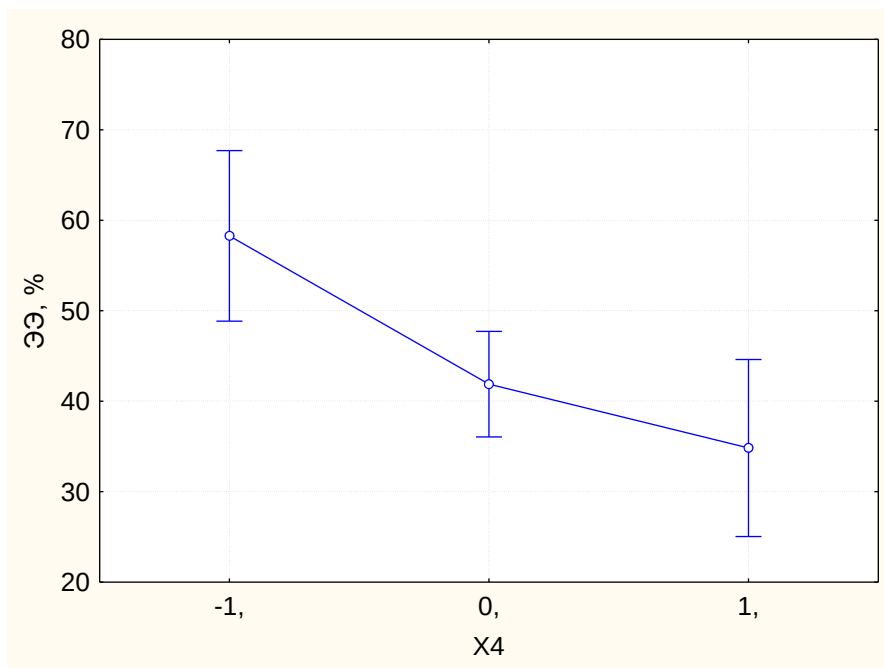


Рисунок 3.9 – Диаграмма маргинальных средних и доверительных интервалов зависимости ЭЭ фенобарбитала от фактора X4

Кеторолак

В соответствии с полученной картой Парето (рисунок 3.10) – изменение значения факторов X3 и X1 значительно влияет на величину ЭЭ кеторолака.

Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ кеторолака от факторов X1 и X3 приведена на рисунке 3.11.

Фактор X3 показал значительное увеличение ЭЭ кеторолака с ростом концентрации уксусной кислоты в растворе для промывки. Так же некоторое влияние на ЭЭ кеторолака имеет фактор X1, снижение величины pH в буферном растворе приводит к росту ЭЭ.

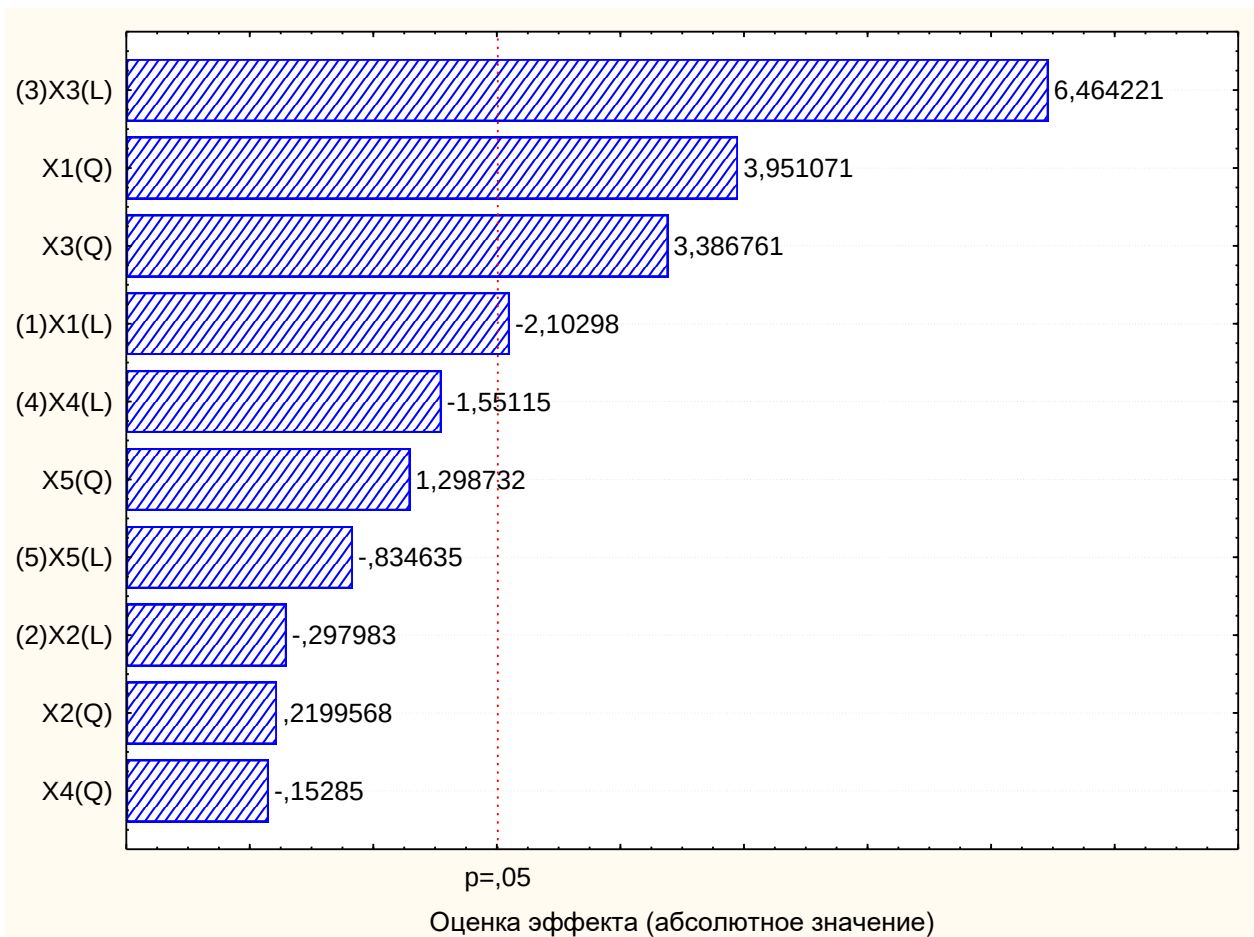


Рисунок 3.10 – Карта Парето стандартизованных эффектов для кеторолака

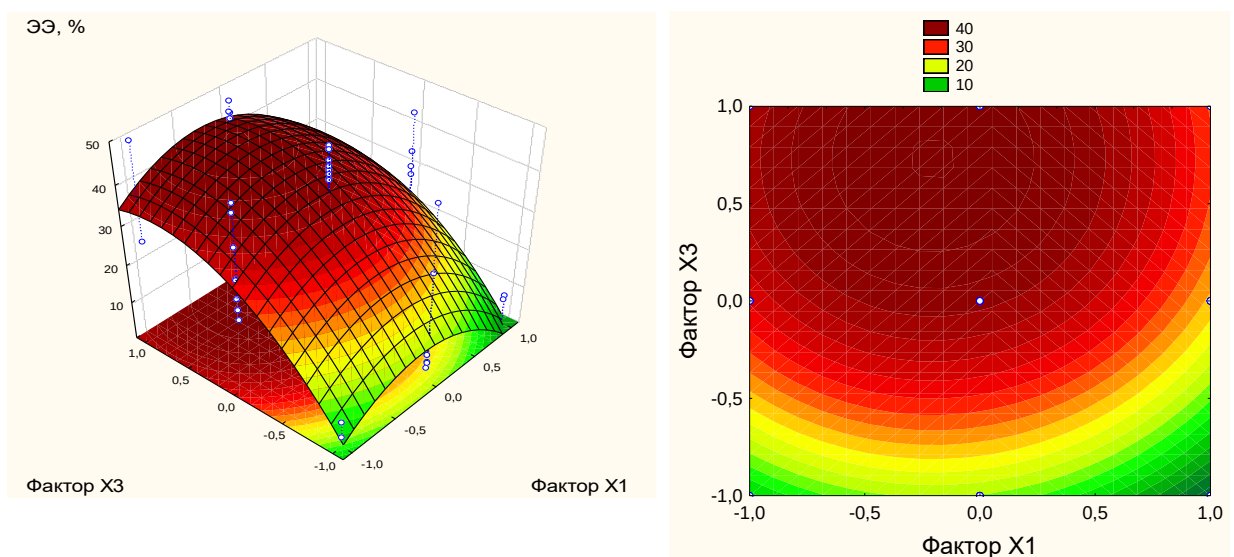


Рисунок 3.11 – Поверхность отклика и контурная диаграмма зависимости ЭЭ кеторолака от факторов X1 и X3

Рассмотренные факторы ТФЭ в пределах исследованных величин не имеют значимого влияния на ЭЭ амфетамина, амитриптилина, кокаина.

Наиболее выраженное влияние, согласно полученным данным, имеет фактор Х3 (использование раствора уксусной кислоты) для бензоилэкгонины, диазепама, кеторолака. Наличие и концентрация УК подавляет ионизацию карбоксильных групп бензоилэкгонины, кеторолака, что способствует увеличению эффективности их экстракции. Промывка раствором уксусной кислоты в качестве дополнительного этапа ведет к экстракционным потерям гидрофильных соединений (морфин, изониазид) [374]. Удаление указанного этапа для промывки патронов приводит к более полному извлечению диазепама в элюат I.

Влияние фактора Х4 выражено для фенobarбитала и диазепама, увеличение концентрации этанола на стадии промывки приводит к значительному снижению их ЭЭ.

В данном исследовании не выявлено связи фактора Х5 (изменение полярности элюента I) с ЭЭ модельных соединений. В то же время изучение ТФЭ некоторых нестероидных противовоспалительных средств (НПВС): кетопрофена, ибупрофена, кеторолака, напроксена, диклофенака, индометацина показало, что увеличение полярности элюента I ведет к росту ЭЭ этих соединений [377].

Поведение салициловой кислоты и изониазида в процессе ТФЭ указывает на то, что в исследованных условиях ЭЭ определяется не характером факторов, а вероятно, градиентом концентрации указанных соединений в биологическом материале.

Экгонин в указанных условиях вариации факторов и с используемым типом патронов не определяется. Последнее следует учитывать при выборе метода исследования, если известно, что анализируемые вещества имеют высоко гидрофильный характер.

В результате, факторы Х3 и Х6 имеет смысл исключить из стадии пробоподготовки, фактор Х1 выбран при значении $pH=4,8$, объем промывки буферным раствором минимизирован и увеличена полярность элюентов I и II (факторы Х5 и Х7).

В таблице 3.9 приведены рекомендуемые значения факторов.

Таблица 3.9 – Рекомендуемые условия скрининга после оптимизации

Фактор	Рекомендуемое значение
X1 – pH 1/15M фосфатный буфер, pH	4,8
X2 – объем буфера, мл	1
X3 –концентрация уксусной кислоты, моль/л	–
X4 – концентрация этанола, %	10
X5 – элюент I, гексан : этилацетат	2:1
X6 – концентрация метанола, %	–
X7 – элюент II, метиленхлорид : пропанол-2 : 25 % аммиак	2:1:0,1

Таким образом, для эффективного извлечения из крови модельных соединений, обладающих различными физико-химическими свойствами, были оптимизированы все основные этапы проведения ТФЭ и получены искомые параметры влияющих на процесс экстракции факторов [378].

3.2.3 Изучение влияния уксусной кислоты на эффективность твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ при скрининге крови

Было проведено дополнительное изучение влияния уксусной кислоты на этапе промывки в методе ТФЭ на ЭЭ модельных соединений с использованием модифицированной методики скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества [379], поскольку оптимальным подходом к проведению эксперимента считают проведение МПЭ с последующей проверкой полученного результата путем проведения практического исследования.

Результаты сравнения эффективности ТФЭ модельных соединений из крови с использованием 0,1 М уксусной кислоты и без нее приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Эффективность ТФЭ модельных соединений из крови, %
(P = 0,95, n = 6, RSD, %)

Соединение	0,1 М уксусная кислота		без уксусной кислоты	
	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II
Салициловая кислота	0,9 (± 90)	н.д.	0,8 (± 91)	н.д.
Кеторолак	46 (± 8)	н.д.	27 (± 13)	н.д.
Индометацин	97 (± 5)	н.д.	101 (± 5)	н.д.
Фенобарбитал	66 (± 9)	н.д.	88 (± 8)	н.д.
Диазепам	18 (± 40)	49 (± 20)	61 (± 10)	н.д.
Амфетамин	н.д.	86 (± 4)	н.д.	93 (± 5)
Изониазид	н.д.	0,45 (± 12)	н.д.	0,69 (± 33)
Амитриптилин	н.д.	54 (± 4)	н.д.	53 (± 14)
Кокаин	н.д.	76 (± 6)	н.д.	79 (± 6)
Бензоилэкгонин	н.д.	60 (± 5)	н.д.	48 (± 9)
Экгонин	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.
Морфин	н.д.	9 (± 12)	н.д.	24 (± 19)

н.д. – не детектируется

Как видно из полученных результатов на ЭЭ большинства модельных соединений влияние дополнительного этапа с применением уксусной кислоты отсутствует или оно незначительно. К данной группе относятся: салициловая кислота, индометацин, фенобарбитал, амфетамин, изониазид, амитриптилин, кокаин, соответственно, так же будут себя вести наркотические и лекарственные вещества, близкие по физико-химическим свойствам к перечисленным модельным соединениям.

Для кеторолака и бензоилэкгонина применение стадии промывки уксусной кислотой ведет к росту ЭЭ, для кеторолака более чем на 40 %, для бензоилэкгонина порядка 20 %. Увеличение ЭЭ для кеторолака обусловлено подавлением диссоциации карбоксильной группы; для бензоилэкгонина данный эффект можно объяснить подавлением образования цвиттер-иона.

Применение уксусной кислоты ведет к значительному снижению ЭЭ морфина, более чем на 60 %.

В случае использования промывки с уксусной кислотой диазепам определяется в обоих элюатах, без данной стадии он полностью извлекается в элюат I. Распределение по элюатам для высоколипофильных и слабоосновных соединений, таких как 1,4-бензодиазепины, может вести к ухудшению чувствительности метода определения.

Таким образом, наблюдается разнонаправленная динамика влияния на ЭЭ для веществ с различными физико-химическими свойствами. С учетом того, что изложенный метод ТФЭ рассматривается как скрининговый, а также учитывая результаты предварительных исследований с использованием математического моделирования Бокса-Бенкена, на наш взгляд, оптимальным его применение будет в варианте без использования стадии промывки 0,1 М раствором уксусной кислоты [379].

3.3 Количественная оценка содержания некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом твердофазной экстракции

Следующим этапом работы было количественное определение часто встречающихся в биообъектах нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) в процедуре скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества. Это важно для понимания экспертом уровня концентрации (терапевтическая – токсическая доза) с тем, чтобы определиться с дальнейшим ходом анализа.

НПВС относятся к числу наиболее широко применяемых в медицинской практике лекарственных препаратов. Это обусловлено их широким применением, как в практической медицине, так и при самолечении. Несмотря на то, что такие препараты в большинстве своем должны отпускаться из аптечных учреждений по назначению и рецепту врача [380], в аптечных учреждениях РФ их можно

приобрести и без рецепта. Немаловажную роль в этой ситуации играет наличие на рынке большого числа комбинированных препаратов, содержащих НПВС, о чем принимающие их могут и не подозревать. Анализ статистических данных практического применения ТФЭ в скрининге крови на лекарственные и наркотические вещества (п. 3.5) показал, что НПВС являются одними из часто встречающихся препаратов (28,6 %). При этом, как правило, они не являются причиной отравлений, однако, рост числа случаев самолечения данными препаратами, бесконтрольное их применение может способствовать развитию неблагоприятных побочных реакций и потенциальной возможности передозировок.

Следует заострить внимание также на том, что при анализе статистики был отмечен факт частой встречаемости НПВС, в том числе их сочетание в биологических объектах от наркозависимых лиц вместе с наркотическим средством. Существует мнение, что некоторые НПВС применяются наркозависимыми с целью злоупотребления как индивидуально, так и в сочетании друг с другом или наркотическими анальгетиками с целью усиления лечебного эффекта; уменьшения дозировки наркотического анальгетика; для усиления состояния наркотического опьянения и облегчения проявления абстинентного синдрома [381]. Автор делает вывод о необходимости количественного определения НПВС в биологических объектах.

Существует большое количество публикаций по ХТА и СХА НПВС иностранных (Таблица Приложения 1) и отечественных авторов [381-383], однако, как правило, эти исследования посвящены одному из представителей ряда НПВС и рассматриваются они не в системе скрининговых исследований на широкий круг лекарственных и наркотических веществ. Между тем, в экспертной практике на начальном этапе исследований предпочтительнее использование унифицированной методики с целью поиска широкого круга токсикантов, нежели использование множества частных методик на каждое индивидуальное вещество.

Перечисленные факты диктуют необходимость количественной оценки НПВС, для этого было предпринято изучение оптимальных условий их

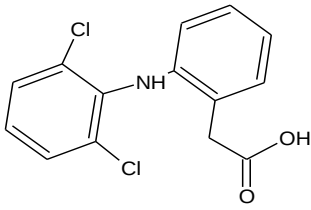
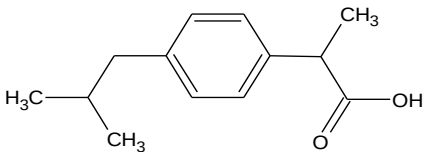
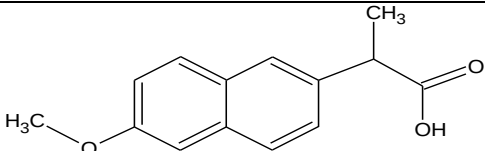
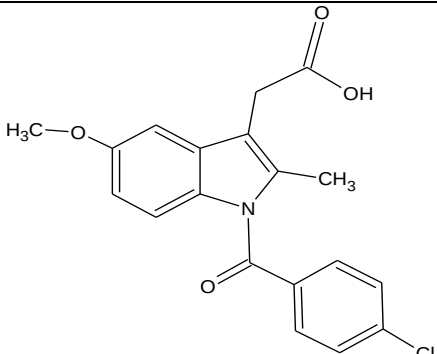
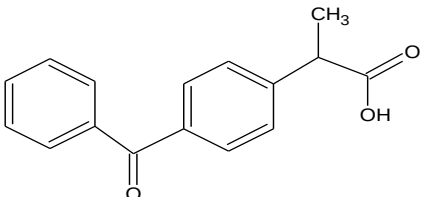
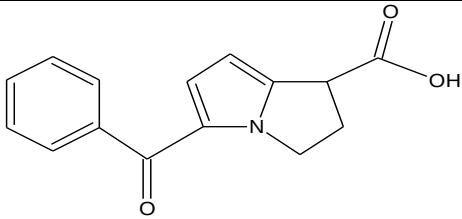
извлечения из крови и валидация методики количественного определения для некоторых НПВС.

3.3.1 Расчет основных физико-химических констант группы нестероидных противовоспалительных средств

Для прогнозирования поведения некоторых НПВС в процессе ТФЭ нами были проведены расчеты их физико-химических характеристик, таких как: константа диссоциации (pK_a), липофильность (LogP), а также учитывая, что в процедуре скрининга применяется буферный раствор с величиной $pH = 4,8$ [374], проведены расчеты значений LogD и K_{OC} для ибупрофена, диклофенака, кеторолака, индометацина, напроксена и кетопрофена при данных условиях. Отметим, что значение величины LogP рассчитывается для нейтральных молекул, а значение LogD отражает соотношение ионизированных и неионизированных форм молекулы при определенных значениях pH раствора. Полученные результаты представлены в таблице 3.11.

Все соединения, исключая кеторолак, являются высоколипофильными. Кеторолак относится к низколипофильным веществам (LogP : 1 – 2,7). Как следует из полученных значений величин коэффициента распределения с учетом концентраций ионизированных форм соединения (LogD) и коэффициента сорбции (K_{OC}), все исследуемые вещества будут адсорбироваться на сорбентах, имеющих обращенную фазу. Это позволяет прогнозировать возможность их выделения в процессе скрининга лекарственных и наркотических веществ при использовании ТФЭ на патронах со смешанной фазой, в частности, SampliQ EVIDEX.

Таблица 3.11 – Результаты расчетов значений pK_a , LogP, LogD и K_{oc} для ряда НПВС

НПВС	pK_a	LogP	Значение при pH=4,8	
			LogD	K_{oc}
 диклофенак	4,18	4,06	3,34	738
 ибупрофен	4,41	3,72	3,18	731
 напроксен	4,40	3,00	2,45	289
 индометацин	4,18	3,10	2,39	223
 кетопрофен	4,11	2,81	2,05	138
 кеторолак	4,47	2,08	1,58	102

Для количественного определения содержания НПВС в крови применялась скрининговая методика, включающая ТФЭ НПВС из цельной крови на патронах со смешанной фазой и последующим анализом методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [374].

Подготовка проб крови для количественной оценки ряда НПВС приведена в п. 2.2.

Получение метильных производных НПВС приведено в п. 2.4.

Количественное определение ряда НПВС проводили методом внутреннего стандарта, сравнивая интенсивность сигнала анализируемых соединений с сигналом ВС, который добавлялся непосредственно в образец для анализа и проходил все стадии пробоподготовки вместе с определяемыми НПВС. В качестве ВС использовался гексенал (как внутренний стандарт в разработанной методике скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества).

Калибровочные стандарты были получены добавлением к 500 мкл крови этанольных растворов, содержащих 4 мкг, 8 мкг, 16 мкг, 28 мкг, 40 мкг ибупрофена и напроксена, 2 мкг, 4 мкг, 8 мкг, 14 мкг, 20 мкг кетопрофена, диклофенака, кеторолака и индометацина, а также внутренний стандарт – гексенал – в количестве 10 мкг. Исследовались по две пробы для каждой концентрации.

Количественное определение НПВС (в виде их метиловых эфиров) проводили по отношению площадей пиков соответствующих ионов и площади пика иона с m/z 235 для *N*-метилгексенала в элюате.

В таблице 3.12 приведены времена удерживания метилированных НПВС и внутреннего стандарта, характеристические ионы, площадь которых использовалась для количественного определения, и соотношение сигнал/шум для нижней калибровочной точки.

Таблица 3.12 – Времена удерживания метилированных НПВС и внутреннего стандарта, опорные характеристические ионы и соотношение сигнал/шум

Соединение	Время удерживания, мин	Характеристический ион, m/z	Соотношение сигнал/шум
Гексенал (вн.ст.)	10,02	235	-
Ибупрофен	8,28	161	900 (8 мг/л)
Напроксен	10,89	185	211 (8 мг/л)
Кетопрофен	11,51	209	1600 (4 мг/л)
Диклофенак	11,91	214	2390 (4 мг/л)
Кеторолак	12,62	210	345 (4 мг/л)
Индометацин	16,05	139	439 (4 мг/л)

3.3.2 Изучение эффективности твердофазной экстракции некоторых нестероидных противовоспалительных средств из крови

С целью оценки влияния элюента на эффективность экстракции НПВС в процедуре ТФЭ были использованы элюенты с различной степенью полярности.

Тип элюента:

1. гексан – этилацетат (3:1); 2. гексан – этилацетат (2:1);
3. гексан – этилацет (1:1); 4. этилацетат.

Эффективность ТФЭ НПВС из исследуемых образцов крови при использовании различных элюентов представлена в таблице 3.13. Количественную оценку эффективности ТФЭ определяли по результатам исследования трех параллельных проб на двух уровнях концентрации НПВС.

Как видно из таблицы 3.13, при использовании в качестве элюента смеси гексан – этилацетат (3:1) наблюдается низкий выход напроксена и кеторолака и недостаточный - для кетопрофена и диклофенака (на низких концентрациях). Максимальный выход 6 соединений НПВС достигается при использовании в качестве элюента смеси гексан – этилацетат (2:1). Дальнейшее увеличение

полярности элюента (гексан – этилацетат (1:1) и этилацетат) не приводит к значительному улучшению эффективности экстракции НПВС.

Таблица 3.13 – Эффективность ТФЭ ряда НПВС из крови при использовании различных элюентов (n = 3)

Элюент: гексан – этилацетат (3:1)				
НПВС	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)
Ибупрофен	4	101 (±5)	40	108 (±5)
Напроксен	4	3,5 (±9)	40	19 (±4,8)
Кетопрофен	2	22 (±8,6)	20	32 (±8)
Диклофенак	2	47 (±6)	20	87 (±4)
Кеторолак	2	3,6 (±14)	20	2 (±16)
Индометацин	2	80 (±6,5)	20	141 (±8,3)
Элюент: гексан – этилацетат (2:1)				
НПВС	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)
Ибупрофен	4	95 (±3,7)	40	100 (±1,5)
Напроксен	4	24 (±5)	40	95 (±3)
Кетопрофен	2	95 (±2,5)	20	115 (±2)
Диклофенак	2	77 (±4,7)	20	104 (±6)
Кеторолак	2	42 (±6)	20	38,5 (±19)
Индометацин	2	123 (±5)	20	133 (±3,5)
Элюент: гексан – этилацетат (1:1)				
НПВС	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)
Ибупрофен	4	94 (±5,5)	40	106 (±4)
Напроксен	4	19 (±6,8)	40	91 (±2,5)
Кетопрофен	2	96 (±3)	20	111 (±4)
Диклофенак	2	66 (±8)	20	81 (±7,5)
Кеторолак	2	37 (±12,5)	20	24 (±22,5)
Индометацин	2	126 (±7)	20	123 (±6)
Элюент: этилацетат				
НПВС	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)	мкг	ЭЭ, % (RSD, %)
Ибупрофен	4	123 (±7)	40	124 (±6)
Напроксен	4	7,5 (±8)	40	96 (±4)
Кетопрофен	2	38 (±10)	20	111 (±9)
Диклофенак	2	49 (±12)	20	94 (±6,5)
Кеторолак	2	10 (±14)	20	58 (±18)
Индометацин	2	112 (±6)	20	127 (±7,5)

Самая низкая эффективность экстракции наблюдается у кеторолака, что ожидаемо, учитывая его низколипофильные свойства, и подтверждено экспериментальными данными [377].

Таким образом, смесь гексан – этилацетат (2:1) рекомендуется в качестве элюента в скрининге крови на наркотические и лекарственные вещества для выделения и идентификации НПВС на патронах со смешанной фазой.

С целью изучения пригодности предложенной методики количественного определения НПВС непосредственно в процедуре скрининга крови была проведена ее валидационная оценка [384].

3.3.3 Валидация методики количественного определения ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови по показателям специфичность, линейность, правильность, прецизионность

При определении пригодности разработанных скрининговых условий количественного определения некоторых НПВС в цельной крови в соответствии с действующими руководствами [385, 386], были определены следующие валидационные параметры: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость).

Определение специфичности методики проводили методом ГХ-МС. Хроматограмма модельной смеси метильных производных ряда НПВС в режиме полного сканирования ионов приведена на рисунке 3.12.

Времена удерживания ряда метилированных НПВС и внутреннего стандарта приведены в таблице 3.12.

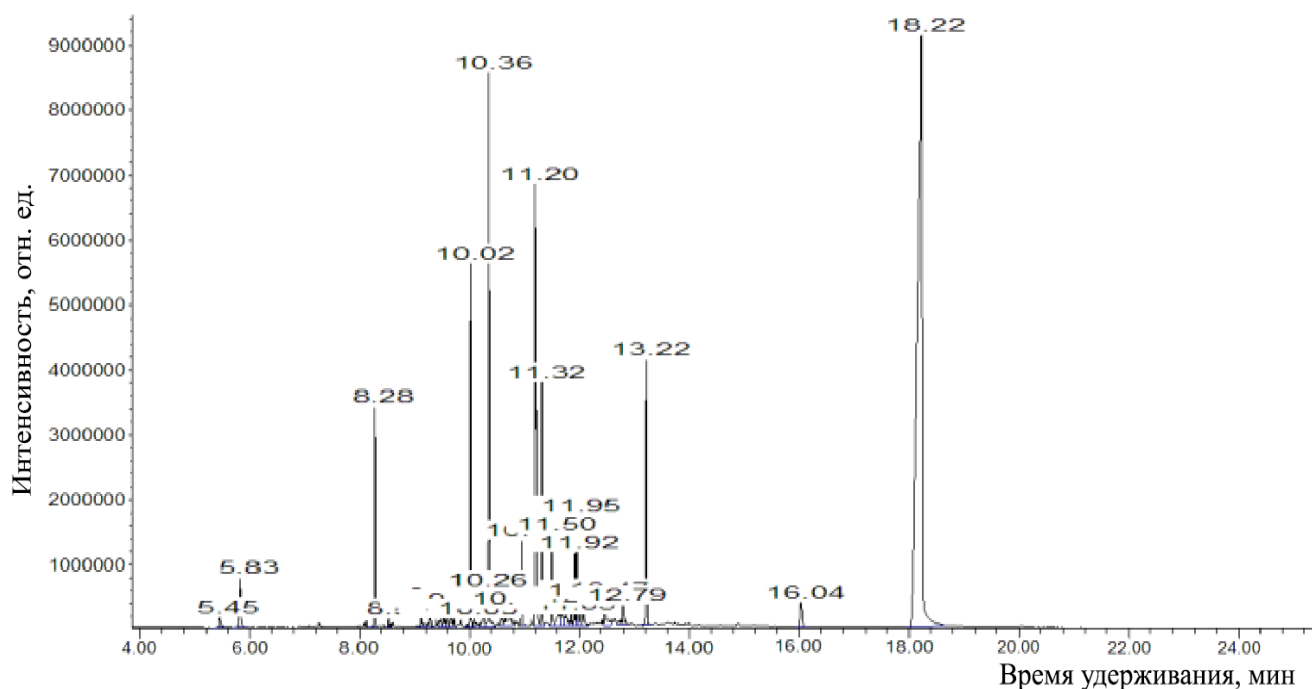


Рисунок 3.12 – ГХ-МС (ЭИ, ПИТ) хроматограмма модельной смеси ряда метилированных НПВС

Для определения специфичности прибегли к сравнению масс-спектров пиков метиловых эфиров ибупрофена, напроксена, кетопрофена, диклофенака, кеторолака, индометацина с библиотечными спектрами метиловых эфиров соответствующих НПВС, представленных на рисунках 3.13, 3.15, 3.17, 3.19, 3.21, 3.23, соответственно.

Также были построены хроматографические профили по трем основным характеристическим ионам метиловых эфиров шести рассматриваемых НПВС, доказывающие гомогенность хроматографических пиков для каждого НПВС, и соответствующей им бланковой крови. Ионные профили метиловых эфиров ибупрофена, напроксена, кетопрофена, диклофенака, кеторолака, индометацина в образцах бланковой крови и в образцах крови с добавкой приведены на рисунках 3.14, 3.16, 3.18, 3.20, 3.22, 3.24, соответственно.

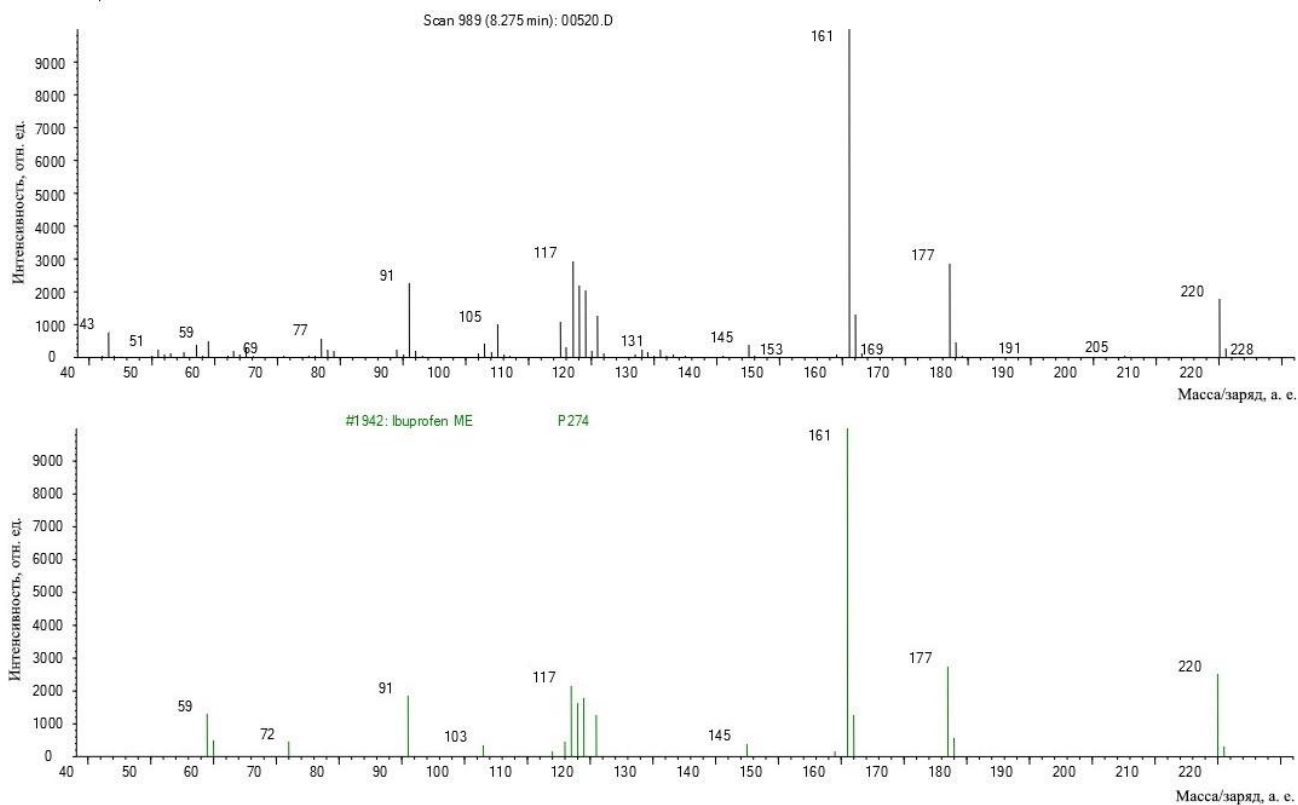


Рисунок 3.13 – Сравнение масс-спектра пика метилового эфира ибупрофена (ГХ-МС, ЭИ) с библиотечным масс-спектром

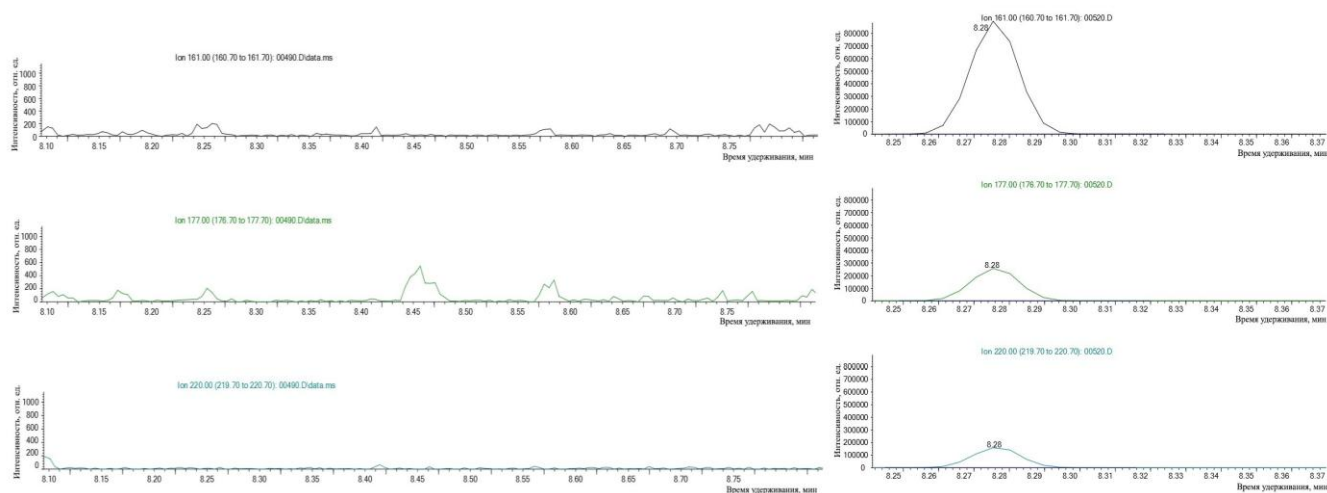


Рисунок 3.14 – Ионные профили метилового эфира ибупрофена в образце бланковой крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ). Концентрация ибупрофена 8 мг/л, отношение сигнал/шум 900 ($m/z = 161$)

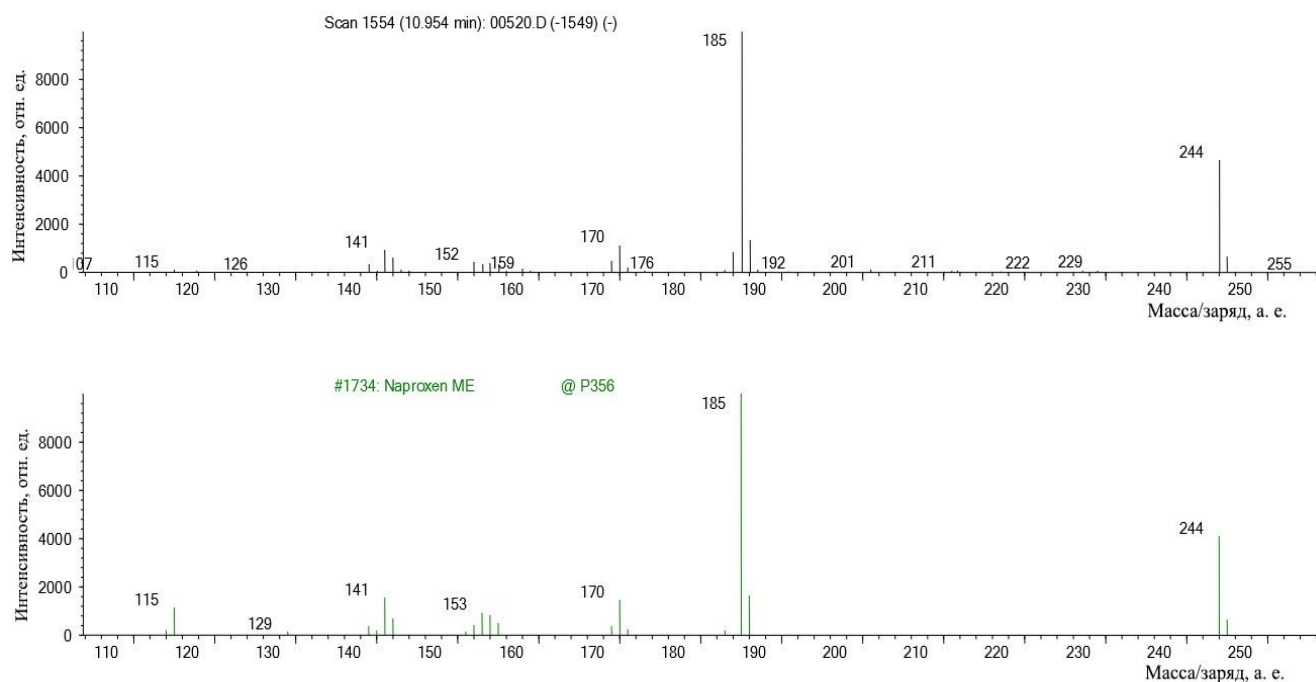


Рисунок 3.15 – Сравнение масс-спектра пика метилового эфира напроксена с библиотечным масс-спектром (ГХ-МС, ЭИ)

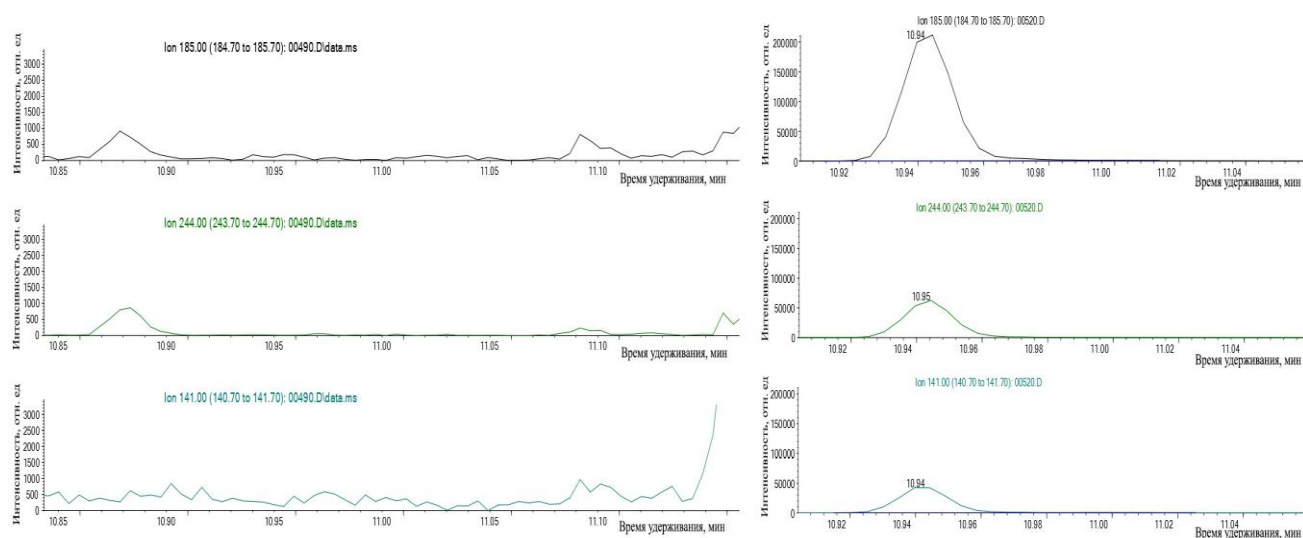


Рисунок 3.16 – Ионные профили метилового эфира напроксена в образце blankетной крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ).
Концентрация 8 мг/л, отношение сигнал/шум 211 (m/z 185)

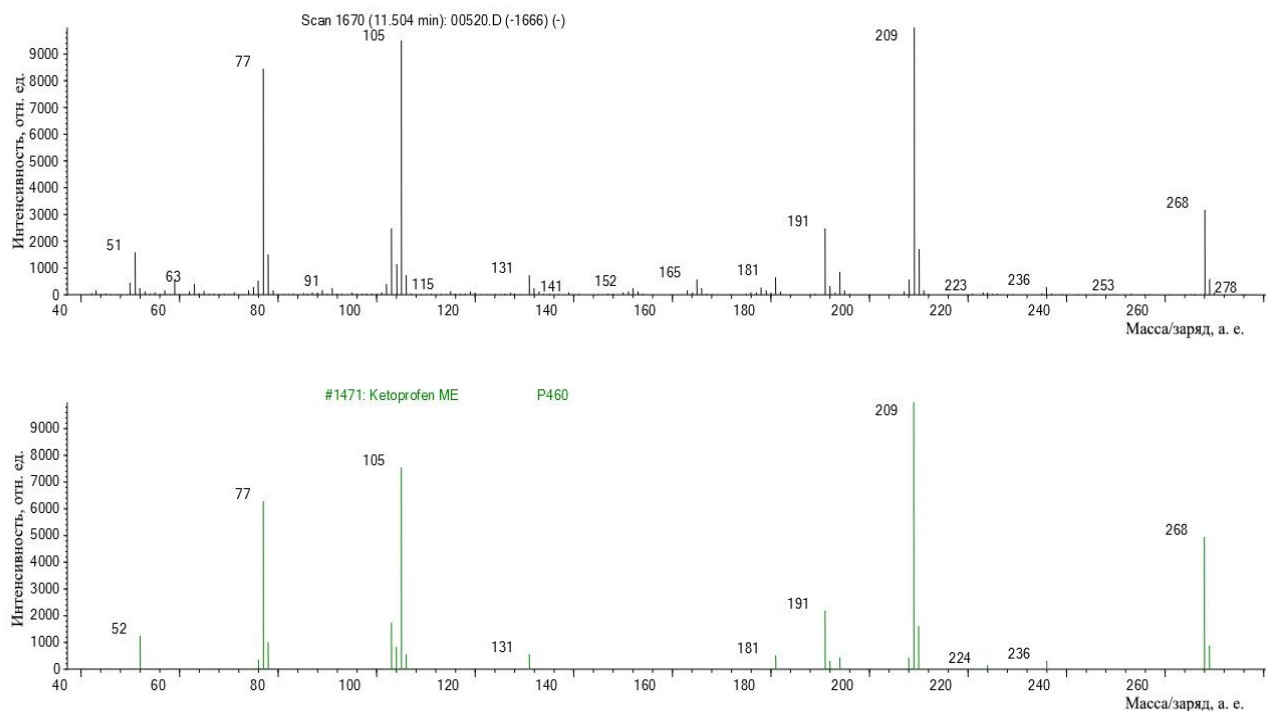


Рисунок 3.17 – Сравнение масс-спектра пика с библиотечным масс-спектром метилового эфира кетопрофена (ГХ-МС, ЭИ)

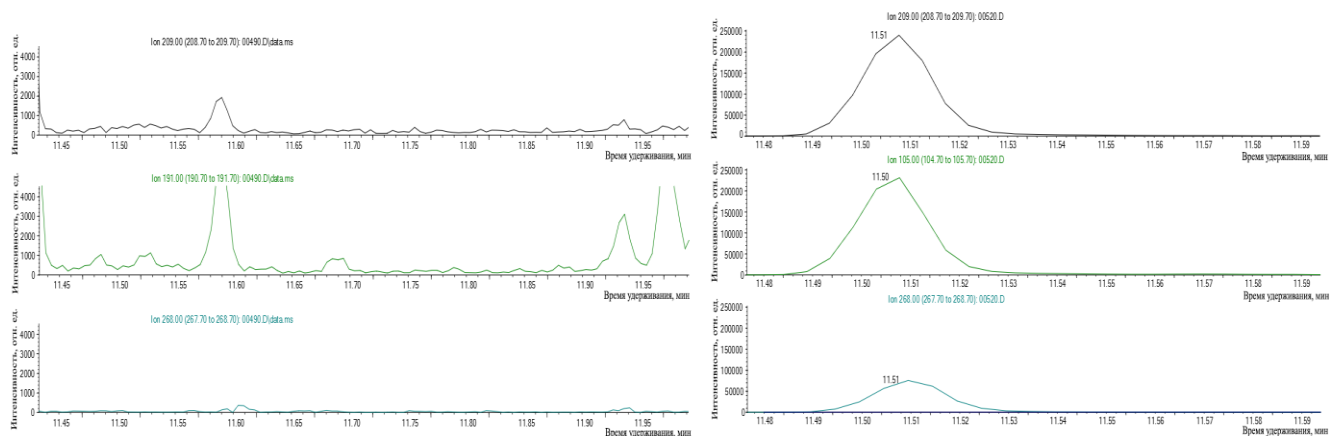


Рисунок 3.18 – Ионные профили метилового эфира кетопрофена в образце blankовой крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ). Концентрация 4 мг/л, отношение сигнал/шум 1600 ($m/z = 209$)

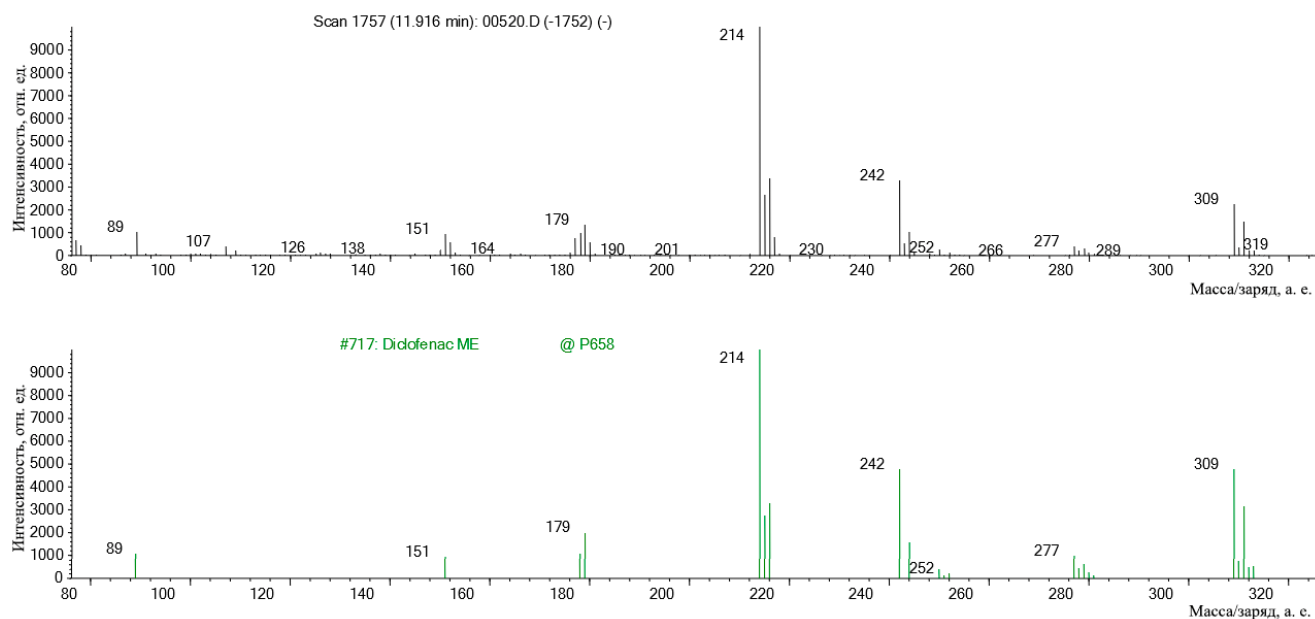


Рисунок 3.19 – Сравнение масс-спектра пика метилового эфира диклофенака с библиотечным масс-спектром (ГХ-МС, ЭИ)

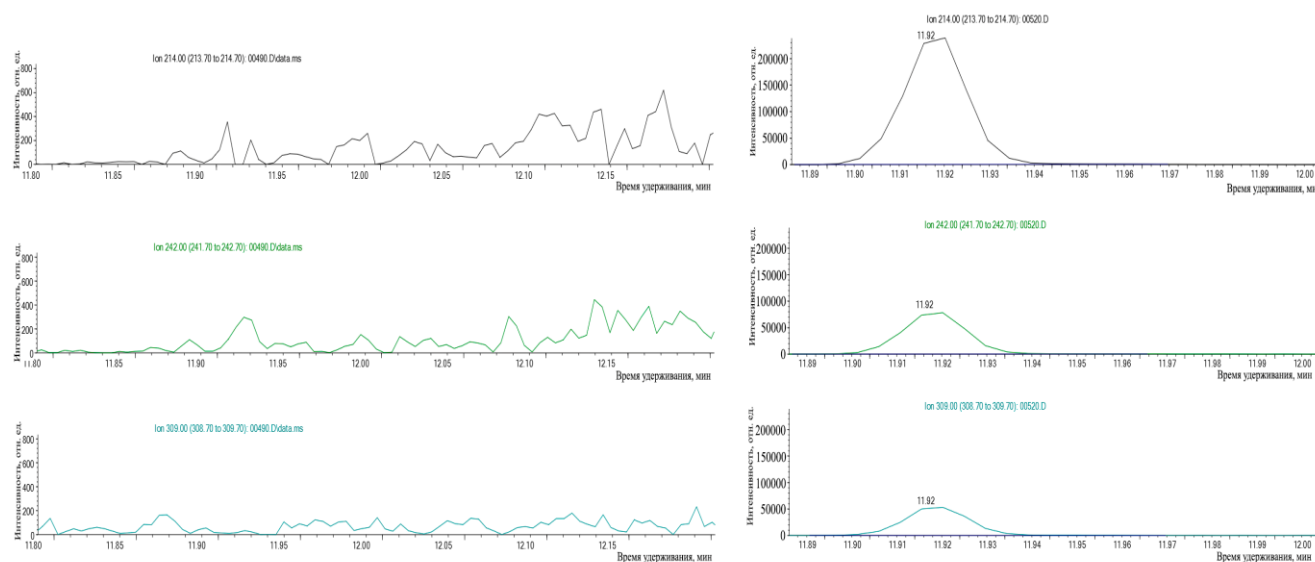


Рисунок 3.20 – Ионные профили метилового эфира диклофенака в образце blankовой крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ). Концентрация 4 мг/л, отношение сигнал/шум 2390 ($m/z = 214$)

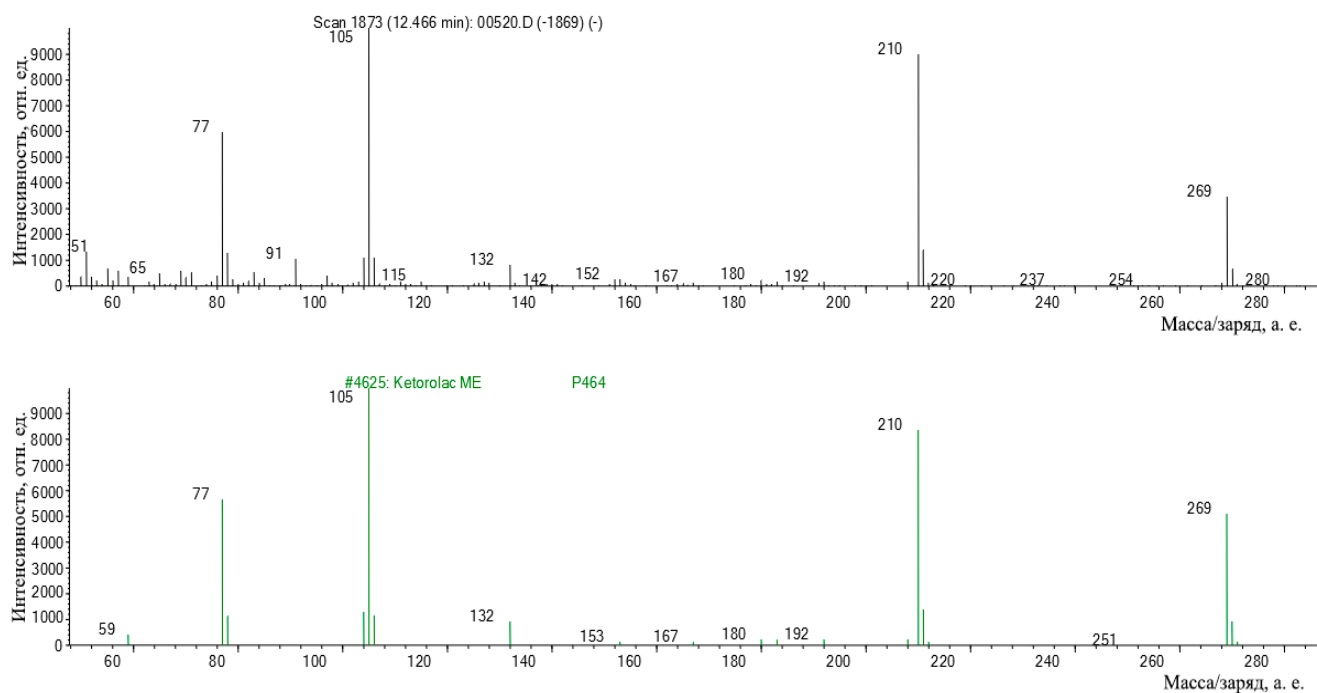


Рисунок 3.21 – Сравнение масс-спектра пика метилового эфира кеторолака с библиотечным масс-спектром (ГХ-МС, ЭИ)

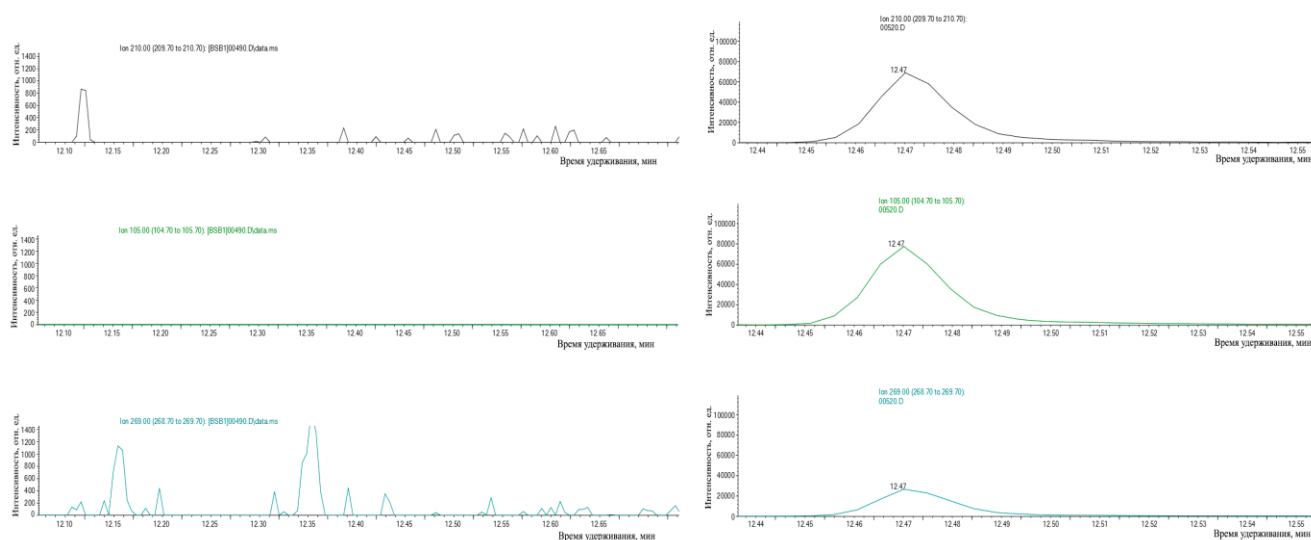


Рисунок 3.22 – Ионные профили метилового эфира кеторолака в образце бланковой крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ). Концентрация 4 мг/л, отношение сигнал/шум 345 ($m/z = 210$)

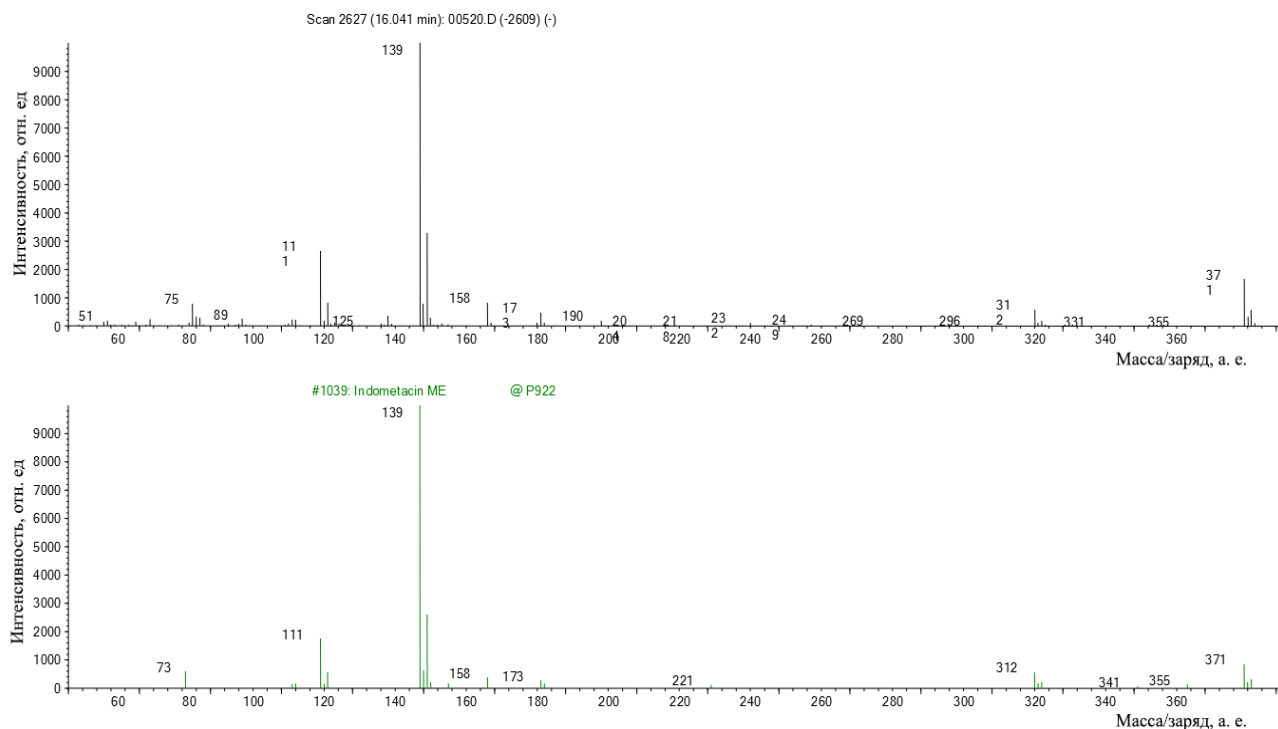


Рисунок 3.23 – Сравнение масс-спектра пика метилового эфира индометацина с библиотечным масс-спектром (ГХ-МС, ЭИ)

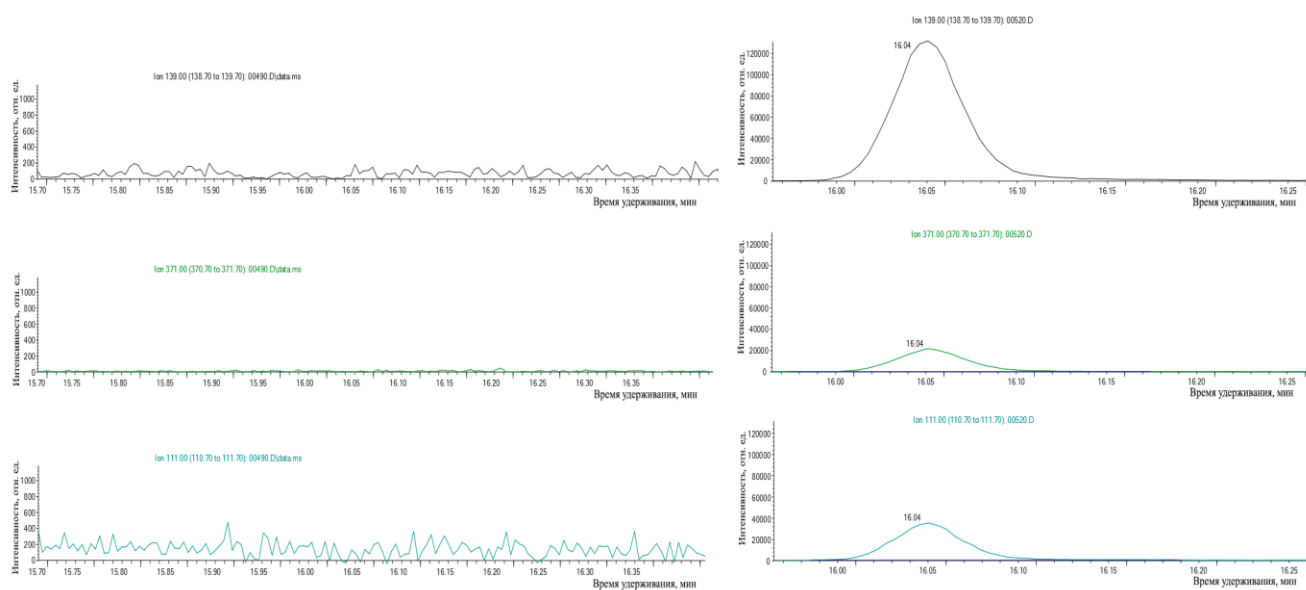


Рисунок 3.24 – Ионные профили метилового эфира индометацина в образце blankовой крови (слева) и образце крови с добавкой (справа) (ГХ-МС, ЭИ). Концентрация 4 мг/л, отношение сигнал/шум 439 ($m/z = 139$)

Установлено, что в экстрактах blankовой крови с учетом соотношения сигнал/шум отсутствуют хроматографические пики на месте выхода

анализируемых НПВС, что свидетельствует о специфичности предложенной методики количественного определения НПВС. Таким образом, скрининговая методика количественного определения ряда НПВС **специфична** и позволяет достоверно определять ибупрофен, напроксен, кетопрофен, диклофенак, кеторолак и индометацин в крови.

Изучение **линейности** проводили на 5 количественных уровнях НПВС в крови: 4, 8, 16, 28, 40 мкг – для ибупрофена и напроксена, 2, 4, 8, 14, 20 мкг – для индометацина, кетопрофена, диклофенака и кеторолака (10 мкг гексенала в качестве внутреннего стандарта), критерий приемлемости – коэффициент корреляции не ниже 0,98 [362]. Для каждой из 5 концентраций ряда НПВС проводили исследование двух параллельных проб крови.

Калибровочные прямые, демонстрирующие зависимость отношения площадей пиков ионных фрагментов с соответствующими каждому НПВС величинами m/z и 235 гексенала (Таблица 3.12) к концентрациям ибупрофена, напроксена, индометацина, кетопрофена, диклофенака и кеторолака приведены на рисунках 3.25 – 3.30.

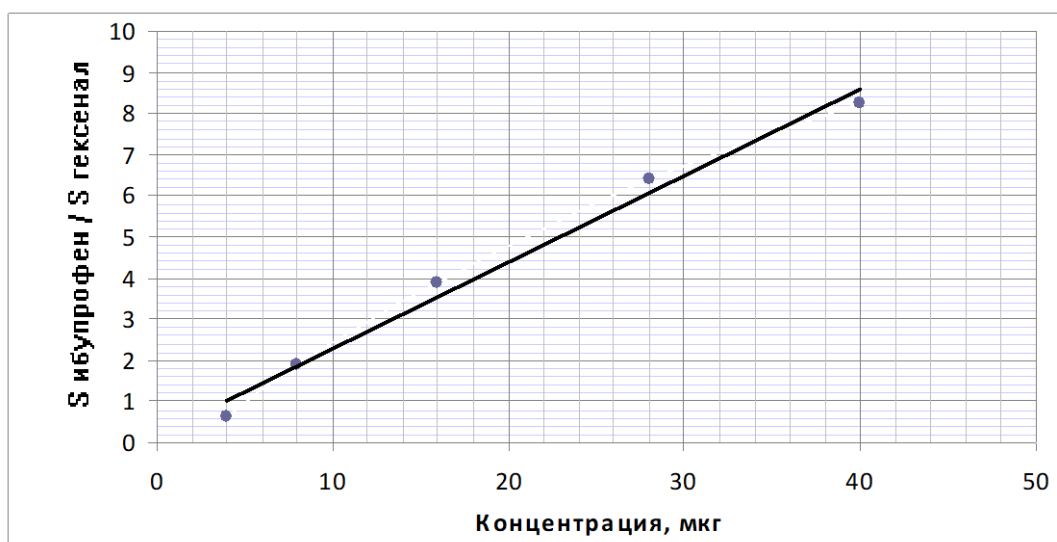


Рисунок 3.25 – Градуировочный график для ибупрофена

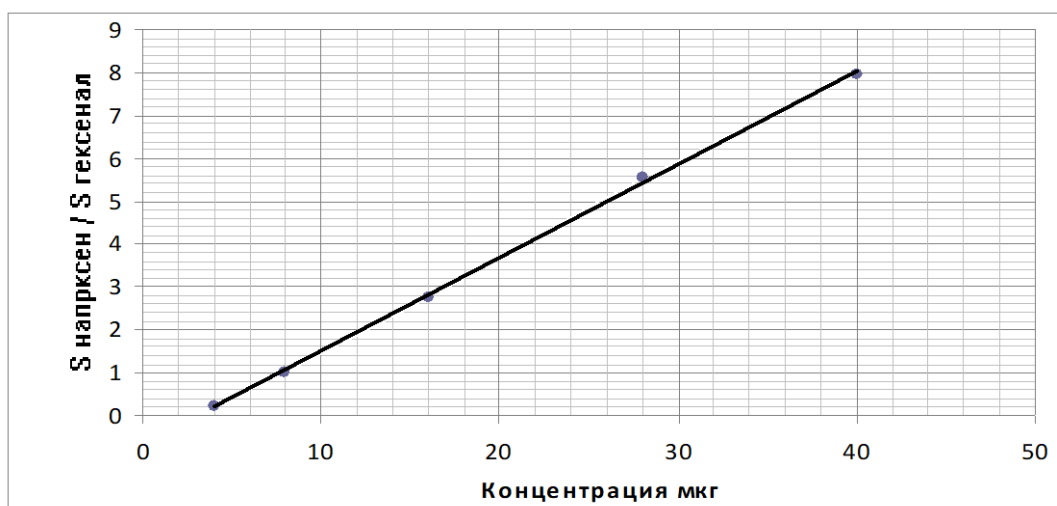


Рисунок 3.26 – Градуировочный график для напроксена

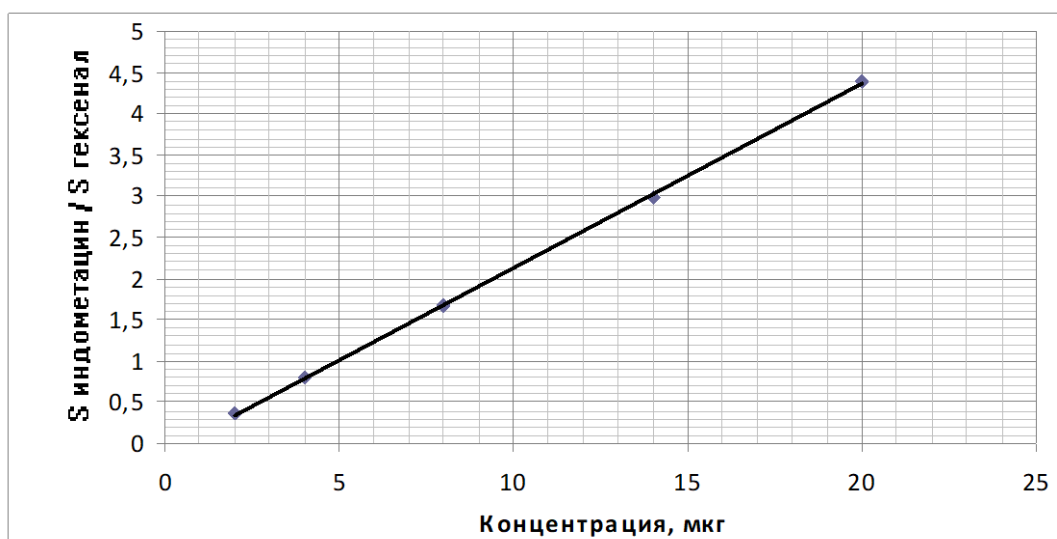


Рисунок 3.27 – Градуировочный график для индометацина

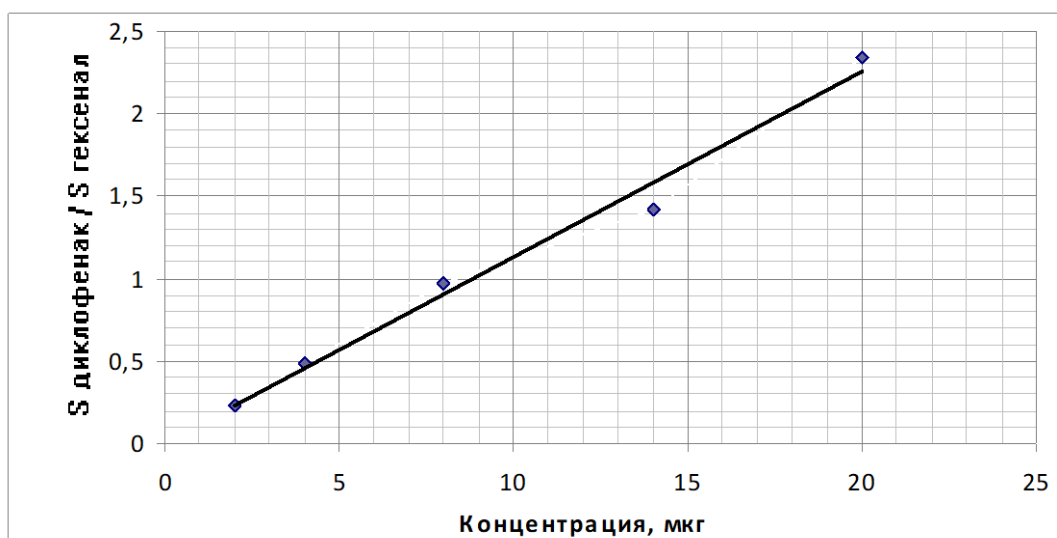


Рисунок 3.28 – Градуировочный график для диклофенака

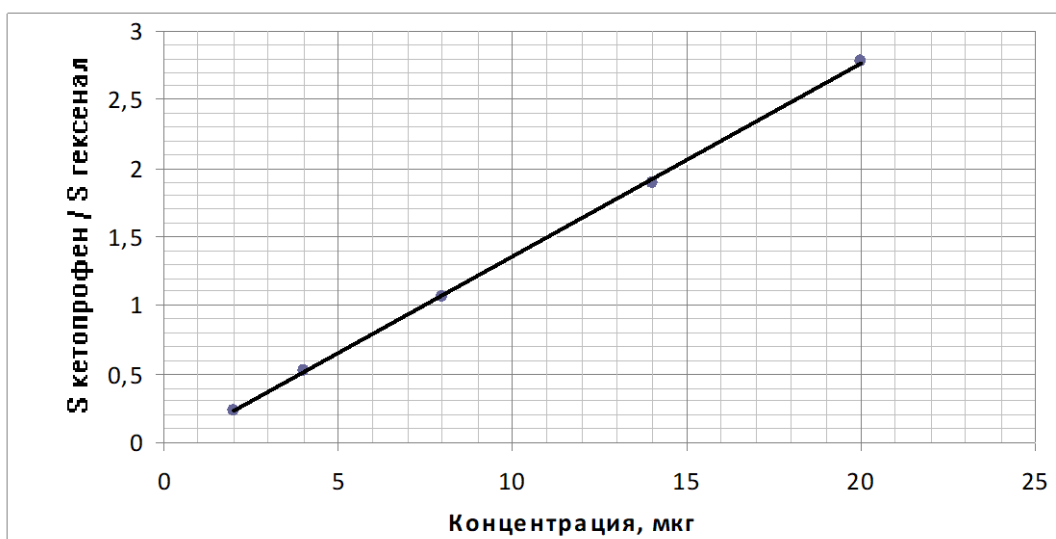


Рисунок 3.29 – Градуировочный график для кетопрофена

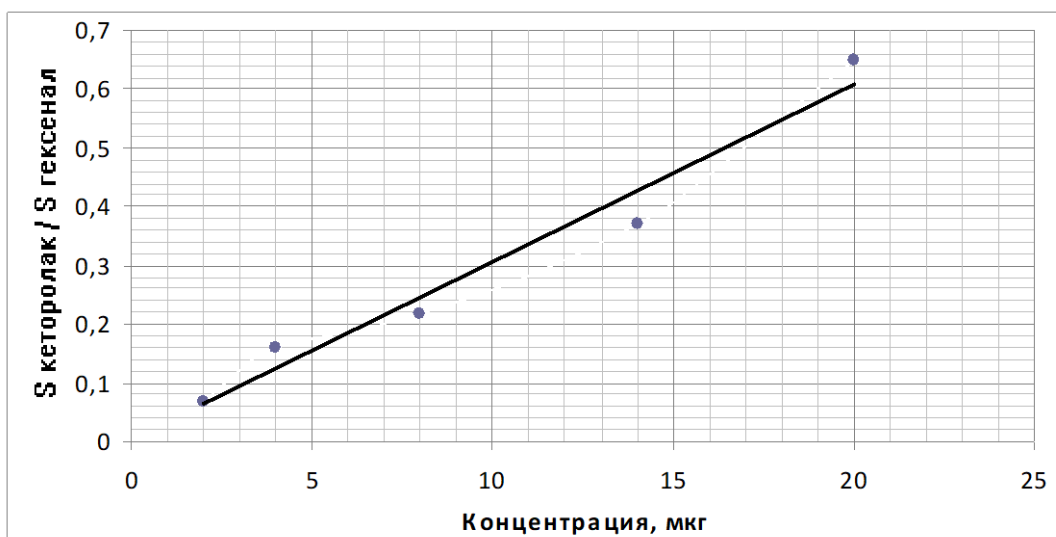


Рисунок 3.30 – Градуировочный график для кеторолака

На основании полученных расчетных данных, представленных в таблице 3.15, рассчитаны коэффициенты регрессионной прямой вида $y = b \times x + a$ методом наименьших квадратов.

На основании проведенных расчетов можно утверждать о соблюдении линейности выбранной методики для определения индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака в крови, т.к. коэффициент их корреляции находится в пределах 0,9864 – 0,9998.

Таблица 3.15 – Характеристика соблюдения линейности при количественном определении диклофенака, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака, напроксена в крови (n = 5)

диклофенак					
Количество, мкг	2	4	8	14	20
Величина АС	0,228	0,48	0,97	1,42	2,338
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9864				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,1121				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	0,0098				
ибупрофен					
Количество, мкг	4	8	16	28	40
Величина АС	0,791	2,011	3,836	6,219	8,344
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9877				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,2104				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	0,1622				
индометацин					
Количество, мкг	2	4	8	14	20
Величина АС	0,35375	0,8056	1,66645	2,995	4,39505
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9998				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,2236				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	-0,1037				
кетопрофен					
Количество, мкг	2	4	8	14	20
Величина АС	0,234	0,5175	1,061	1,89965	2,77735
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9998				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,1408				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	-0,054				
кеторолак					
Количество, мкг	2	4	8	14	20
Величина АС	0,0703	0,1518	0,169	0,3608	0,564
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9658				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,0302				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	0,0026				
напроксен					
Количество, мкг	4	8	16	28	40
Величина АС	0,239	1,025	2,765	5,568	7,9695
Коэффициент корреляции, <i>r</i>	0,9993				
Тангенс угла наклона прямой (наклон), <i>b</i>	0,2176				
Точка пересечения с осью ординат, <i>a</i>	-0,6649				

Линейность не соблюдается в случае определения кеторолака, коэффициент корреляции которого равен 0,9658, что характеризует высокую степень влияния случайных внешних факторов (физико-химические свойства вещества, природа используемых растворителей и т.п.) на зависимость концентрация НПВС/отношение площадей пиков определяемого вещества и стандарта.

Правильность выбранной методики хромато-масс-спектрометрического определения после ТФЭ НПВС в крови оценивали на всем диапазоне ее применения. Определение проводили с использованием модельных образцов крови с добавками НПВС в количестве 5 мкг, 20 мкг и 30 мкг (для ибупрофена, напроксена) и в количестве 2,5 мкг, 10 мкг и 15 мкг (для диклофенака, индометацина, кетопрофена, кеторолака).

Результаты, полученные для девяти определений для каждого образца (по три концентрации с трехкратным определением для каждой концентрации), представленные в таблице 3.16, подтвердили правильность валидируемой методики количественного определения НПВС.

Во всех случаях величина критерия приемлемости вычисленного критерия Стьюдента ($t_{\text{выч}}$) находится в диапазоне от 0,2 до 2,59, что значительно ниже табличного значения критерия Стьюдента, равного 4,30 (при заданной доверительной вероятности $P = 95\%$ и числу степеней свободы $f = n - 1$).

Таблица 3.16 – Результаты количественного определения НПВС в образцах модельной крови для подтверждения правильности методики ($t(P, f)_{\text{табл}} = 4,30$)

диклофенак									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	2,07			9,80			14,14		
$t_{\text{выч}}$	1,73	1,15	1,15	0,92	1,07	1,99	0,81	1,96	1,15
ибупрофен									
Количество НПВС в образце, мкг	5			20			30		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	3,45			20,58			30,70		
$t_{\text{выч}}$	1,15	1,82	1,97	0,69	1,97	1,28	0,29	1,86	1,57
индометацин									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	2,53			10,33			15,28		
$t_{\text{выч}}$	1,44	0,29	1,73	1,17	0,07	1,77	0,95	1,99	0,95
кетопрофен									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	2,26			9,66			14,58		
$t_{\text{выч}}$	1,73	1,15	0,58	1,97	0,94	1,02	1,46	2,00	0,53
кеторолак									
Количество НПВС в образце, мкг	2,5			10			15		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	2,88			11,93			17,93		
$t_{\text{выч}}$	0,29	2,59	2,31	0,43	1,47	1,91	0,28	1,57	1,85
напроксен									
Количество НПВС в образце, мкг	5			20			30		
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n = 3$)	4,63			19,16			29,18		
$t_{\text{выч}}$	1,89	1,42	0,47	1,48	0,39	1,90	0,62	0,97	1,34

Для исследования **повторяемости** (сходимости) проанализированы 9 модельных образцов крови трижды для каждой концентрации ряда НПВС. При этом пробоподготовка и анализ были проведены в один день, одним аналитиком и на одной и той же аппаратуре. Критерий приемлемости – коэффициент вариации должен быть не более 15% [386]. Результаты количественного определения диклофенака, ибупрофена, индометацина, кетопрофена, кеторолака и напроксена и полученные метрологические характеристики представлены в таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Результаты количественного определения НПВС в образцах модельной крови для подтверждения повторяемости методики

диклофенак			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,03	8,69	13,76
Стандартное отклонение, SD	0,08	0,11	0,23
Коэффициент вариации, RSD, %	4,03	1,29	1,63
ибупрофен			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	3,66	17,85	34,53
Стандартное отклонение, SD	0,16	0,35	0,56
Коэффициент вариации, RSD, %	4,39	1,93	1,61
индометацин			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,54	9,35	14,98
Стандартное отклонение, SD	0,1	0,21	0,26
Коэффициент вариации, RSD, %	4,04	2,27	1,76

Продолжение таблицы 3.17

кетопрофен			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $\bar{x}_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,38	9,22	14,39
Стандартное отклонение, SD	0,13	0,16	0,05
Коэффициент вариации, RSD, %	5,51	1,77	0,36
кеторолак			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $\bar{x}_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,62	9,80	13,22
Стандартное отклонение, SD	0,06	4,01	3,27
Коэффициент вариации, RSD, %	2,1	40,96	24,72
напроксен			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $\bar{x}_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	5,55	19,68	30,43
Стандартное отклонение, SD	0,14	0,68	0,17
Коэффициент вариации, RSD, %	2,52	3,43	0,55

Полученные результаты позволяют сделать вывод о подтверждении **прецизионности** выбранной методики на уровне **повторяемости** для диклофенака, ибупрофена, индометацина, кетопрофена и напроксена, т.к. коэффициент вариации при анализе проб крови с этими НПВС находится в пределах 0,36 – 5,51. При анализе модельных образцов крови, содержащих кеторолак, выявлено, что коэффициент вариации больше 15%, что не подтверждает прецизионность выбранной методики количественного определения на уровне повторяемости при анализе кеторолака в диапазоне выбранных концентраций.

Внутрилабораторную прецизионность исследовали путем анализа модельных образцов крови в разное время в одной лаборатории в течение 5 дней. Для этого было приготовлено по 3 раствора модельной смеси для каждой из трех концентраций. Каждый день исследовали по девять образцов в трех концентрациях, каждую из которых повторяли по три раза. Результаты представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Результаты количественного определения НПВС в образцах модельной крови для определения внутрилабораторной прецизионности методики

диклофенак			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,23	9,58	14,76
Стандартное отклонение, SD	0,17	0,63	1,09
Коэффициент вариации, RSD, %	1,97	1,7	1,91
ибупрофен			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	3,30	19,35	31,24
Стандартное отклонение, SD	0,39	1,32	3,43
Коэффициент вариации, RSD, %	3,02	1,76	2,83
индометацин			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,58	10,02	15,62
Стандартное отклонение, SD	0,09	0,69	1,39
Коэффициент вариации, RSD, %	0,91	1,77	2,31
кетопрофен			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $x_{\text{ср}}$, мкг ($n=3$)	2,46	9,75	15,10

Продолжение таблицы 3.18

Стандартное отклонение, SD	0,15	0,41	0,82
Коэффициент вариации, RSD, %	1,59	1,08	1,41
кеторолак			
Количество НПВС в образце, мкг	2,5	10	15
Найденное количество, $\bar{x}_{\text{ср}}$, мкг (n=3)	3,62	13,77	20,14
Стандартное отклонение, SD	0,90	4,65	7,90
Коэффициент вариации, RSD, %	6,45	8,72	10,13
напроксен			
Количество НПВС в образце, мкг	5	20	30
Найденное количество, $\bar{x}_{\text{ср}}$, мкг (n=3)	5,06	19,81	30,96
Стандартное отклонение, SD	0,46	0,75	1,38
Коэффициент вариации, RSD, %	2,34	0,97	1,15

Как следует из полученных результатов, коэффициент вариации на всех уровнях концентрации не превышает 15%, что соответствует установленному критерию приемлемости [385, 386] для всех исследуемых НПВС.

Таким образом, доказана пригодность разработанной скрининговой методики количественного определения НПВС в цельной крови для кетопрофена, индометацина, напроксена, ибупрофена и диклофенака по параметрам специфичность, линейность, правильность, прецизионность. Методика непригодна для количественного определения кеторолака по показателям линейность, прецизионность (повторяемость).

Такой результат для кеторолака можно объяснить его несколько отличными от других рассмотренных НПВС физико-химическими свойствами и, как следствие, не оптимальными условиями пробоподготовки в рамках скрининговой методики.

В целом, показана возможность идентификации и количественного определения ряда НПВС непосредственно в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [377, 384].

3.4. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок

Учитывая коммерческую доступность различных патронов для ТФЭ на рынке хроматографической продукции и разнохарактерную информацию исследователей о качестве и идентичности патронов разных производителей следующим этапом работы было оценить и сравнить эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых торговых марок [387].

В настоящее время на рынке присутствует большое количество предложений по патронам для ТФЭ различных производителей. Выбор подходящего патрона для ТФЭ как по качественным характеристикам, так и по ценовым параметрам, является актуальным вопросом при проведении химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Сорбенты всех исследуемых патронов имели силикагелевую основу и одинаковый декларируемый состав привитой смешанной фазы (C8 + бензолсульфокислота), таблица 3.19. Другие характеристики, заявленные производителями, были следующими: площадь поверхности $500 \text{ м}^2/\text{г}$, размер пор $60\text{-}70 \text{ \AA}$, размер частиц сорбента $40\text{-}60 \text{ мкм}$.

Для исследования использовали 5 типов патронов известных торговых марок, а так же предлагаемые в качестве их аналогов, патроны Starlab C8/SCX. Все типы патронов содержат сорбенты на основе силикагеля со смешанным

типом фазы: обращенная (октил-, C8) и катионообменная (бензолсульфокислота, SCX).

Таблица 3.19 – Сведения о патронах для ТФЭ

Патрон (тип)	Бренд (модель)	Производитель	Масса, мг	Объем, мл	Относительная стоимость
EVIDEX	SampliQ	Agilent	200	3	1,0*
Screen-C	Strata	Fenomenex	200	3	0,62
Certify	Bond Elut	Varian	200	3	1,82
Verify CX	HyperSep	Thermo Scientific	200	6	1,91
Drug	Chromabond	Macherey-Nagel	200	3	1,33
C8/SCX	Starlab	Starlab Scientific Co., Ltd	200	3	н.д.

н.д. – нет данных

* – за условную единицу стоимости были приняты патроны SampliQ EVIDEX, стоимость остальных патронов представлена относительно патронов этой марки

Патроны Starlab C8/SCX исследованной партии имели признаки использования в производстве некачественного сорбента. Данный вывод обусловлен «смывом» привитой фазы, а так же химическим загрязнением, обусловленным технологическим процессом производства сорбентов. Артефакты фазы C8 наблюдались в обоих элюатах (рисунки 3.31 - 3.33), имидазол определялся в элюате II (рисунок 3.34).

Исходя из этих фактов, патроны Starlab C8/SCX в дальнейшем исследовании не использовали. Так же следует отметить, что для остальных типов патронов подобных проблем качества нами не наблюдалось.

В таблице 3.20 приведены результаты оценки ЭЭ модельных соединений из крови на патронах для ТФЭ пяти различных брендов.

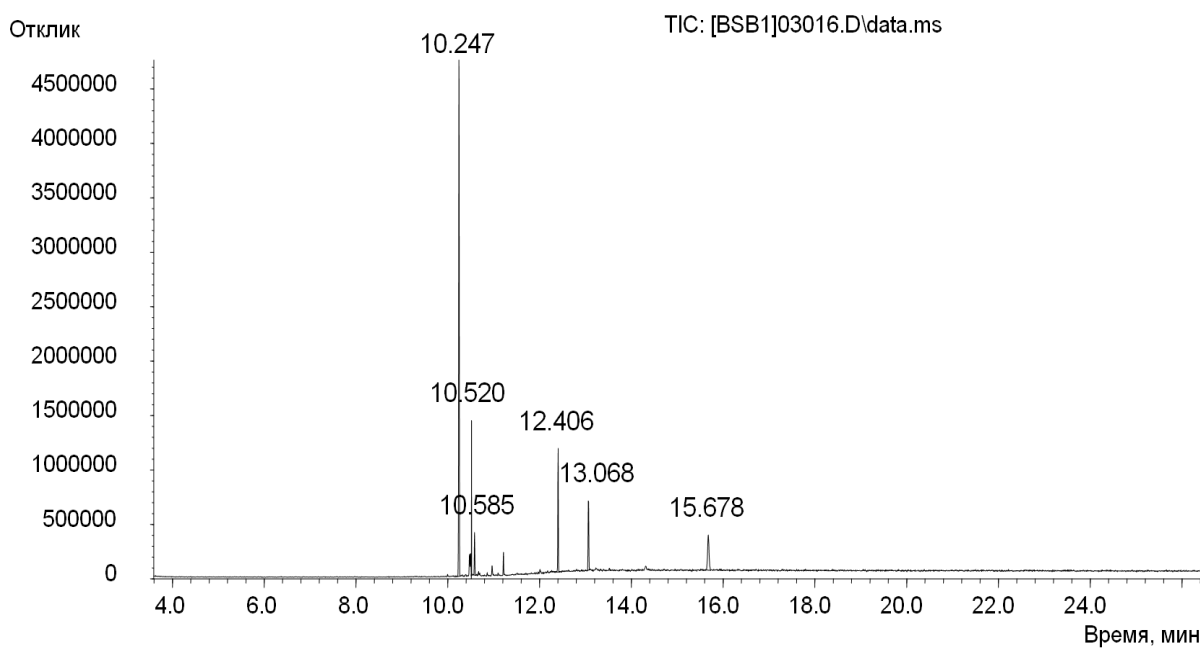


Рисунок 3.31 – ГХ-МС (ЭИ, ПИТ) хроматограмма элюата I, полученного на патроне Starlab C8/SCX

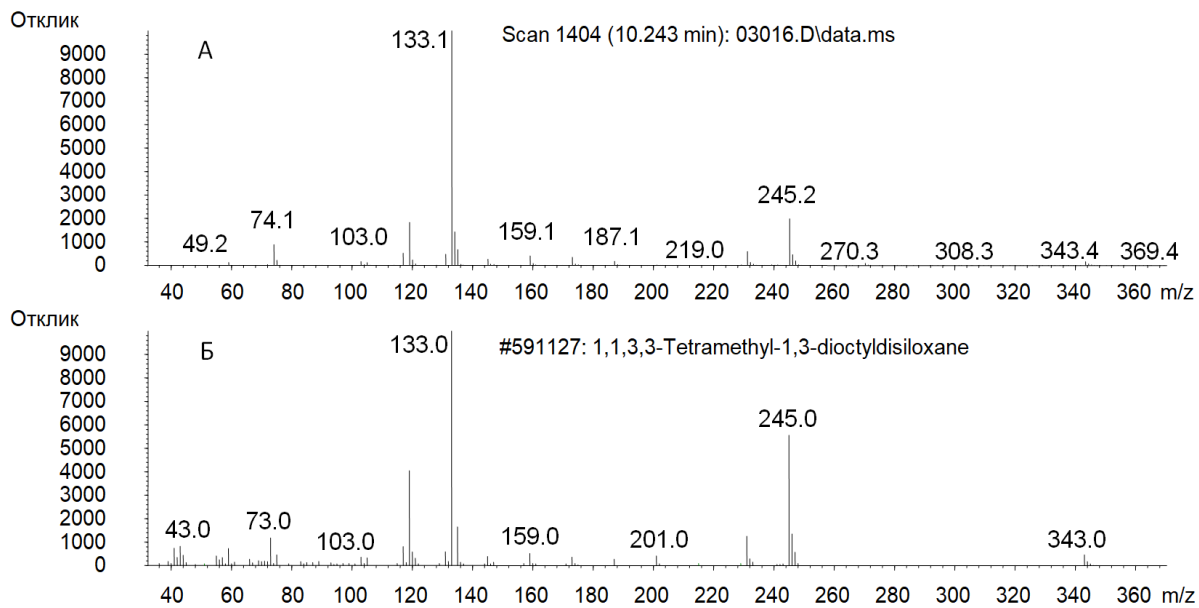


Рисунок 3.32 – Сравнение масс-спектра пика с временем удерживания 10,25 мин (сверху) с библиотечным масс-спектром спектра 1,1,3,3-тетраметил-1,3-диоктилдисилоксана (снизу)

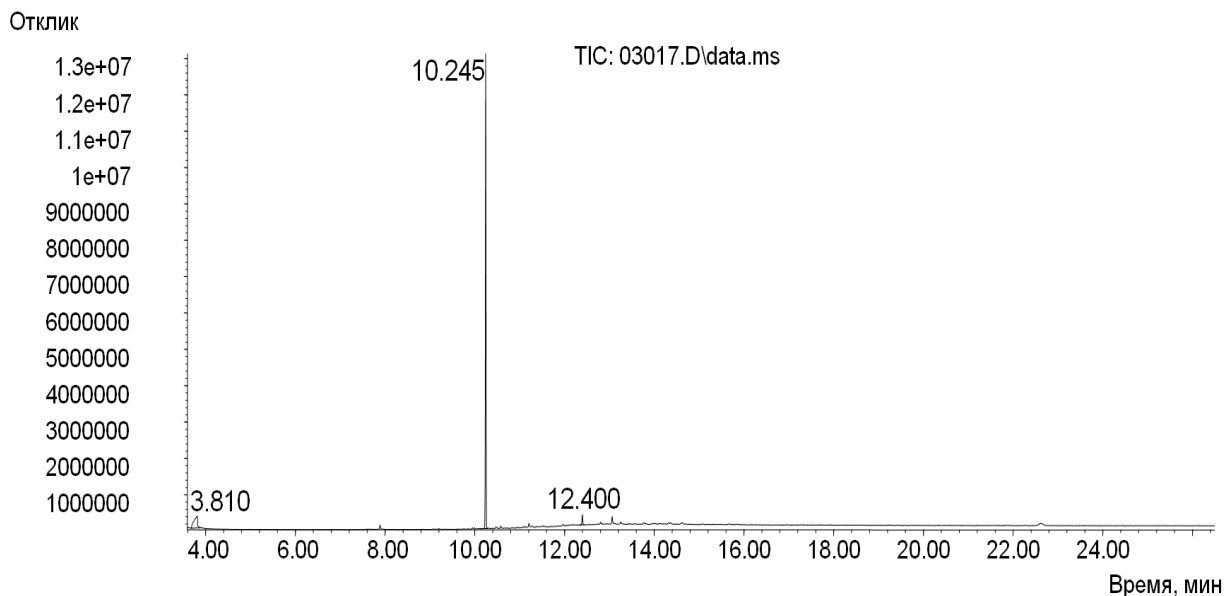


Рисунок 3.33 – ГХ-МС (ЭИ, ПИТ) хроматограмма элюата II, полученного на патроне Starlab C8/SCX

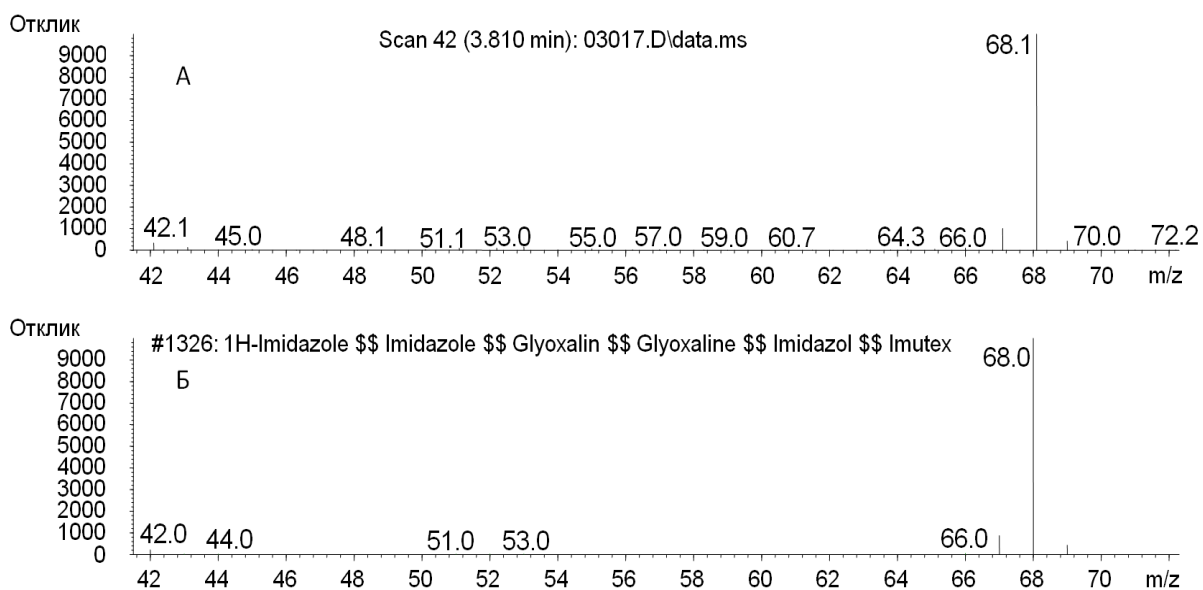


Рисунок 3.34 – Сравнение масс-спектра пика с временем удерживания 3,81 мин (сверху) с библиотечным масс-спектром спектра имидазола (снизу)

Таблица 3.20 – Результаты оценки эффективности экстракции модельных соединений (n = 6, RSD, %)

Соединение	Evidex SampliQ (Agilent)		Strata Screen-C (Phenomenex)		Bond Elut Certify (Varian)		HyperSep Verify- CX (Thermo)		Chromabond Drug (Macherey-Nagel)	
	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II
Салициловая кислота	0,82 (91)	н.о.	следы	н.о.	следы	н.о.	0,02 (90)	н.о.	н.о.	н.о.
Фенобарбитал	88 (8,6)	н.о.	81 (4,6)	н.о.	81 (3,5)	н.о.	79 (9,0)	н.о.	84 (2,6)	н.о.
Кеторолак	27 (13)	н.о.	30 (49)	н.о.	12 (90)	н.о.	7,0 (53)	н.о.	14 (98)	н.о.
Диазепам	61 (9,9)	н.о.	60 (23)	н.о.	55 (4,2)	0,91 (99)	60 (6,4)	2,4 (58)	68 (2,5)	1,7 (56)
Индометацин	101 (5,2)	н.о.	106 (3,6)	н.о.	97 (1,6)	н.о.	100 (4,0)	н.о.	105 (2,7)	н.о.
Экгонин	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Амфетамин	н.о.	93 (4,5)	н.о.	104 (20)	н.о.	98 (1,4)	н.о.	90 (12)	н.о.	97 (2,2)
Изониазид	н.о.	0,69 (33)	н.о.	1,1 (30)	н.о.	0,58 (36)	н.о.	0,79 (22)	н.о.	0,69 (23)
Бензоилэкгонин	н.о.	48 (9,5)	н.о.	78 (3,3)	н.о.	68 (15)	н.о.	38 (10)	н.о.	58 (24)
Амитриптилин	н.о.	53 (14)	н.о.	71 (26)	н.о.	82 (6,6)	н.о.	69 (14)	н.о.	90 (5,8)
Кокаин	н.о.	79 (6,4)	н.о.	84 (5,6)	н.о.	85 (4,3)	н.о.	78 (15)	н.о.	102 (1,6)
Морфин	н.о.	24 (19)	н.о.	9,1 (55)	н.о.	10 (40)	н.о.	6,1 (33)	н.о.	8,0 (20)

н.о. – не обнаружено.

Как видно из полученных данных, салициловая кислота не обнаружена в процедуре ТФЭ при использовании патронов Chromabond Drug (Macherey-Nagel). Низкая ЭЭ кеторолака с высокими значениями девиации наблюдалась для патронов Bond Elut Certify (Varian), Verify-CX (Thermo) и Chromabond Drug (Macherey-Nagel). Для бензоилэкгонины и амитриптилина самая низкая ЭЭ отмечалась при использовании патронов EVIDEX SampliQ (Agilent) и Verify-CX (Thermo).

Патроны Verify-CX (Thermo) по геометрическим параметрам несколько отличались от прочих исследованных патронов (имели объем 6 мл, а не 3, как остальные), последнее, в некоторой степени, могло повлиять на полученные результаты.

Следует отметить также следующее: при проведении процедуры ТФЭ для ряда проб у некоторых патронов наблюдались проблемы с прохождением пробы через патрон, что, очевидно, связано с «блокированием» пор фритт. Такие проблемы имели место для патронов Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel) и Strata Screen-C (Phenomenex), и не наблюдались для патронов двух марок: EVIDEX SampliQ (Agilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo). Таким образом, при применении патронов Bond Elut Certify, Chromabond Drug и Strata Screen-C, следует обращать внимание на тщательность отбора центрифугата, избегая попадания взвеси и осадка при проведении процедуры ТФЭ.

Учитывая сложившуюся систему закупок, которая не позволяет гарантированно приобретать конкретный вид патронов для ТФЭ, необходимо обращать внимание на качество сорбентов, использованных в их производстве. В противном случае, «смыв» фазы может привести к химическому загрязнению элюатов, отсутствию воспроизводимости анализа и, как следствие, получению необъективных результатов исследования [387].

3.5 Результаты использования унифицированной методики скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови при экспертных исследованиях

Исходя из обобщенных результатов проведенных исследований, составлен алгоритм скрининга крови, включающий основные этапы исследования с использованием ТФЭ на патронах со смешанной фазой и ГХ-МС (рисунок 4.34):

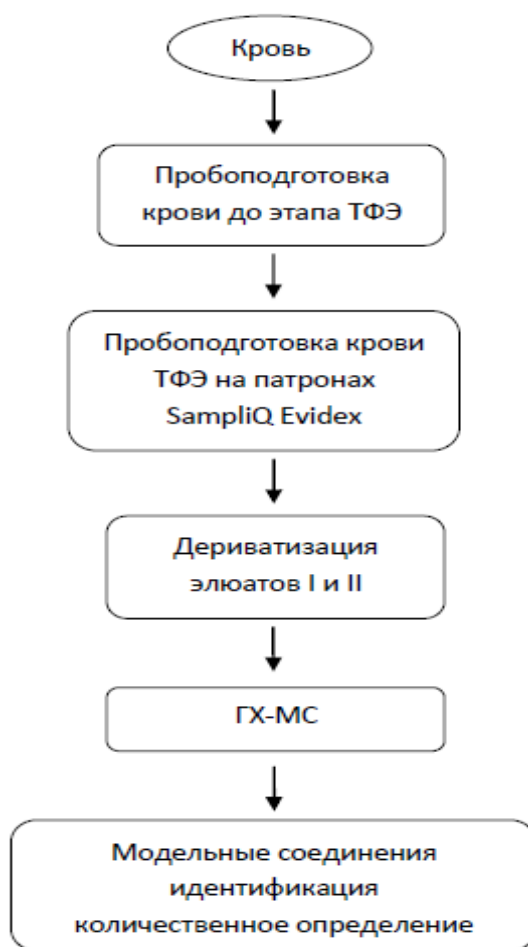


Рисунок 4.34 – Алгоритм скринингового анализа крови с применением патронов SampliQ Evidex

Одной из важных процедур пробоподготовки до этапа ТФЭ является разбавление образца крови буферным раствором, что приводит к снижению вязкости образца, корректирует величину рН среды, а также способствует смещению равновесия в системе связи аналита с белками крови.

Центрифугирование образца крови после разбавления позволяет удалить взвешенные частицы клеточных элементов крови и мембран эритроцитов, снижая возможность блокировки фильтрующих элементов патрона при пробоподготовке.

В качестве внутренних стандартов при скрининговых исследованиях крови были использованы гексенал, N-этилбензиламин, дионин, ДНФ, как оптимальные, отвечающие требованиям к внутренним стандартам для веществ кислого и основного характера.

Выбор вариантов дериватизации для элюатов I и II обусловлен прежде всего применяемым типом библиотеки масс-спектров по токсикологически значимым веществам и их метаболитам Pflieger-Mauer-Weber (MPW2011.L и более ранних версий), в которой основной упор сделан именно на ацетилированные и метилированные производные лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов.

Предложенный алгоритм исследования был опробован на реальных образцах посмертной крови и крови от живых лиц, а в последующем при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях.

При экспертных исследованиях 1034 образцов трупной крови, 8 – гнилостной жидкости и 43 образцов крови от живых лиц на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением скрининговой методики ТФЭ крови [391, 392] выявлены 111 токсикологически значимых веществ, а также их метаболитов. Они сгруппированы по кислотно-основным свойствам; рассчитанные для них физико-химические характеристики и распределение по фракциям приведены в таблицах 3.21 – 3.23.

Таблица 3.21 – Соединения кислотного характера

Соединение	pKa	LogP	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
парацетамол	9,89	0,34	+	+		28
фенобарбитал	7,63, 12,3	1,67	+		0,07 – 118,0	238

Продолжение таблицы 3.21

пентобарбитал	7,88, 12,6	2,05	+			6
кеторолак	4,47	2,08	+		0,3 – 3,2	60
маркер 5F-AB-PINACA ^a	3,41	2,40	+			2
маркер MDMB(N)-2201 ^б	3,42	2,75	+			7
кетопрофен	4,11	2,81	+		0,1 – 2,46	39
маркер AB- FUBINACA ^в	3,39	2,81	+			2
тиопентал	7,78, 10,3	2,99	+			15
фуросемид	3,05, 9,80	3,00	+			2
напроксен	4,4	3,0	+		< 4,0 – 53,6	33
маркер AB-PINACA ^г	3,40	3,17	+			1
варфарин	4,5	3,42	+			8
маркер AB-CHMINACA ^д	3,41	3,64	+			12
ибупрофен	4,41	3,72	+		0,3 – 8	138
диклофенак	4,18	4,06	+		0,04 – 11,2	40
флурбипрофен	4,14	4,12	+			1
пропофол	11,0	4,16	+			1
маркер 1 XLR-11 ^е	4,73	4,27	+			1
маркер 2 XLR-11 ^ж	4,74	4,39	+			3
эфавиренз	7,92	4,84	+			8
Δ^9 -ТГК к-та ^з	4,64, 9,87	6,17	+			25
Δ^9 -ТГК	9,81	7,64	+			3

^a – 3-метил-2-(1-[5-фторпентил]-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота

^б – 3,3-диметил-2-(1-[5-фторпентил]-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота

^в – 3-метил-2-[1-(4-фторбензил)-1Н-индазол-3-карбоксамидо]бутановая кислота

^г – 3-метил-2-(1-фторпентил-1Н-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота – маркер каннабимиметиков AB-PINACA и AMB.

^д – 3-метил-2-[1-циклогексилметил-1Н-индазол-3-карбоксамидо]бутановая кислота

^е – 5-[3-(3,3,4-триметилпент-4-еноил-1Н-индол-1-ил)]пентановая кислота

^ж – 5-[3-(4,4,5-триметил-4Н-пиран-2-ил)-1Н-индол-1-ил]пентановая кислота

^з – 9-карбокси-11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол

Таблица 3.22 – Соединения нейтрального характера

Соединение	pKa	LogP	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
леветирацетам	-	-0,67	+	+		1
пиразинамид	-	-0,37		+		1
спиронолактон (верошпирон)	-	2,17	+			1
PVP-M (оксо) ^a	-	2,49	+			5
карбамазепин	-	2,6	+	+	0,35 – 20,1	39
малатион (карбофос)	-	2,93	+			1
фентион	-	3,21	+			2
хлорпирифос	-	4,77	+			1
ДДЭ ^б	-	6,37	+		18 нг/л	1
перметрин	-	7,15	+			1

^a – метаболит α-пирролидиновалерофенона (1-фенил-2-(1-пирролидинил)пентан-1-он)

^б – ДДЭ - 1,1'-2,2-дихлор-1,1-диил)бис(4-хлорбензол)

Таблица 3.23 – Соединения основного характера

Соединение	pKa	LogP	Элюат		Интервал найденных концентраций в крови, мг/л	Число случаев
			I	II		
1	2	3	4	5	6	7
теобромин	0,49	-0,72		+		2
кофеин	0,63	-0,13	+	+		768
пентоксифиллин	0,66	0,32		+		3
теофиллин	1,70	-0,17		+		5
феназепам	1,74	3,30	+			12
хлозепид	2,49	2,33	+	+		1
метронидазол	2,58	-0,01		+		4
орнидазол	2,72	0,68		+		1
флуконазол	2,94	0,5	+	+		23
дiazepam	3,4	2,96	+			38
никотинамид	3,54	-0,11	+	+		153
изониазид	3,79	-0,89		+	19,3 – 291,3	12
никетамид (кордиамин)	4,01	0,33	+	+		4

Продолжение таблицы 3.23

невирапин	4,17	1,84	+	+		3
нифедипин	4,34	3,05	+		0,26	2
анальгин-М1 ^а	4,50	-0,40		+		99
клопидогрел	4,56	4,23	+	+		16
котинин	4,72	-0,23		+		619
тропикамид	5,32	1,15		+		9
кветиапин	5,65; 3,45	1,57		+	28,5	2
анальгин-М2 ^б	5,74	0,02		+		131
клозапин	6,19	3,48		+	0,5 – 13,2	4
папаверин	6,32	3,74		+		8
дротаверин (но-шпа)	6,54	6,15		+	0,1 – 23,4	33
циннаризин	6,79, 2,35	4,63		+	0,5	9
триметоприм	7,20	0,79		+		1
никотин	8,00, 3,21	0,72		+		317
карфентанил	8,05	3,73		+		3
промедол (тримеперидин)	8,06	3,17		+		5
амброксол	8,07	3,38		+		4
бупивакаин	8,17	3,64		+		2
кодеин	8,25	1,20		+	0,02 – 0,59	42
морфин	8,26	0,43		+	0,006 – 4,06	66
бромгексин	8,34	5,08		+		1
MDPV ^в	8,41	3,06		+		1
PVP ^г	8,49	3,65		+		129
лидокаин	8,53	2,36		+	0,72 – 45,7	51
донормил (доксиламин)	8,68, 4,32	2,52		+	0,07 – 4,7	16
амлодипин	8,75, 3,56	4,16		+		3
димедрол (дифенгидрамин)	8,76	3,66		+	0.46 – 6,7	57
дезоморфин	8,82	2,24		+	0,09	2
дилтиазем	8,94	3,63		+	0,36 – 13,8	4
толперизон	8,95	3,81		+	2,76	1
витамин В ₆	8,97, 2,45	-1,84		+		23
прометазин	8,98	4,78		+		2
хлоропирамин (супрастин)	9,0, 3,24	3,43		+		7

Продолжение таблицы 3.23

хинин	9,05, 5,05	3,60		+		5
метадон	9,05	4,20		+		6
меторфинан	9,06	3,46		+		7
фентанил	9,07	3,89		+		2
хлорпротиксен	9,11	6,05		+	0,06 – 2,0	4
меторфан	9,13	4,11		+		29
пропранолол	9,15	3,1		+	1,0 – 54,9	5
метопролол	9,18	1,79		+	2,26 – 36,1	14
кетамин	9,21	1,82		+	6,22	55
верапамил	9,23	5,06		+	0,09 – 8,9	5
сальбутамол	9,23	0,01		+		1
новокаин	9,24, 2,12	2,36		+		6
амитриптилин	9,24	4,92		+	0,02 – 193,07	27
дицикловерин	9,24	6,05		+		2
хлорфенамин	9,33	3,39		+		4
фенирамин	9,36	2,79		+		46
хлорпромазин (аминазин)	9,41	5,2		+	< 0,1 – 0,1	7
фенспирид	9,45	2,57		+		4
кломипрамин	9,46	5,53		+	0,19	1
сертралин	9,47	4,81		+		1
трамадол	9,61	2,51		+	0,32 – 49	50
метоклопрамид	9,62	2,22		+		10
левомепромазин	9,67	5,03		+		1
тригексифенидил (циклодол)	9,83	4,49		+		1
амфетамин	9,94	1,81		+	0,01 – 0,92	14
атропин	9,98	1,53		+		80
флуоксетин	10,06	4,09		+	2,6	7
МДМА	10,32	1,81		+	0,16	1
метамфетамин	10,38	1,94		+	0,06	4
прегабалин	10,43 3,87	0,37		+		1
мемантин	10,79	3,18		+		2
римантадин	11,17	3,10		+		6

^а – 4-аминоантипирин ^б – 4-(N-метиламино)антипирин

^в – метилендиоксипировалерон (1-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-(1- пирролидинил)-1-пентанон)

^г – α- пирролидиновалерофенон (1-фенил-2-(1-пирролидинил)пентан-1-он).

Для ряда веществ наблюдается распределение между элюатами I и II, обусловленное спецификой механизма удерживания на сорбенте и растворимостью в применяемых системах растворителей. Например, кофеин обнаруживается в обеих фракциях. Карбамазепин, являясь нейтральным веществом средней липофильности, идентифицируется в обоих элюатах, что связано с низкой растворимостью в системе растворителей гексан – этилацетат (3:1). Пиразинамид, являясь нейтральным гидрофильным веществом, идентифицируется в элюате II. Аналогично в элюате II определяются гидрофильные и низколипфильные вещества слабоосновного характера, такие как теofilлин, теобромин, изониазид, метронидазол, никотинамид, котинин, метаболиты анальгина. Последнее обусловлено их недостаточной растворимостью в системе растворителей гексан – этилацетат.

Диазепам, феназепам, хлозепид, нифедипин представляют собой слабые основания с высокой липофильностью и определяются в элюате I, что обусловлено механизмом удерживания за счет гидрофобных сил и хорошей растворимостью в использованной системе для элюирования - гексан-этилацетат.

Практика применения методов ТФЭ и ГХ-МС для скрининга крови показывает, что данная схема исследования позволяет надежно идентифицировать широкий круг наркотических и лекарственных веществ, имеющих судебно-химическое значение. Использование сочетания данных методов дает возможность также определять «дизайнерские наркотики» и их метаболиты (например, стимуляторы: метилendiоксипировалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты [390]; метаболиты каннабимиметиков: 3-метил-2-(1-[5-фторпентил]-1H-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (маркер AB-PINACA и AMB), 3,3-диметил-2-(1-[5-фторпентил]-1H-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (маркер MDMB(N)-2201), 3-метил-2-[1-(4-фторбензил)-1H-индазол-3-карбоксамидо] бутановая кислота (маркер AB-FUBINACA), 3-метил-2-(1-фторпентил-1H-индазол-3-карбоксамидо)бутановая кислота (5-F-AB-PINACA), 3-метил-2-[1-циклогексилметил-1H-индазол-3-карбоксамидо]бутановая кислота (AB-CHMINACA), 5-[3-(3,3,4-триметилпент-4-

еноил-1Н-индол-1-ил]пентановая кислота (маркер 1 XLR-11) 5-[3-(4,4,5-триметил-4Н-пиран-2-ил)-1Н-индол-1-ил]пентановая кислота (маркер 2 XLR-11) [388, 389].

Отмечая несомненные достоинства методики скринингового исследования ТФЭ, при применении метода ГХ-МС следует отметить некоторые сложности. Так, более чем в половине исследований морфин не был обнаружен, либо был найден в следовых количествах, что обусловлено его конъюгацией с глюкуроновой кислотой. Также данная схема исследования ограничена чувствительностью к ряду соединений, например, клофелину, моксонидину, тизанидину, карфентанилу. Повысить чувствительность ГХ-МС к клофелину, моксонидину и тизанидину позволяет применение специфичных методов дериватизации, например, с пентафторбензилбромидом. Для выявления карфентанила требуется увеличение объема исследуемой пробы или применение более чувствительных методов исследования, например ЖХ-МС/МС.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. С целью подбора условий проведения ТФЭ для скрининга крови и прогнозирования поведения широкого круга веществ с различными кислотно-основными и гидрофильно-липофильными свойствами для модельных соединений рассчитаны их основные физико-химические показатели (pK_a , $\log P$, $\log D$). Установлено, что оптимальным в скрининге крови на лекарственные и наркотические вещества на патронах со смешанной фазой является использование фосфатного буфера с $pH = 4,8$, при котором наблюдается максимальный выход веществ основного характера с низкой, средней и высокой липофильностью, а также веществ кислотного характера (со значением pK_a более 4) разной степени липофильности.

2. При использовании математического моделирования Бокса-Бенкена показано влияние факторов ТФЭ на эффективность экстракции модельных соединений, имеющих различные физико-химические свойства, разработаны и

приведены оптимальные условия для проведения ТФЭ при скрининге крови на широкий круг лекарственных и наркотических веществ с использованием методов ТФЭ и ГХ-МС.

3. Дополнительное экспериментальное исследование влияния уксусной кислоты (на этапе промывки в процедуре ТФЭ) на эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ с использованием унифицированной методики скрининга крови подтвердило данные оптимизации условий проведения ТФЭ, полученные с использованием математического планирования эксперимента, об исключении из стадии пробоподготовки промывку 0,1 М раствором уксусной кислоты.

4. Разработана методика идентификации и количественного определения некоторых НПВС в процедуре скрининга крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением ТФЭ и ГХ-МС. На основе процедуры валидации показана пригодность методики для количественной оценки содержания индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака в крови. Разработанная методика не пригодна для количественной оценки кеторолака в крови, так как установлено ее несоответствие по характеристикам линейность и прецизионность (повторяемость).

5. Оценена эффективность экстракции патронов для ТФЭ со смешанной фазой разных производителей для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ из крови. Показана возможность использования патронов марок Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex), EVIDEX SampliQ (Agilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo) при скрининге крови. Исходя из показателей максимальных выходов анализируемых веществ и экономичности, к применению в экспертной практике рекомендованы патроны двух марок: Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent).

6. При апробации разработанной методики скрининга крови на реальных образцах цельной и посмертной крови выявлено 111 токсикологически значимых соединений, которые сгруппированы по кислотно-основным и гидрофильно-липофильным свойствам на основании рассчитанных значений pK_a и $LogP$. Среди

выявленных соединений обнаружены нативные метилендиоксипировалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты; метаболиты каннабимиметиков АВ-PINACA и AMB, MDMB(N)-2201, АВ-FUBINACA, 5-F-AB-PINACA, АВ-CHMINACA, XLR-11.

Список работ автора к главе 3:

1. Дворская, О. Н. Сравнение эффективности жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции лекарственных веществ на дисках серии SPEC MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев // Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств : материалы Рос. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию ПГФА. – Пермь, 2007. – С. 172–177.
2. Дворская, О. Н. Эффективность экстракции лекарственных веществ на дисках для ТФЭ серии SPEC C18 и MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, Р. Р. Сунгатуллина // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2007. – № 2. – С. 133–136.
3. Горохова, Ю.В. Использование патронов «AccuBond EVIDEX» при исследовании крови на наличие токсикологически значимых веществ/ Ю.В. Горохова, О.Н. Дворская // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2010. – №6. – С.161–163.
4. Дворская, О.Н. Сравнение эффективности жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции с использованием патронов «AccuBond II EVIDEX» при исследовании крови на наличие токсикологически значимых веществ/ О.Н. Дворская // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2010. – №4. – С.264–268.
5. Катаев, С. С. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. – Т. 55, № 4. – Р. 38–43.
6. Дворская, О. Н. Определение ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови в скрининге методами твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин // Бутлеровские сообщения. – 2015. – Т. 43, № 7. – Р. 149–153.
7. Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови

с использованием твердофазной экстракции : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 16 с.

8. Катаев, С.С. Влияние уксусной кислоты на эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ при скрининге крови / Катаев С.С., Дворская О.Н., Крохин И.П. // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами : материалы II Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – Пермь, 2016. – С.71–75.

9. Оценка концентрации некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови / О. Н. Дворская и [др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – Т.59, №3. – С.24–30.

10. Катаев, С. С. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 1. – Р. 29–35.

11. Дворская, О. Н. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, И. П. Крохин, С. С. Катаев // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51, № 3. – С. 36–40.

12. Катаев, С. С. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых брендов / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5, № 6. – С. 543–555.

ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМИМЕТИКОВ ГРУППЫ ЭФИРОВ АЛКИЛИНДОЛ-3-КАРБОКСИЛАТОВ И ГРУППЫ АЛКИЛИНДАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ, ПРОИЗВОДНЫХ АМИДА ВАЛИНА В МОЧЕ

Почти все синтетические каннабимиметики (СК), распространяемые до настоящего времени, характеризуются высокой липофильностью, что приводит к интенсивному метаболизму исходных соединений. Это свойство справедливо также и для рассмотренных нами групп СК. Незначительная концентрация исходных синтетических каннабимиметиков, обусловленная малой дозировкой при приеме, а также их быстрое выведение ограничивает возможности диагностики отравления СК только на основе анализа крови. Поскольку метаболиты синтетических каннабимиметиков являются новыми, неописанными ранее соединениями, то для последующего практического обнаружения в моче требуется их структурная идентификация и определение хроматомасс-спектрометрических характеристик. Эти данные необходимы для последующего вынесения диагностических заключений об отравлении СК и для ограничения злоупотребления наркотическими средствами данной группы.

Для решения задачи идентификации метаболитов синтетических каннабимиметиков, экскретируемых с мочой, нами была использована разработанная методика скрининга крови (Глава 3), модифицированная с учетом существования метаболитов фазы II (конъюгатов). Гидролитическое отщепление остатков кислот для последующего определения метаболитов фазы I может быть выполнено минеральным или ферментативным способом. Второй способ деконъюгации предпочтителен ввиду мягкости условий проведения, снижения возможности протекания нежелательных побочных реакций и образования артефактов.

Использованные при исследовании оборудование, материалы, реактивы приведены в главе 2.

Подготовка проб мочи с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ приведена в п.2.3.

Получение метильных, ацетильных, триметилсилильных производных (дериватов) метаболитов синтетических каннабимиметиков приведено в п. 2.5.

Режим работы газового хроматографа Agilent 7820 с моноквадрупольным детектором Agilent 5975 приведен в п. 2.6. Регистрация масс-спектров для ацетильных и метильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42-450 а.е. Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42-700 а.е.

Режим работы газового хроматографа 7890А с трехквадрупольным детектором Agilent 7000В (Agilent, США) (для исследований метаболизма СК АВ-FUBINACA) приведен в п. 2.6. Степень конъюгирования основных метаболитов СК определяли для их метиловых эфиров по отношению площади пиков иона с соответствующей величиной m/z и площади пика иона с m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате I мочи без гидролиза и с гидролизом.

Структуры метаболитов определяли на основании интерпретации масс-спектров выявленных пиков на хроматограммах, полученных при исследовании проб мочи. Для этого учитывали известные сведения по масс-фрагментации отдельных классов органических соединений и синтетических каннабимиметиков алкилиндольного/индазольного ряда и о путях их метаболизма [227-229, 235, 238, 332, 391, 392-395].

Для установления свойств функциональных групп применяли различные виды дериватизации, а также последовательное их сочетание.

Отметим, что авторы в последующих после 2013 года публикациях обнаружили и подтвердили структуру метаболитов рассматриваемых синтетических каннабимиметиков, описанных нами в 2013-2014 гг. (Глава 1).

Использование при пробоподготовке ТФЭ позволило провести фракционирование веществ на вещества кислотного и основного характера с получением 2 элюатов.

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{OC}) для неизмененных СК и их основных метаболитов приведены для оценки их поведения с точки зрения липофильности для целей экстракции.

4.1 Идентификация и аналитические характеристики основных метаболитов каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов в моче с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

4.1.1 Основные метаболиты и маркеры РВ-22

Структурные формулы метаболитов каннабимиметика РВ-22, предположительно идентифицированных в реальных образцах мочи, приведены на рисунке 4.1.

На рисунках 4.2 – 4.11 приведены масс-спектры, предложенные нами структуры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы и молекулярные массы некоторых производных метаболитов РВ-22, полученных при изучении образцов мочи.

Для всех обнаруженных соединений в масс-спектрах наблюдается молекулярный ион.

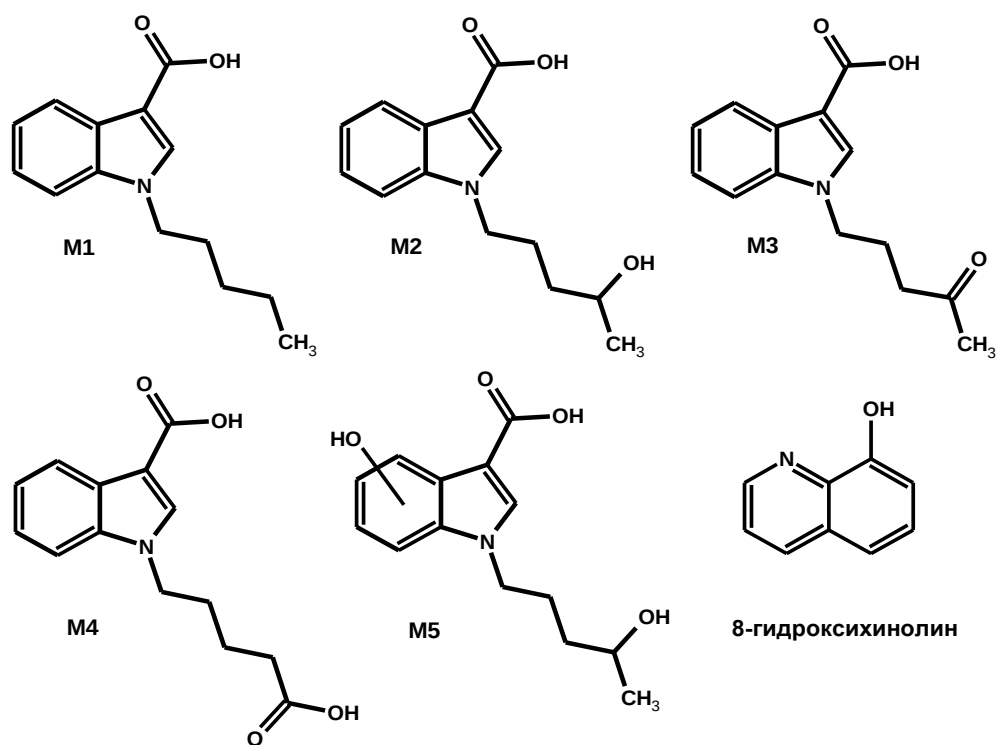


Рисунок 4.1 – Предполагаемые структуры обнаруженных метаболитов каннабимиметика РВ-22

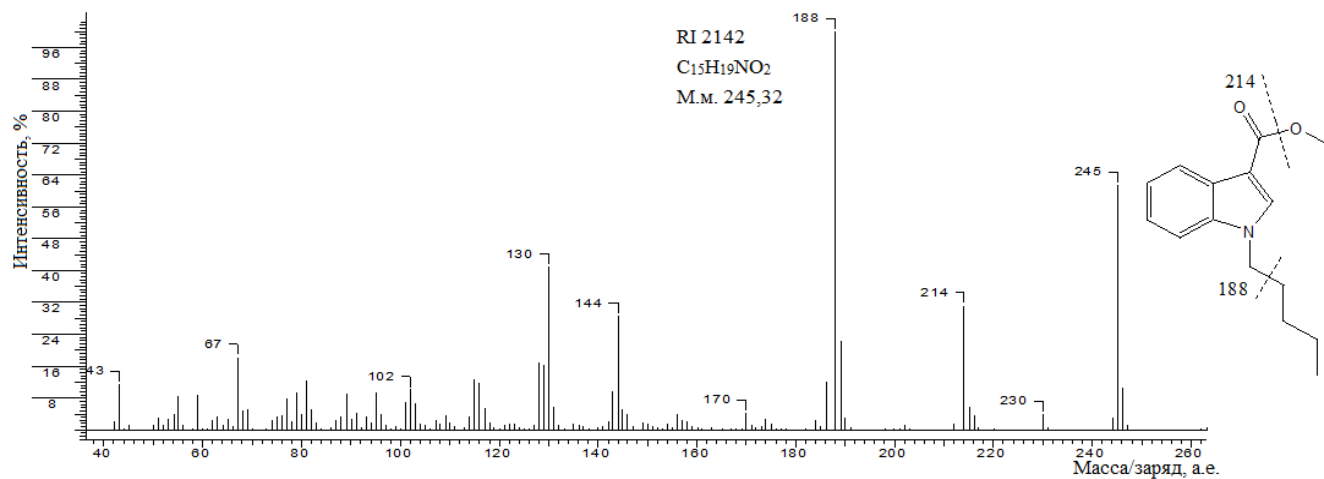


Рисунок 4.2 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М1

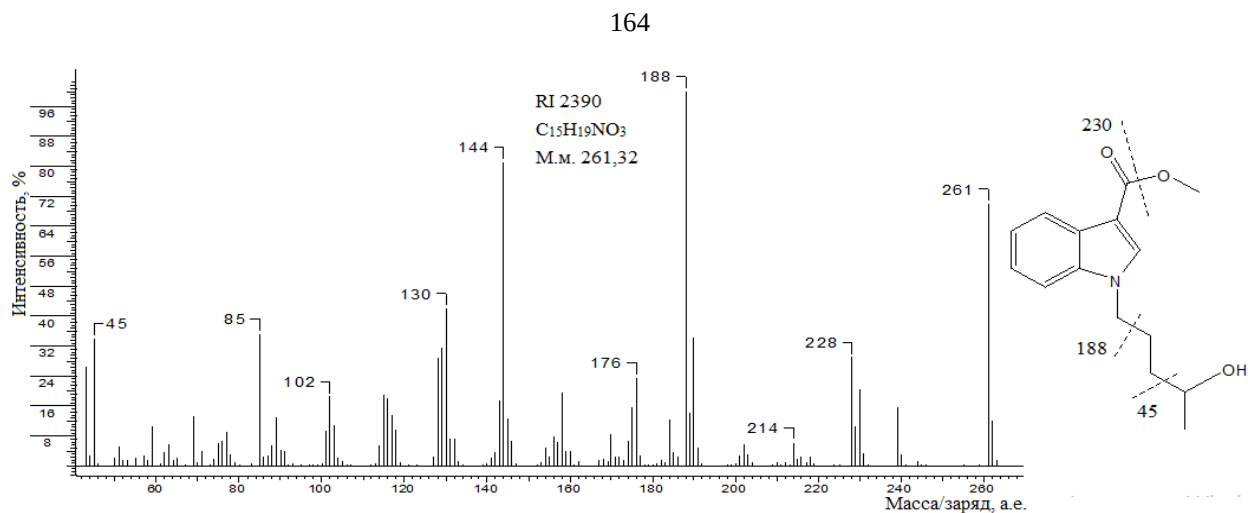


Рисунок 4.3 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2

Предполагаемые структуры фрагментных ионов для метаболитов РВ-22 представлены на рисунке 4.12. В спектрах метаболитов M1 – M4, как правило, имеются ионы с величинами m/z 144, 130 и 116. Для метилированного производного метаболита M5 наблюдаются ионы с величиной m/z 174 и 160. Имеются общие направления фрагментации, характерные для сложных эфиров, образованных карбоксильной группой метаболитов. В случае метиловых эфиров характерно образование ионов $[M-31]^+$, для триметилсилильных дериватов – $[M-89]^+$. Это же относится к ионам, образованным разрушением N-пентильной цепи: m/z 188 и 218 для метаболитов M1 – M4 и M5, соответственно.

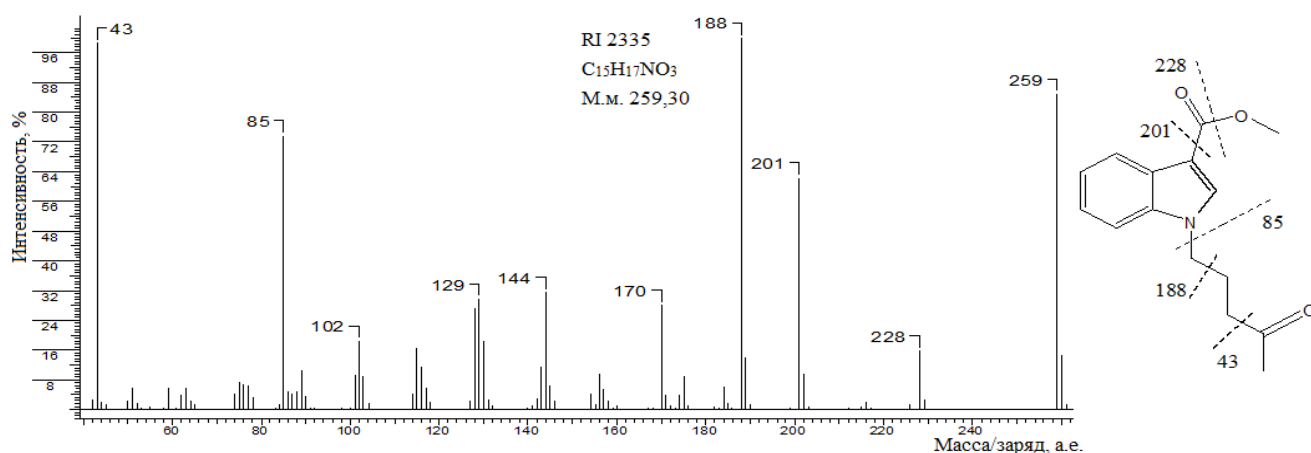


Рисунок 4.3 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M3

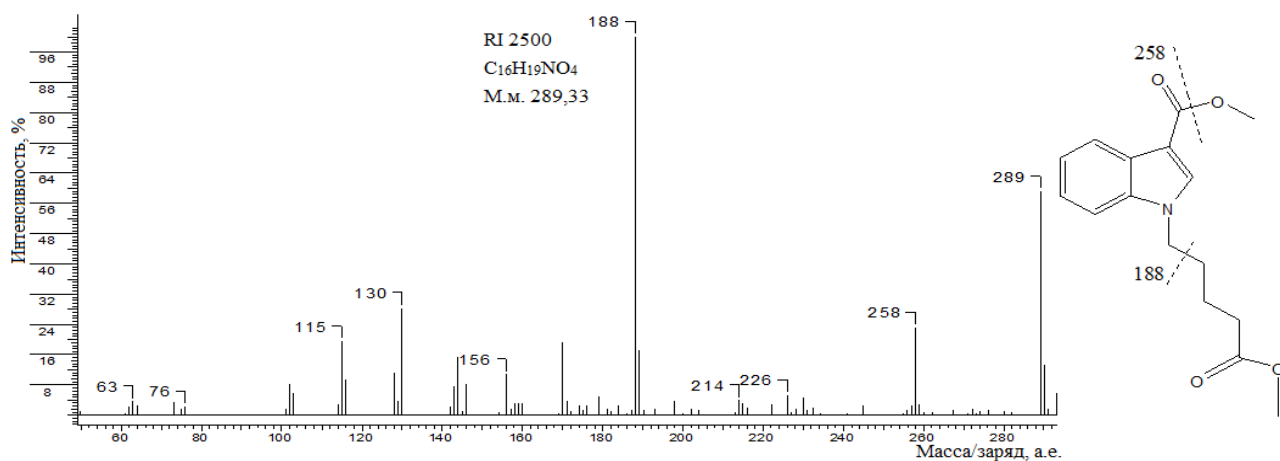


Рисунок 4.4 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита М4

Положение гидроксильной группы в алкильной цепи метаболитов М2 и М5 определяется наличием в масс-спектрах соединений пика иона $[\text{CH}_3\text{CH}=\text{OH}]^+$ спиртовой группы с величиной m/z 45 [391].

В масс-спектре метаболита М3 наблюдается пик иона $[\text{CH}_3\text{C}=\text{O}]^+$ с величиной m/z 43. Таким образом, метаболит М2 образуется путем гидроксирования алкильной цепи в положении 4, а М3 является продуктом дальнейшего окисления гидроксильной группы [229].

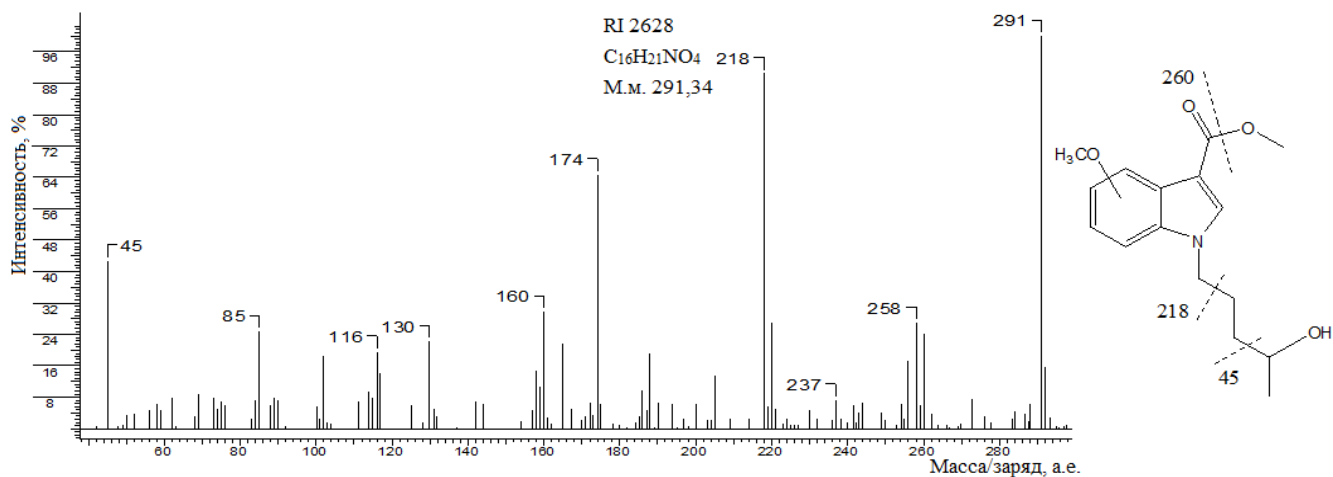


Рисунок 4.5 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита М5

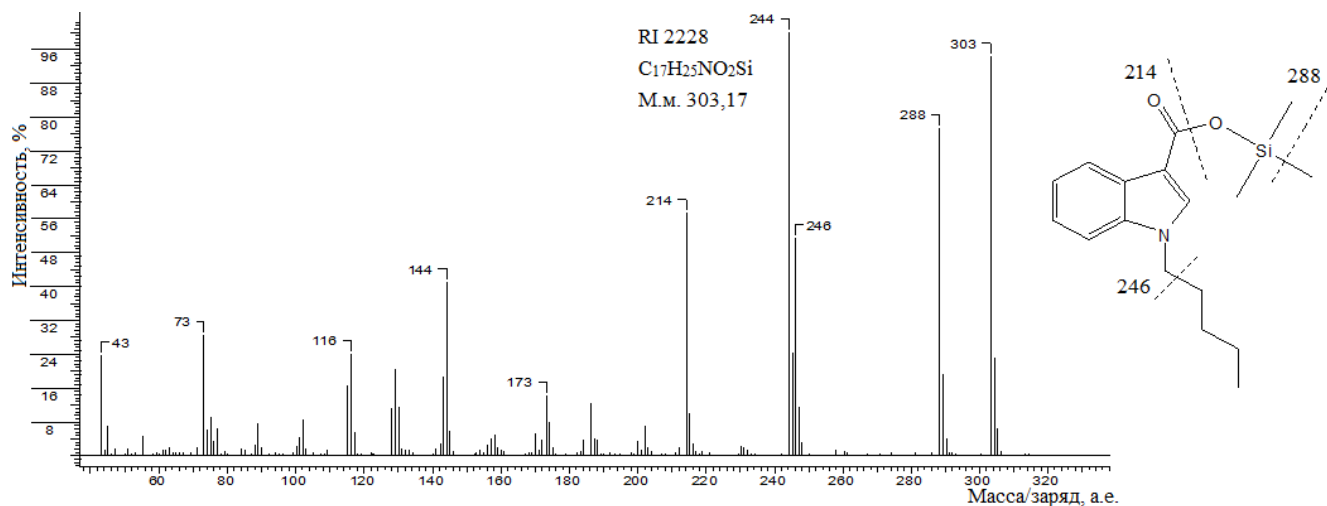


Рисунок 4.6 – Масс-спектр, структура и характеристики
 триметилсилилового эфира метаболита M1

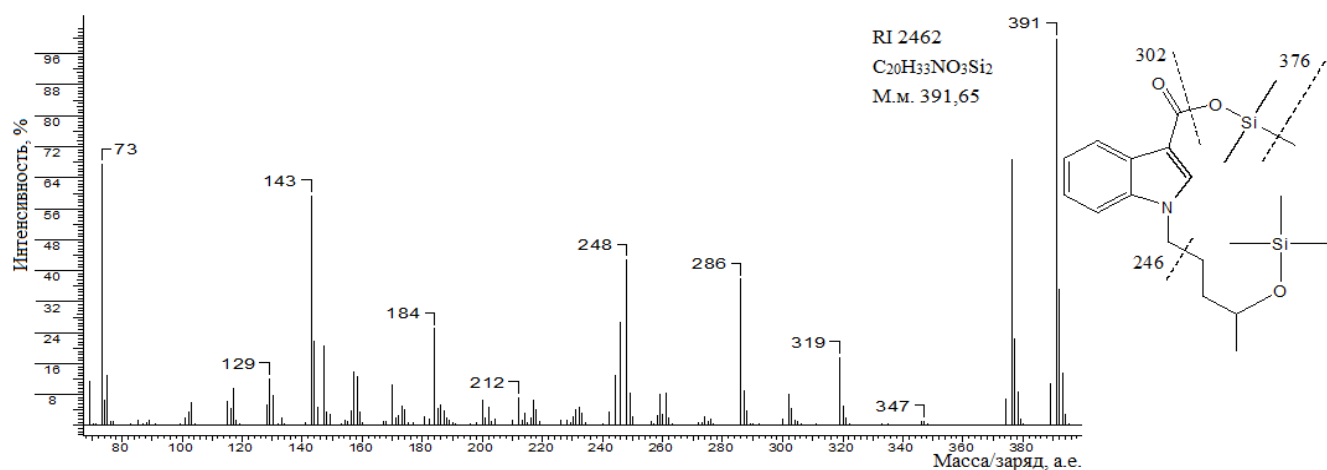


Рисунок 4.7 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-
 триметилсилилового эфира метаболита M2

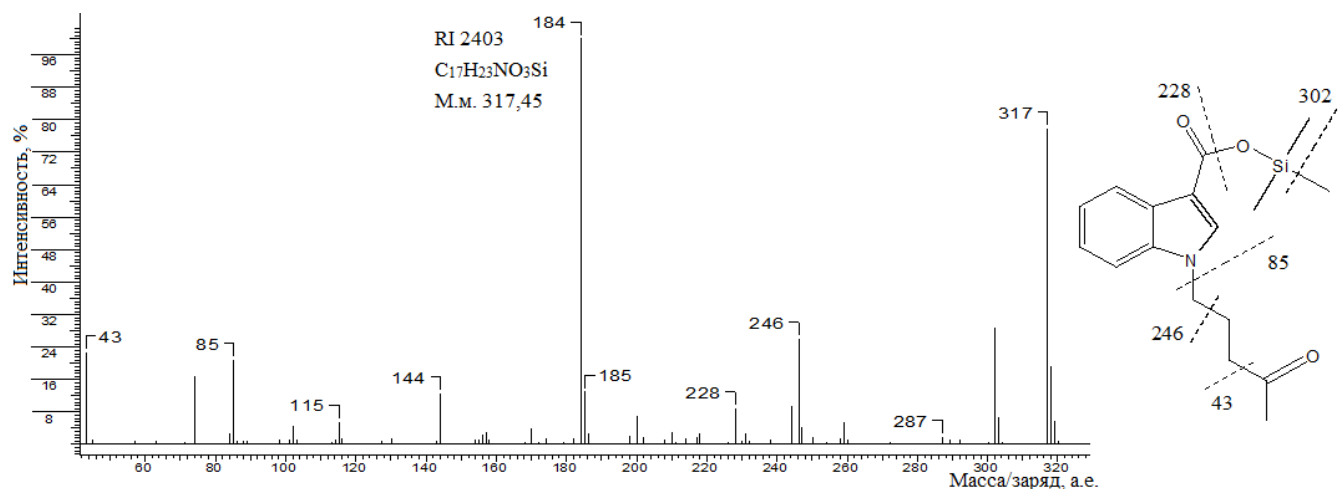


Рисунок 4.8 – Масс-спектр, структура и характеристики
 триметилсилилового эфира метаболита M3

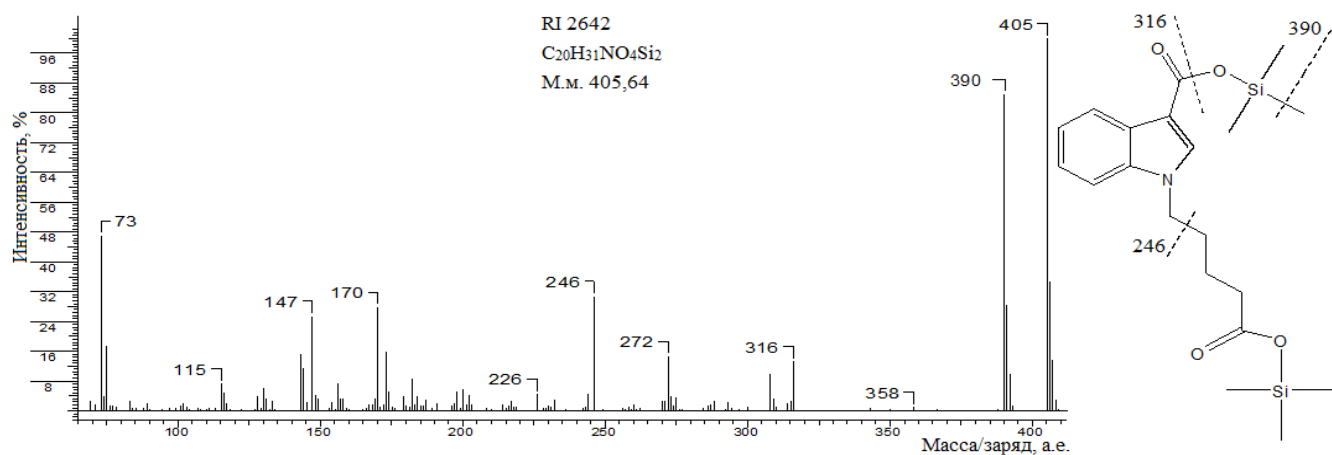


Рисунок 4.9 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита М4

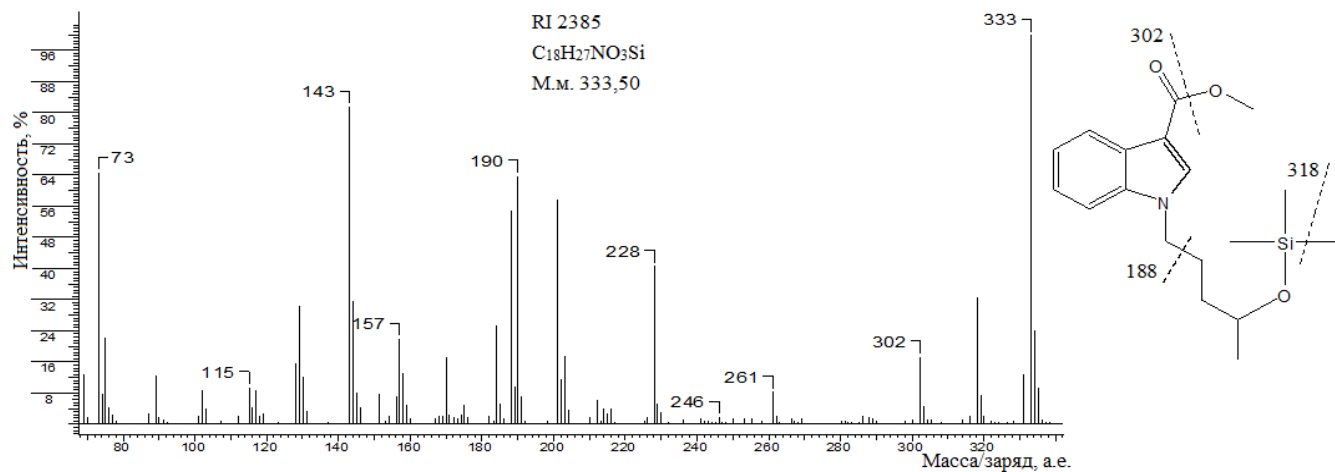


Рисунок 4.10 – Масс-спектр, структура и характеристики смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М2

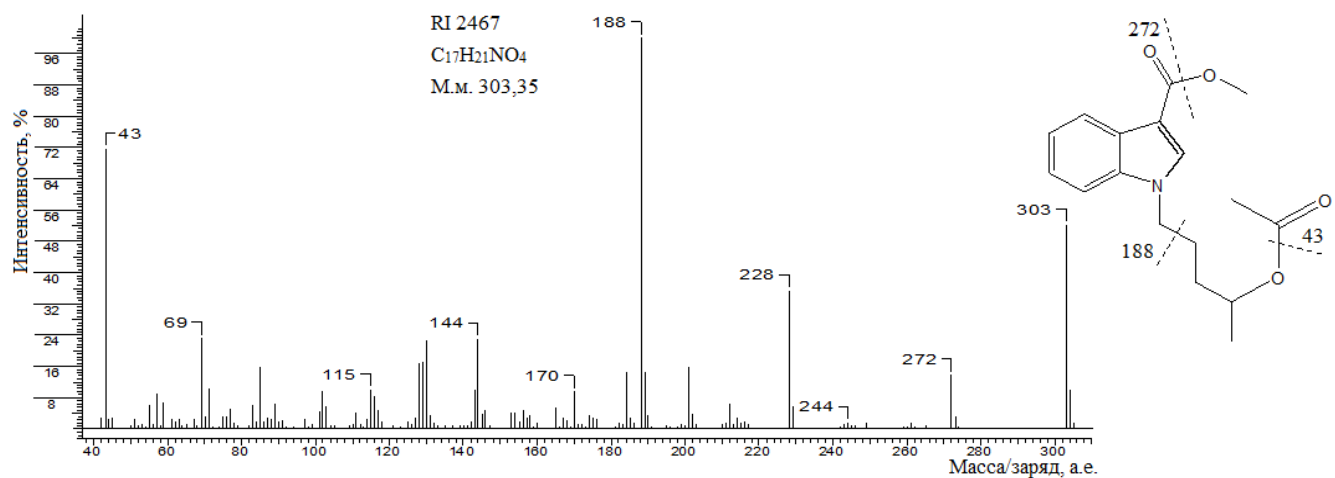


Рисунок 4.11 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М2 после ацетилирования

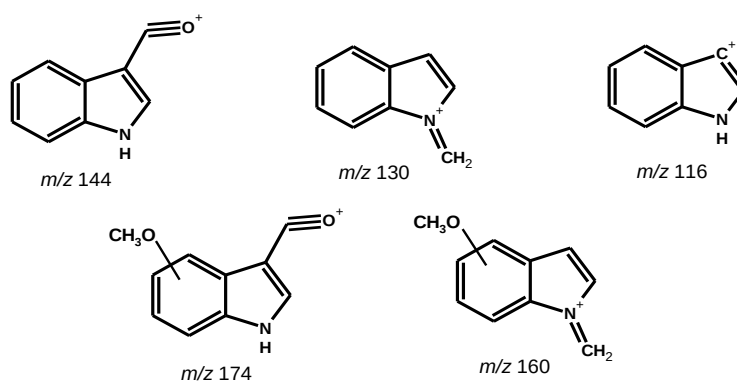


Рисунок 4.12 – Предполагаемые структуры ионов, образующихся при фрагментации метаболитов РВ-22

Идентифицированные метаболиты М1 – М5 каннабимиметика РВ-22 были обнаружены в элюате I. В элюате II обнаруживали 8-гидроксихинолин.

Расчеты LogP и K_{OC} показывают, что каннабимиметик РВ-22 и его основные метаболиты М1–М5 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности. Неизмененный РВ-22 и метаболит М1 являются высоколипофильными, метаболиты М2, М3, М5 и 8-гидроксихинолин (8-OX) – низколипофильными веществами. Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице 4.1.

Из полученных результатов следует, что относительная площадь пиков основных метаболитов уменьшается в ряду $M1 > M3 > M2$. Метаболиты М4 и М5 в описанных условиях исследования были обнаружены лишь в одном образце и их относительное содержание по-видимому, невелико. Неизмененный РВ-22 в исследованных образцах мочи обнаружен не был.

Исследование четырех образцов мочи потребителей каннабимиметика РВ-22 показало, что метаболиты РВ-22 присутствуют в моче человека преимущественно в конъюгированных формах, причем это относится как к весьма липофильным метаболитам пентилиндольной структуры, так и к гидрофильному 8-гидроксихинолину.

Таблица 4.1 – Характеристика каннабимиметика РВ-22 и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение; Md – медиана)

Соединение	Log P	K _{oc} (pH=4,8)	n	Конъюгирование, % (Md, %)	Относительное содержание *, % (Md, %)
РВ-22	5,74	31586,6	4	н.д.	н.д.
М1	4,34	1030,5	4	81-100 (98)	100
М2	2,40	86,3	4	99,8-100 (100)	17-84 (58)
М3	2,27	71,1	4	90-100 (98)	34-84 (68)
М4	2,49	49,3	1	100	4,44
М5	1,66	40,6	1	100	2,16
8-ОХ	1,87	1,83	4	50,8-100 (97)	н.о.

*Содержание М1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков характеристических ионов, имеющих интенсивность 100% в масс-спектре метаболитов

н.д. – не детектируется, н.о. – не определяли.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика РВ-22, определяющимися в моче, являются 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновая кислота (М1) и ее гидрокси- (М2) и кето-производные (М3) и 8-гидроксихинолин. Хроматографический пик метаболита М1 характеризуется наибольшей интенсивностью по сравнению с пиками остальных метаболитов, поэтому в сочетании с 8-гидроксихинолином в исследованных объектах, они могут использоваться в качестве маркеров употребления каннабимиметика РВ-22 у потребителей курительных смесей [396-399].

Важно отметить, что все метаболиты, обнаруженные методом ГХ-МС, являются продуктами гидролиза сложного эфира. В случае РВ-22, это метаболиты, содержащие пентилиндольные остатки (М1-М5) и остаток 8-гидроксихинолина (8-ОХ). Нами не обнаружены метаболиты, структура которых содержала бы оба

остатка при наличии сложноэфирной связи. Это может быть обусловлено как особенностями метаболизма РВ-22, так и ограничениями применяемого метода.

4.1.2 Основные метаболиты и маркеры РВ-22F

Структурные формулы каннабимиметика РВ-22F и его метаболитов, идентифицированных нами при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлены на рисунке 4.13.

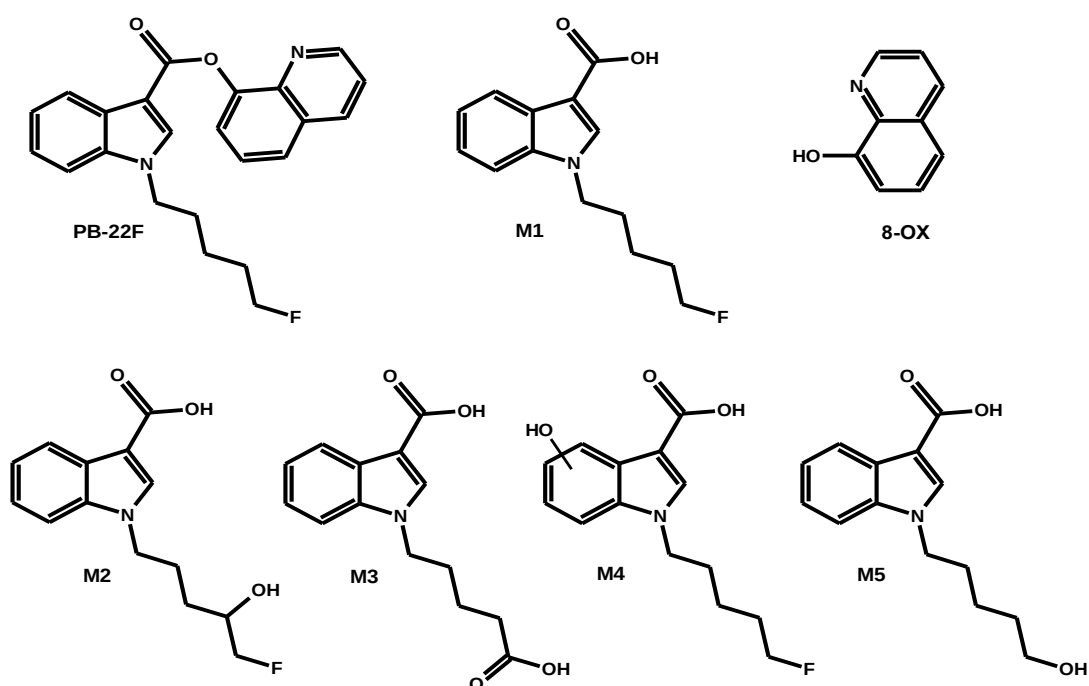


Рисунок 4.13 – Структурные формулы каннабимиметика РВ-22F и его предполагаемых метаболитов

На рисунках 4.14 – 4.24 приведены масс-спектры, предложенные нами структуры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и предполагаемые пути фрагментации некоторых дериватов метаболитов РВ-22F.

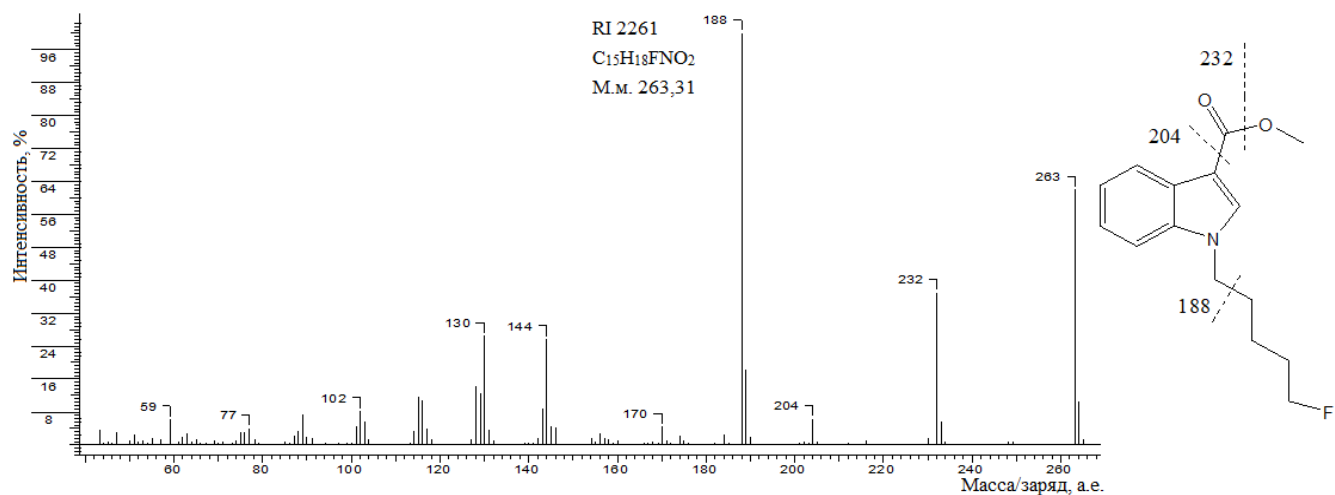


Рисунок 4.14 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M1

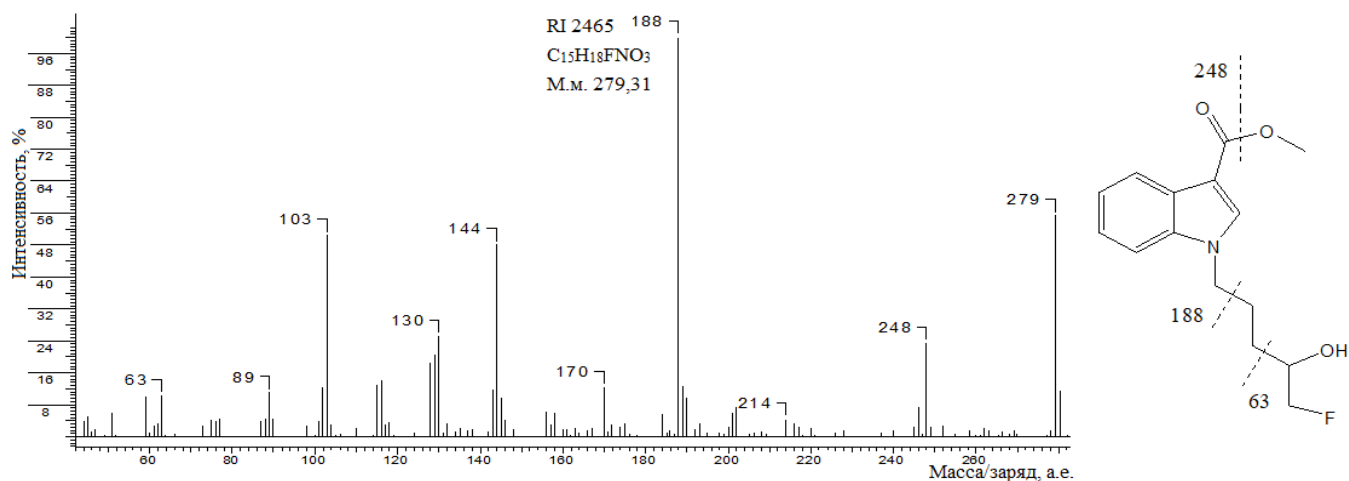


Рисунок 4.15 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2

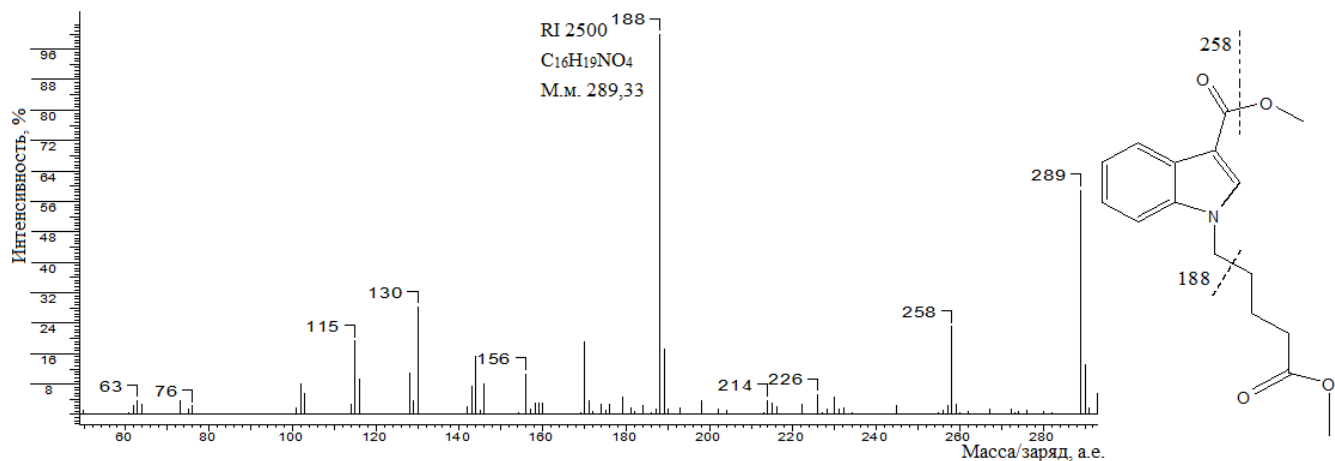


Рисунок 4.16 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита M3

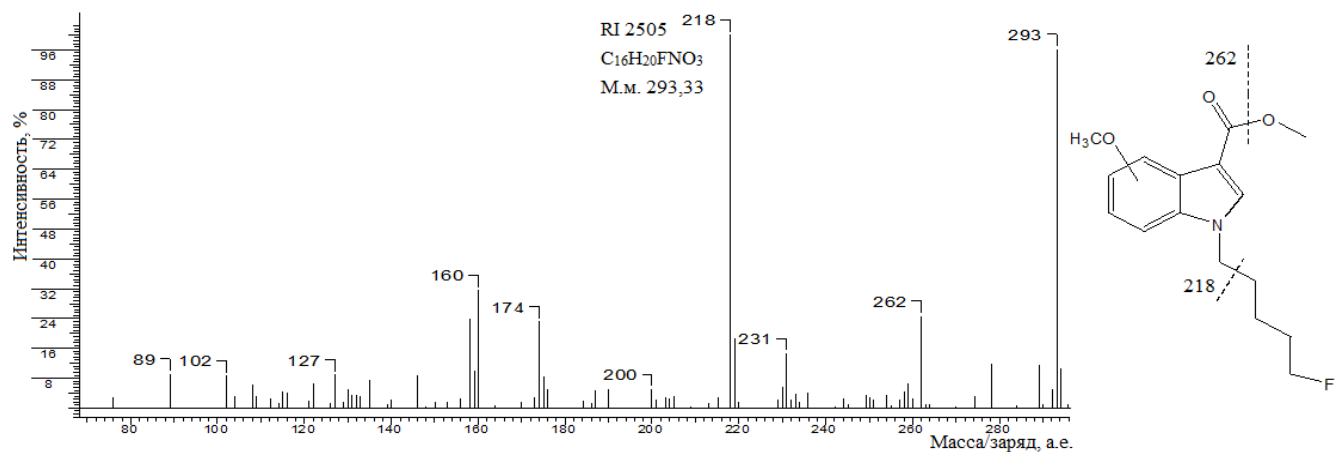


Рисунок 4.17 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита М4

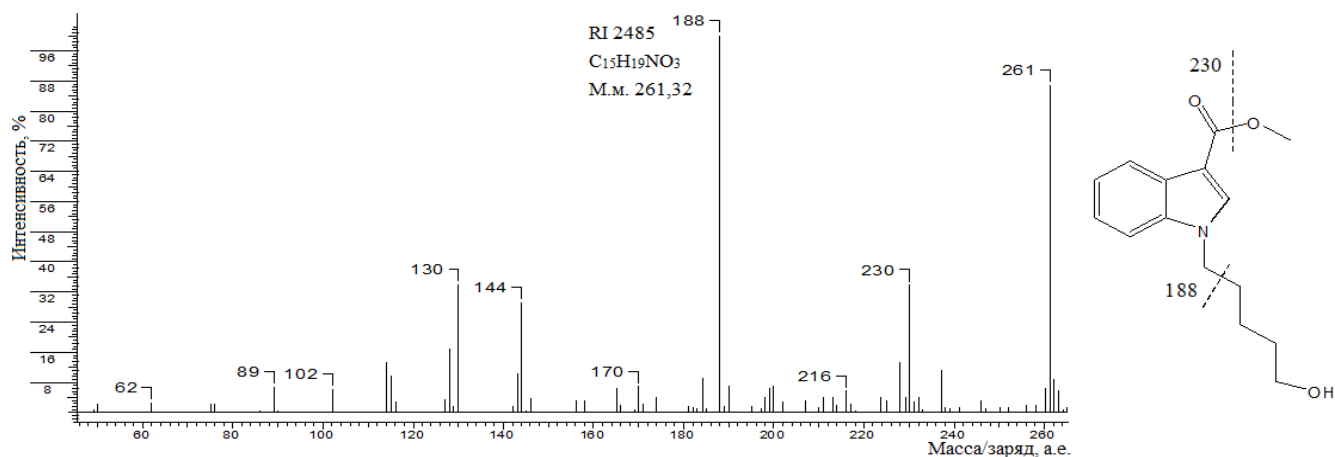


Рисунок 4.18 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М5

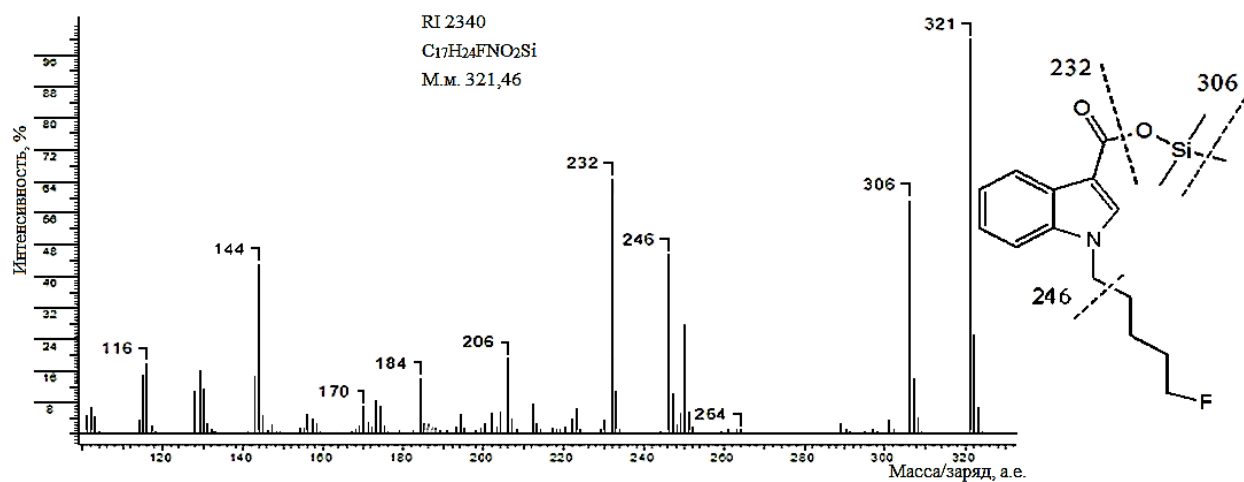


Рисунок 4.19 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита М1

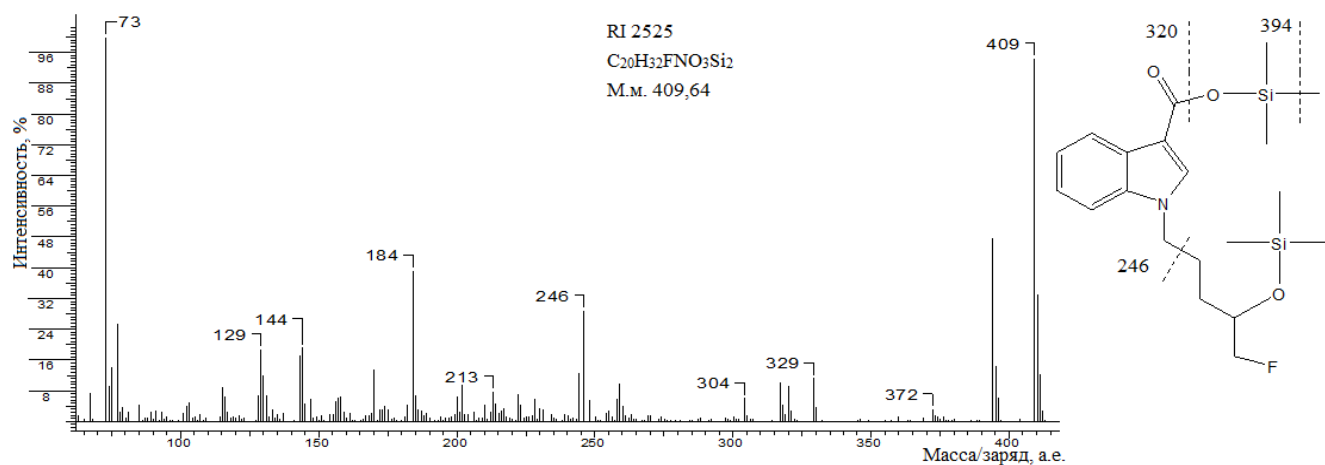


Рисунок 4.20 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M2

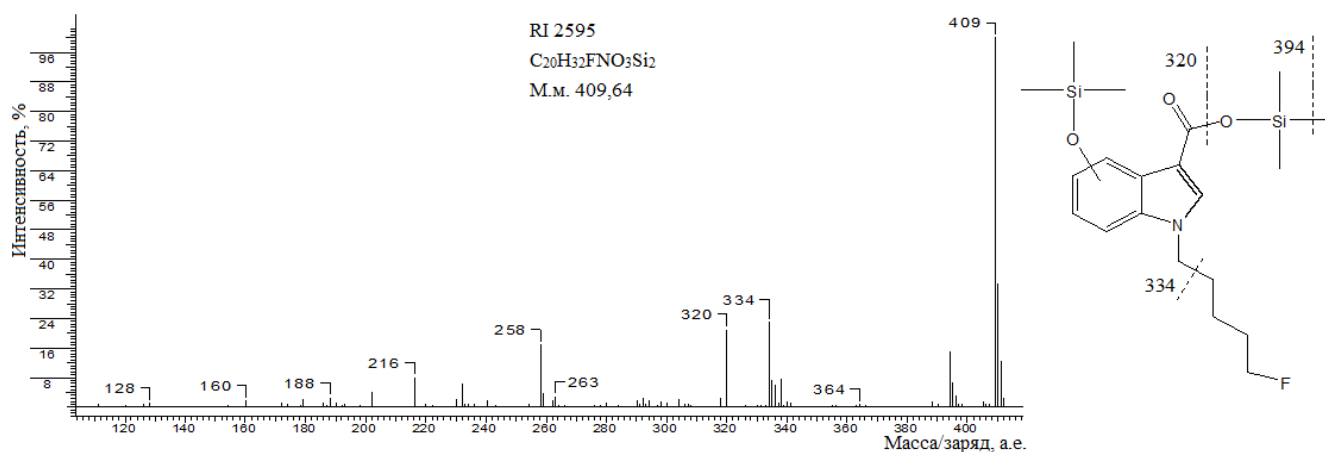


Рисунок 4.21 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M4

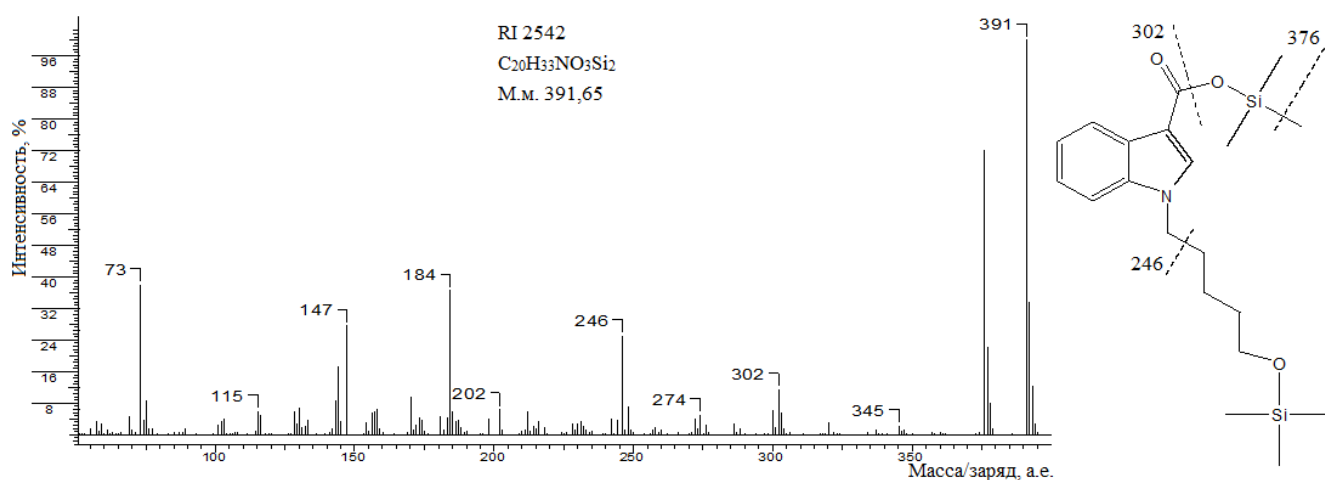


Рисунок 4.22 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M5

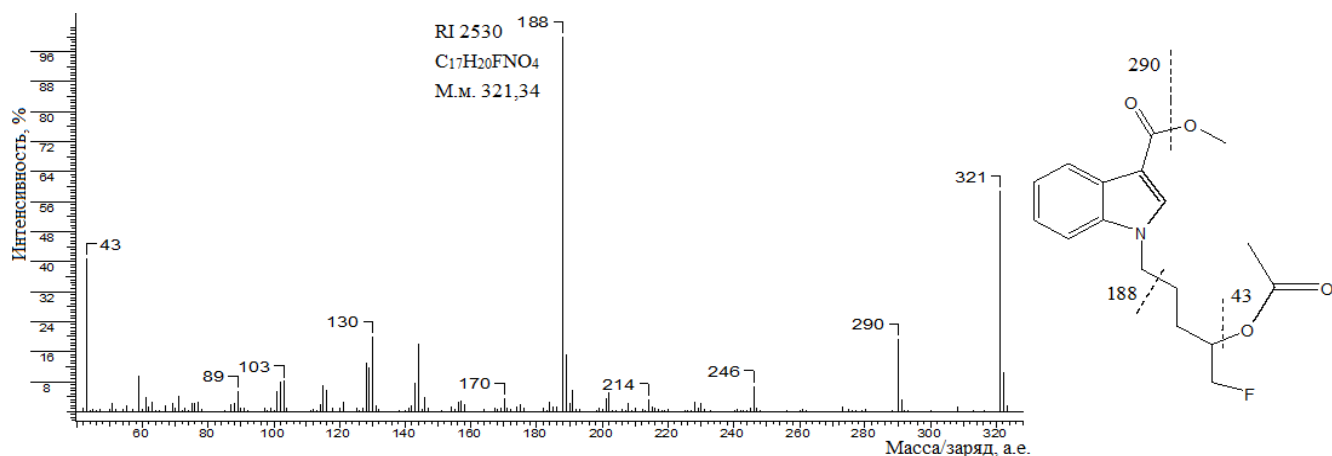


Рисунок 4.23 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2 после ацетилирования

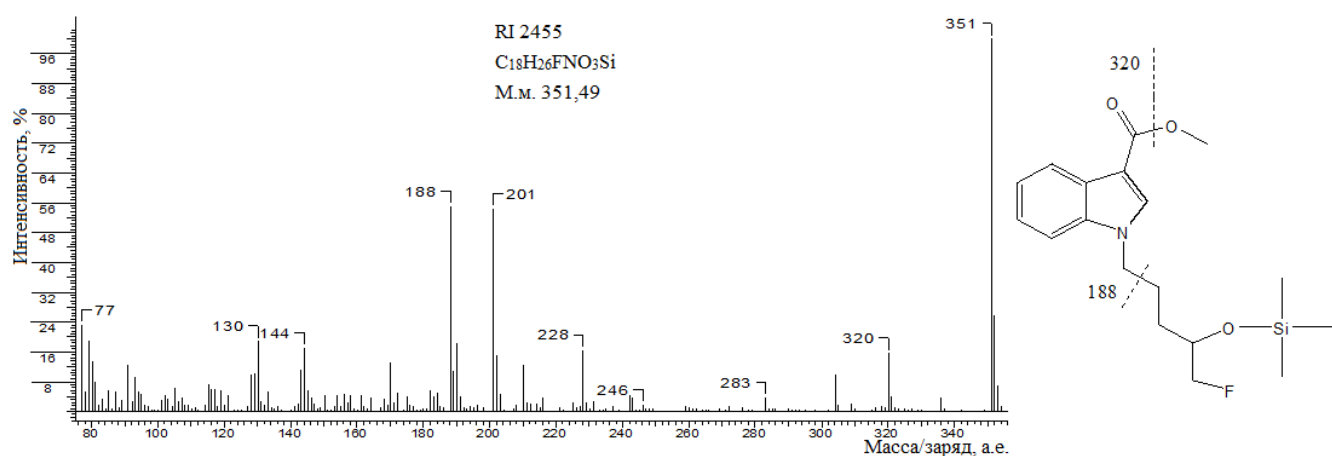


Рисунок 4.24 – Масс-спектр, структура и характеристики смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита M2

Фрагментация PB-22F подобна PB-22, и в спектрах всех дериватов обнаруженных метаболитов также присутствует интенсивный пик молекулярного иона. Спектры обоих соединений имеют общие пики ионов, в структуру которых входит 3-карбоксииндольный остаток (рисунок 4.12). Основные направления фрагментации (на примере метильного деривата простейшего метаболита M1) приведены на рисунке 4.25. Как видно из данной схемы, они заключаются в разрушении сложного эфира и боковой N-фторпентильной цепи. Признаком наличия неизмененного индольного цикла (кроме пика иона с m/z 144) можно считать присутствие пика иона с m/z 188 (M1 – M3, M5), а гидроксированного – пика иона с m/z 218 (M4).

Положение гидроксильной группы в алкильной цепи метаболитов M2 определяется наличием в масс-спектрах соединений пика иона $[\text{CH}_2\text{FCH}=\text{OH}]^+$ с m/z 63 [229, 391].

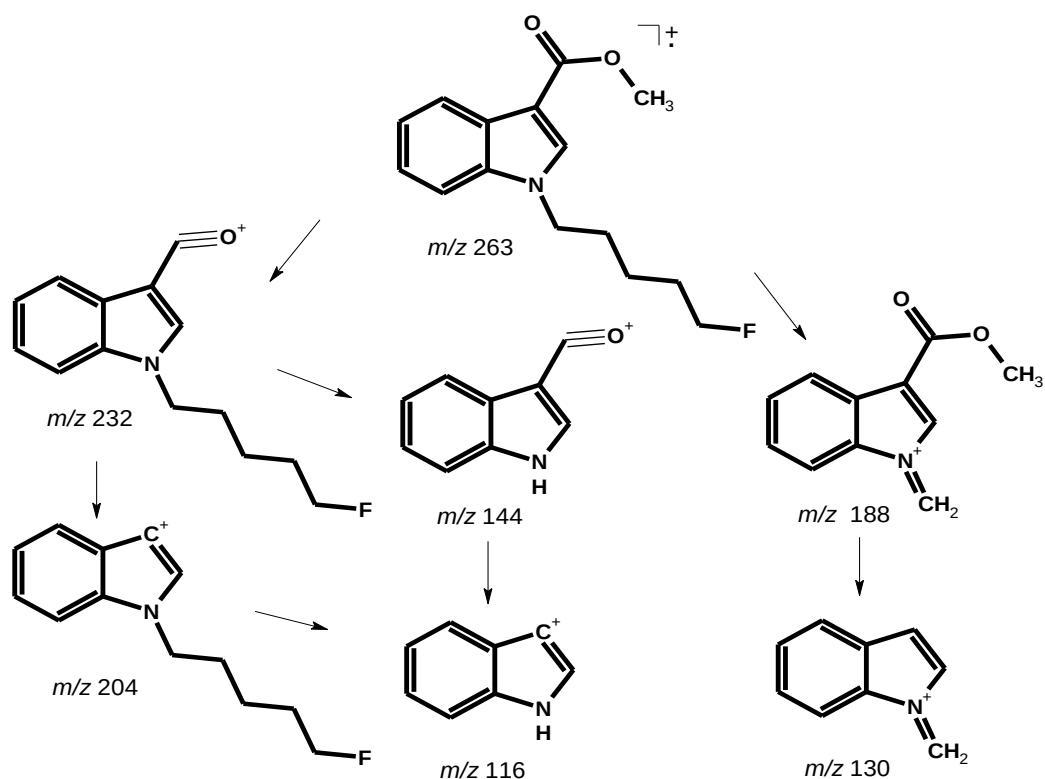


Рисунок 4.25 – Масс-фрагментация метилового эфира 1-(5-фторпентил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты

Идентифицированные метаболиты M1-M5 каннабимиметика PB-22F были обнаружены в элюате I. В элюате II выявлялся 8-гидроксихинолин.

Расчеты физико-химических констант LogP и K_{OC} показывают, что каннабимиметик PB-22F и его основные метаболиты M1-M5 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности. Неизмененный PB-22F и метаболит M1 являются высоколипофильными, M4 – среднелипофильным, метаболиты M2, M3, M5 и 8-гидроксихинолин (8-OX) – низколипофильными веществами.

Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Характеристика каннабимиметика РВ-22F и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение; Md –медиана)

Соединение	LogP	K _{oc} (pH=4.8)	Конъюгирование, %		Относительное содержание*		
			n	Md, %	Интервал (n=23), %	n	Md, %
РВ-22F	4,97	11939,4	16	н.д.	н.д.	-	-
M1	3,56	372,0	16	80 – 100 (95)	100	-	-
M2	2,12	59,9	10	79 – 100 (100)	0 – 12,5	18	5,0
M3	2,49	49,3	10	0 – 100 (100)	0 – 16,1	19	3,9
M4	2,83	174,9	9	100	0 – 3,3	18	1,4
M5	2,34	80,0	3	100	0 – 6,4	5	0,9
8-OH	1,87	1,83	16	19,2-100 (98)	н.о.	-	-

*Содержание M1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков молекулярных ион-радикалов в масс-спектрах метаболитов

н.д. – не детектируется, н.о. – не определяли.

Исследование 16 образцов мочи потребителей каннабимиметика РВ-22F показало, что его метаболиты присутствуют в моче преимущественно в конъюгированных формах (Таблица 4.2).

1-(4-Карбоксибутил)-1*H*-индол-3-карбоновая кислота (метаболит M3 каннабимиметика РВ-22F) является для каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F общим [318, 398]. Из 5 исследованных образцов мочи потребителей РВ-22 M3 был выявлен только в 1 пробе, тогда как в случае РВ-22F он был найден в 21 образце из 23 [400].

В трех образцах мочи в следовых количествах был обнаружен маркер, характерный для каннабимиметика РВ-22 – 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновая кислота [396, 398]. Установить в нашем исследовании, являлось ли наличие данного соединения результатом метаболического процесса (восстановительного

дегалогенирования) или следствием приема каннабимиметика РВ-22, или его смеси с каннабимиметиком РВ-22F, не представлялось возможным.

Подобно РВ-22, в образцах мочи потребителей РВ-22F нами были выявлены только метаболиты, образованные вследствие гидролиза сложноэфирной связи. Поэтому и в данном случае все затруднения, касающиеся предположений о характере структуры исходного соединения, подобны случаю РВ-22. Неизмененный каннабимиметик РВ-22F не был обнаружен ни в одном из исследованных образцов мочи.

Хроматографический пик метаболита М1 характеризуется наибольшей интенсивностью по сравнению с пиками остальных метаболитов.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика РВ-22F, определяющимися в моче, являются 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновая кислота и 8-гидроксихинолин. В силу выраженного характера метаболита М1 в сочетании с 8-гидроксихинолином в исследованных объектах, они могут использоваться в качестве маркеров употребления каннабимиметика РВ-22F у потребителей курительных смесей [396, 400].

4.1.3 Основные метаболиты и маркеры FUB-PB-22

Структурные формулы каннабимиметика FUB-PB-22 и его метаболитов, идентифицированных нами при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлены на рисунке 4.26.

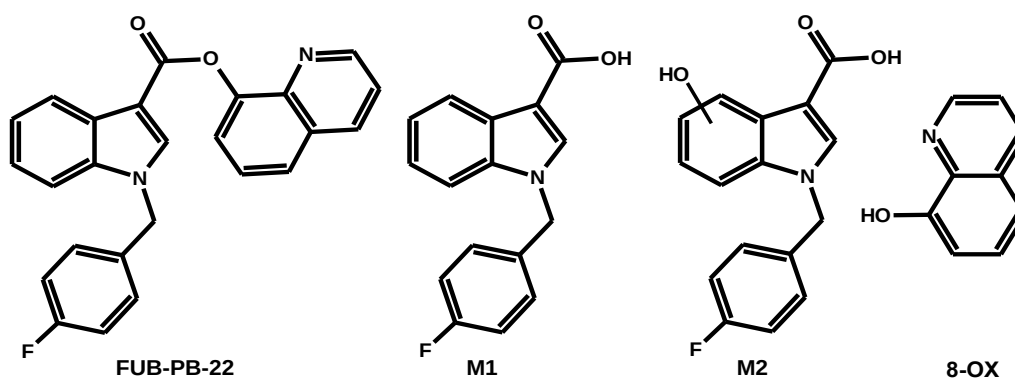


Рисунок 4.26 – Структурные формулы каннабимиметика FUB-PB-22 и его предполагаемых метаболитов (8-OH – 8-гидроксихинолин)

На рисунках 4.27 – 4.31 и 4.33 – 4.34 приведены масс-спектры, предложенные нами структуры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и основные направления фрагментации некоторых дериватов метаболитов FUB-PB-22.

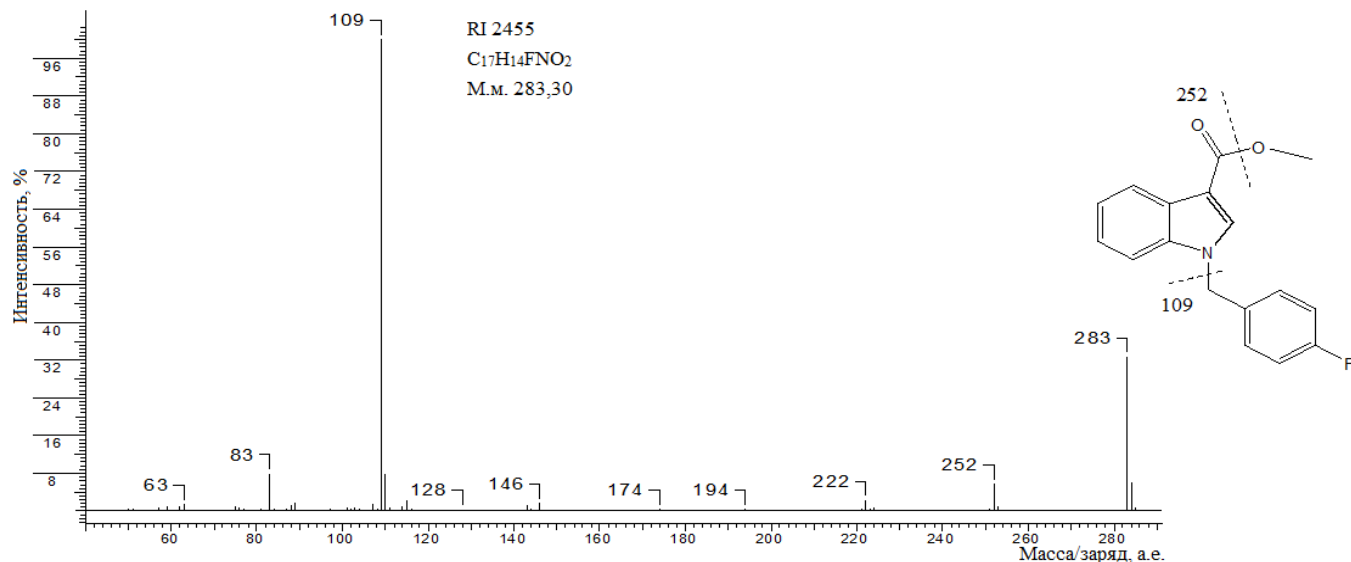


Рисунок 4.27 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M1

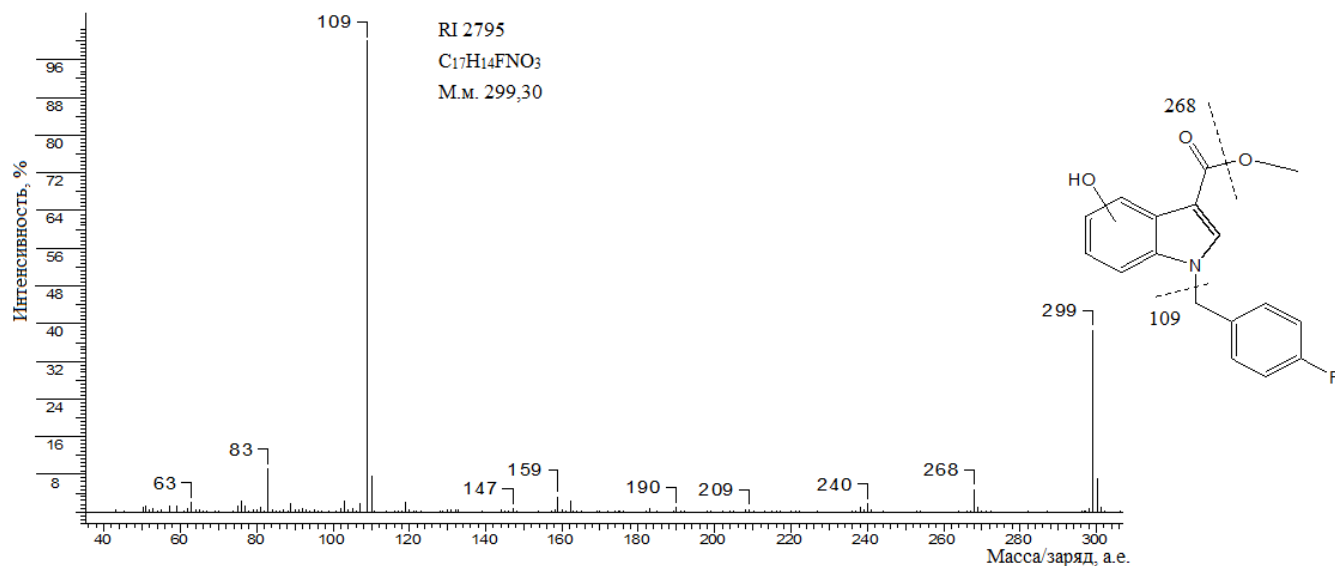


Рисунок 4.28 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2

Для всех приведенных соединений в масс-спектрах наблюдается пик молекулярного иона. В спектрах всех дериватов метаболитов M1 и M2 наиболее интенсивный пик (ион с величиной m/z 109) соответствует фторбензильному

остатку в положении 1 индольного цикла. Для метильных дериватов (рисунки 4.27 – 4.29), ионы с m/z 252, 268 и 282 образуются при разрушении сложного эфира.

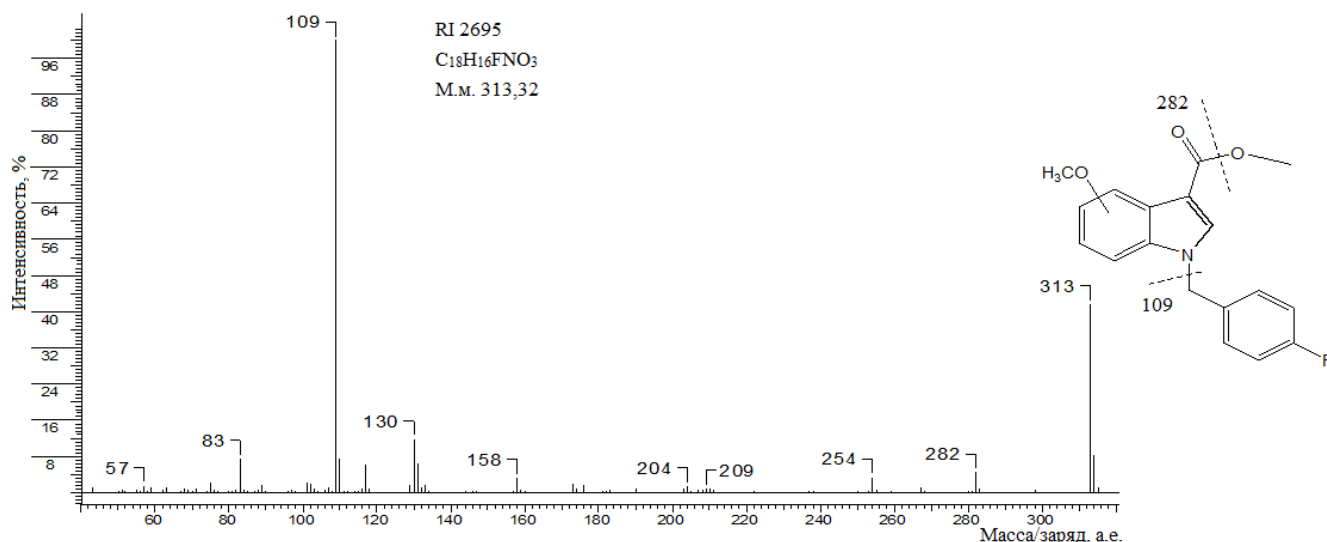


Рисунок 4.29 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита M2

Фрагментация триметилсилильных дериватов (рисунки 4.30 и 4.31) метаболитов M1 и M2 протекает подобно метильным. Она сводится преимущественно к разрушению связей между ароматическими остатками молекул. Ион с m/z 282 образуется, по-видимому, в результате перегруппировки (рисунок 4.32).

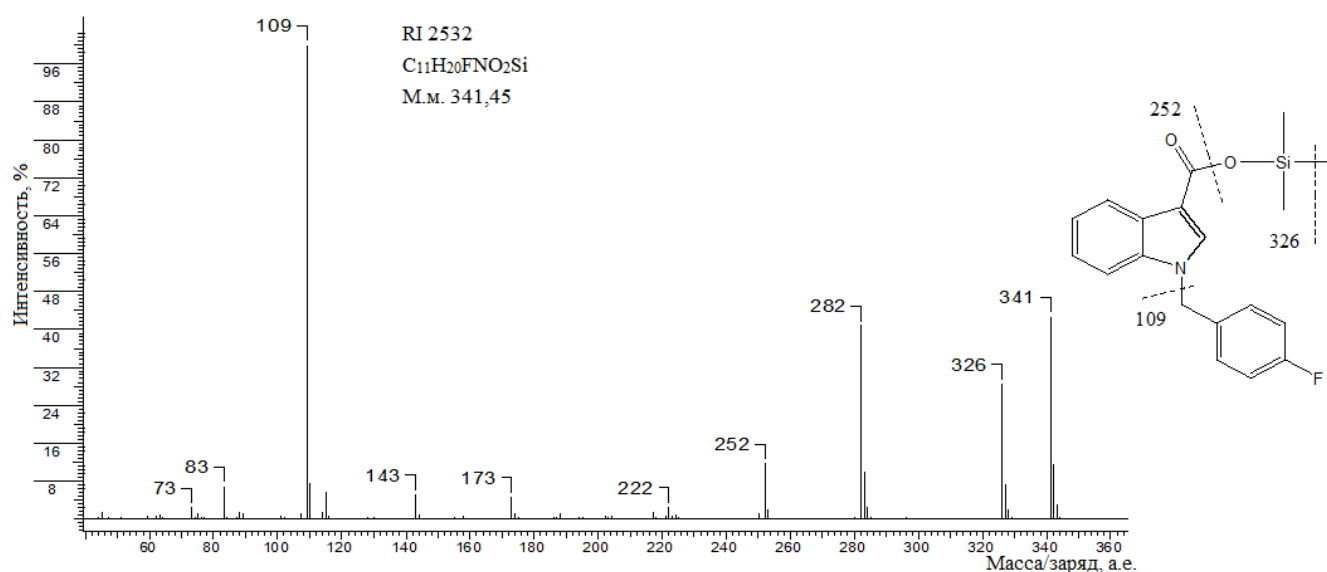


Рисунок 4.30 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита M1

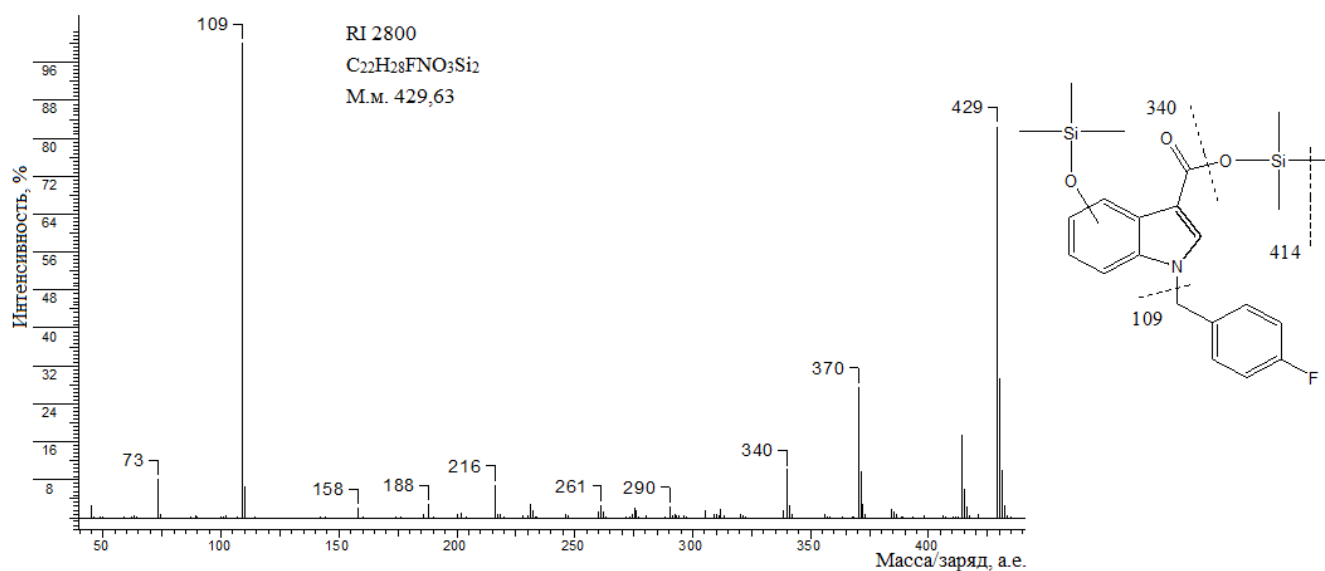


Рисунок 4.31 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M2

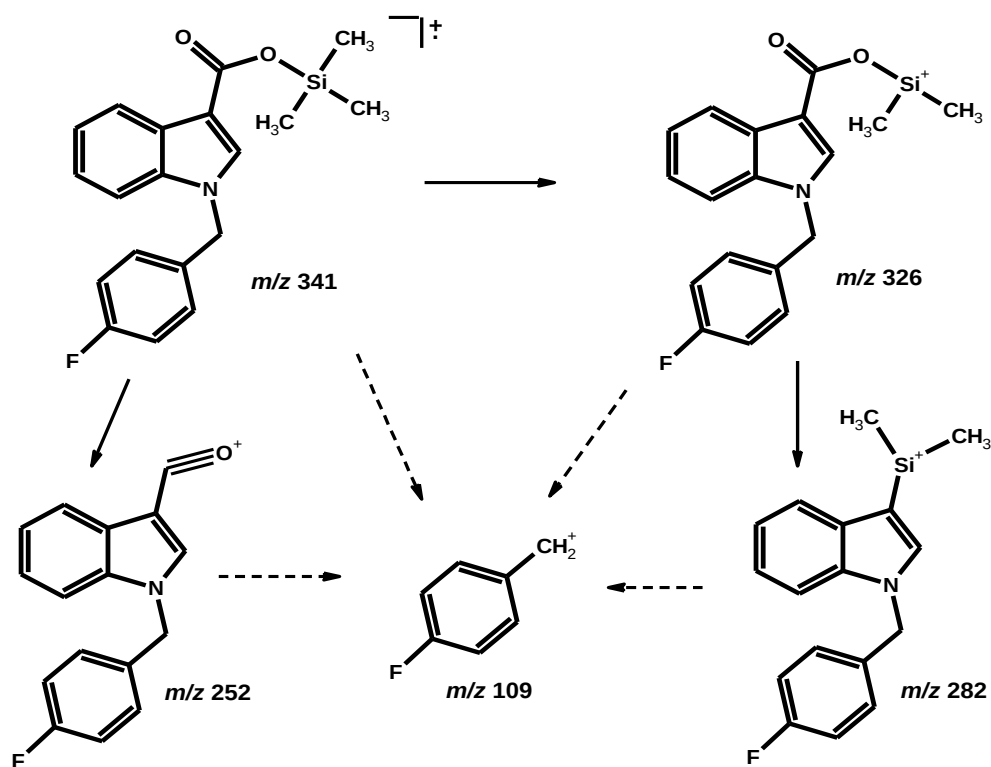


Рисунок 4.32 – Масс-фрагментация триметилсилилового эфира 1-[(4-фторфенил)метил]-1H-индол-3-карбоновой кислоты

Метаболиты M1 и M2 были обнаружены в элюате I. В элюате II выявлялся 8-гидроксихинолин. Его дериваты (рисунки 4.33 и 4.34) идентифицировали с

помощью коммерческих библиотек масс-спектров (NIST 11, DesDrug 2011) и с использованием аналитического стандарта.

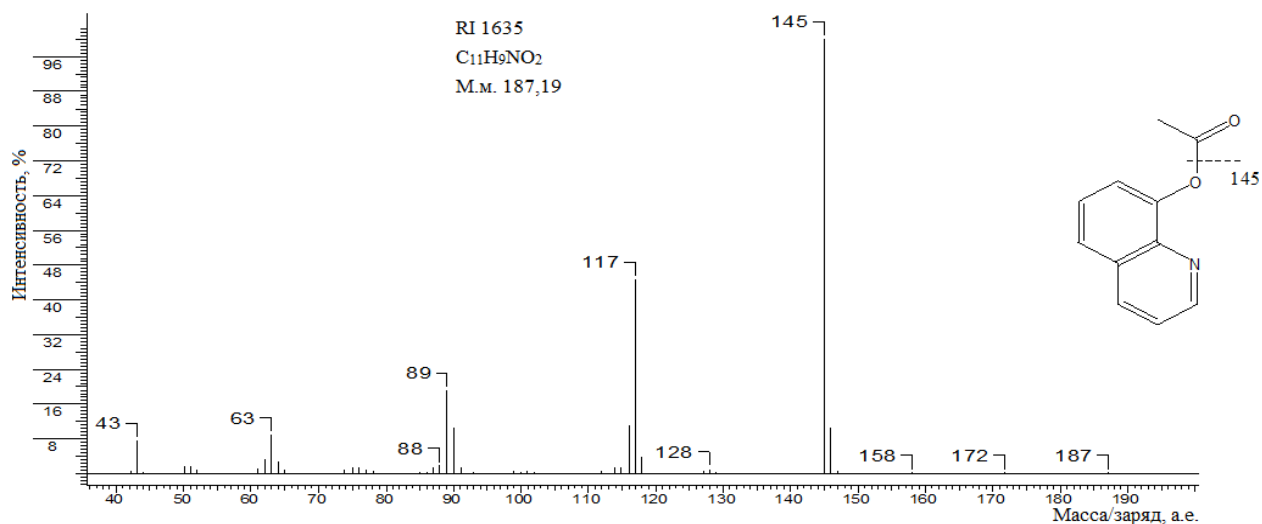


Рисунок 4.33 – Масс-спектр, структура и характеристики ацетилированного 8-гидроксихинолина

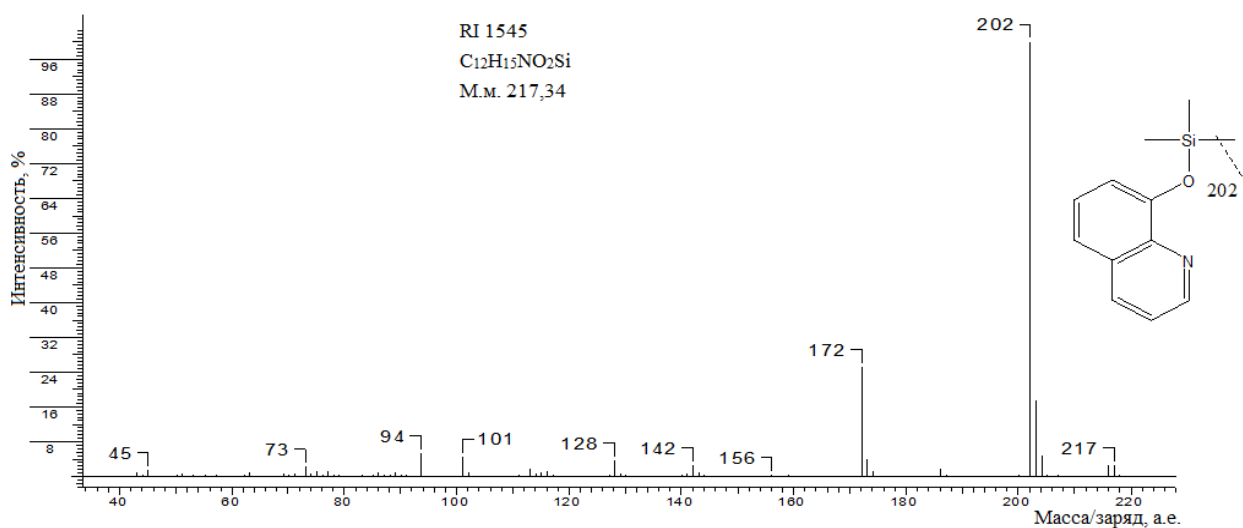


Рисунок 4.34 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира 8-гидроксихинолина

Расчеты физико-химических констант LogP и K_{OC} показывают, что каннабимиметик FUB-PB-22 и его метаболиты M1-M2 являются высоколипофильными веществами, а 8-гидроксихинолин (8-OX) – низколипофильным.

Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Характеристика каннабимиметика FUB-PB-22 и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение; Md – медиана)

Соединение	Log P	K _{oc} (pH = 4.8)	n	Конъюгирование, % (Md, %)
FUB-PB-22	5,38	19945,0	5	н.д.
M1	3,97	1030,5	5	85,4-96,1 (94)
M2	3,24	548,4	5	85,2-95,3 (92)
8-OH	1,87	1,83	5	65,0-100 (99,7)

н.д. – не детектируется

Исследование пяти образцов мочи потребителей каннабимиметика FUB-PB-22 показало, что его основные метаболиты выводятся, преимущественно, в форме конъюгатов. Ни в одном образце мочи неизмененный FUB-PB-22 не был обнаружен. Поскольку в нашем исследовании не выявлено ни одного метаболита, в структуре которого сохранились бы оба (индольный и гидроксифинолиновый) ароматических остатка, то при вынесении предположений об употреблении FUB-PB-22 справедливо все то, что указывалось для PB-22 и PB-22F.

Таким образом, основными метаболитами каннабимиметика FUB-PB-22, определяющимися в моче, являются 1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индол-3-карбоновая кислота (M1), ее гидроксипроизводное (M2) и 8-гидроксифинолин.

Относительное содержание M2 определялось в интервале 5,1 – 44 % (медиана 24%) относительно M1. Хроматографический пик метаболита M1 характеризуется наибольшей интенсивностью по сравнению с пиками остальных метаболитов, поэтому в сочетании с 8-гидроксифинолином в исследованных объектах, они могут использоваться в качестве маркеров употребления каннабимиметика FUB-PB-22 у потребителей курительных смесей [401].

Таким образом, каннабимиметики PB-22, PB-22F и FUB-PB-22, содержащие в своей структуре сложноэфирную связь, подвергаются биотрансформации, главным образом, путем гидролиза эфирной связи с образованием ряда карбоксильных метаболитов и 8-гидроксихинолина, с последующим конъюгированием метаболитов, достигающим 100%. Общая схема образования маркеров каннабимиметиков из индолкарбоксилатов представлена на рисунке 4.35.

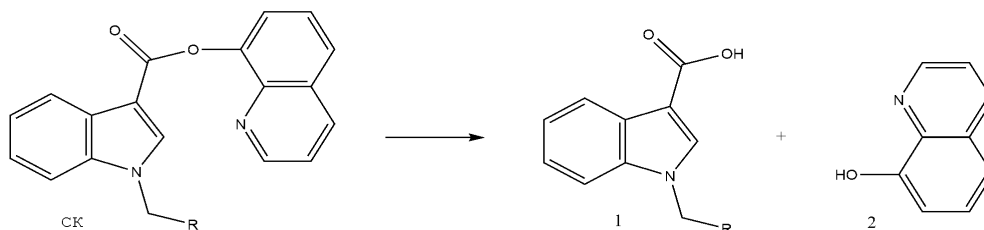


Рисунок 4.35 – Общая химическая структура каннабимиметиков PB-22 (R = н-бутил), PB-22F (R = 4-фтор-н-бутил), FUB-PB-22 (R = 4-фторфенил), их маркеров: метаболит M1 (соединение 1 – кислотный маркер) и 8-гидроксихинолин (соединение 2 – спиртовой маркер).

Учитывая преобладание в моче для рассматриваемых каннабимиметиков метаболитов (1) и 8-гидроксихинолина (2), последние предложены в качестве маркеров для целей выявления случаев употребления PB-22, PB-22F и FUB-PB-22 [396–404].

4.2 Выявление основных метаболитов каннабимиметиков группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина в моче

4.2.1 Основные метаболиты и маркеры AB-PINACA

Структурные формулы каннабимиметика AB-PINACA и его метаболитов, предположительно идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлены на рисунке 4.36.

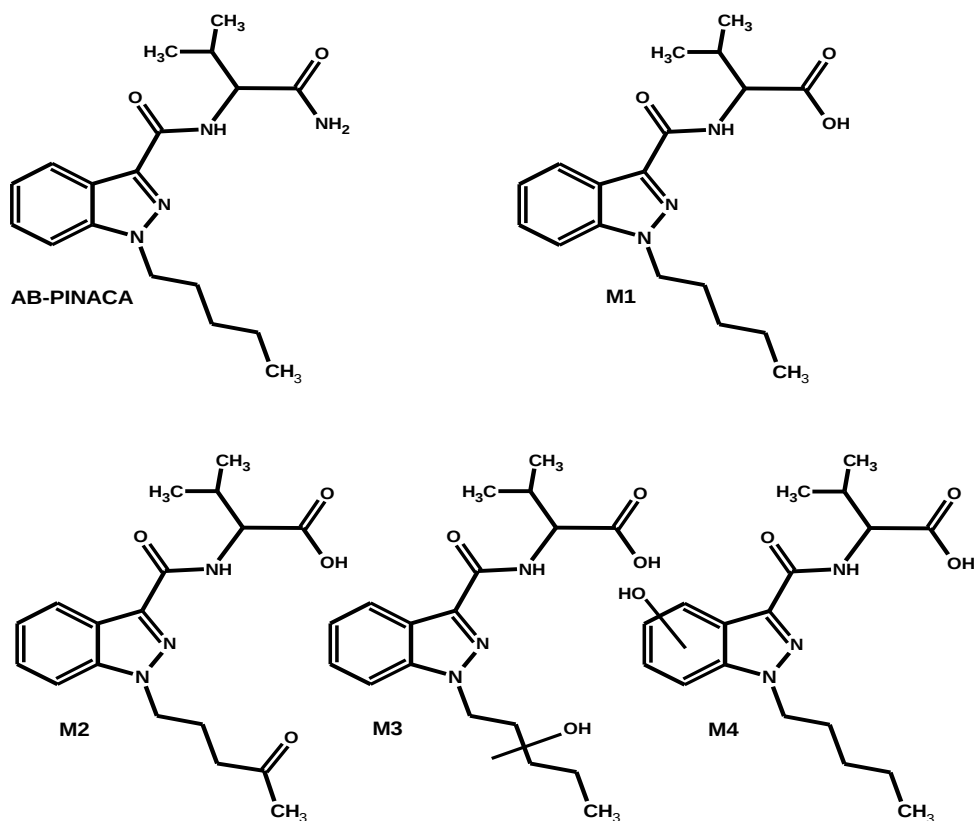


Рисунок 4.36 – Структурные формулы каннабимиметика AB-PINACA и его предполагаемых основных метаболитов

На рисунках 4.37 – 4.46 приведены масс-спектры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и, предложенные нами, структурные формулы производных метаболитов M1-M4 каннабимиметика AB-PINACA.

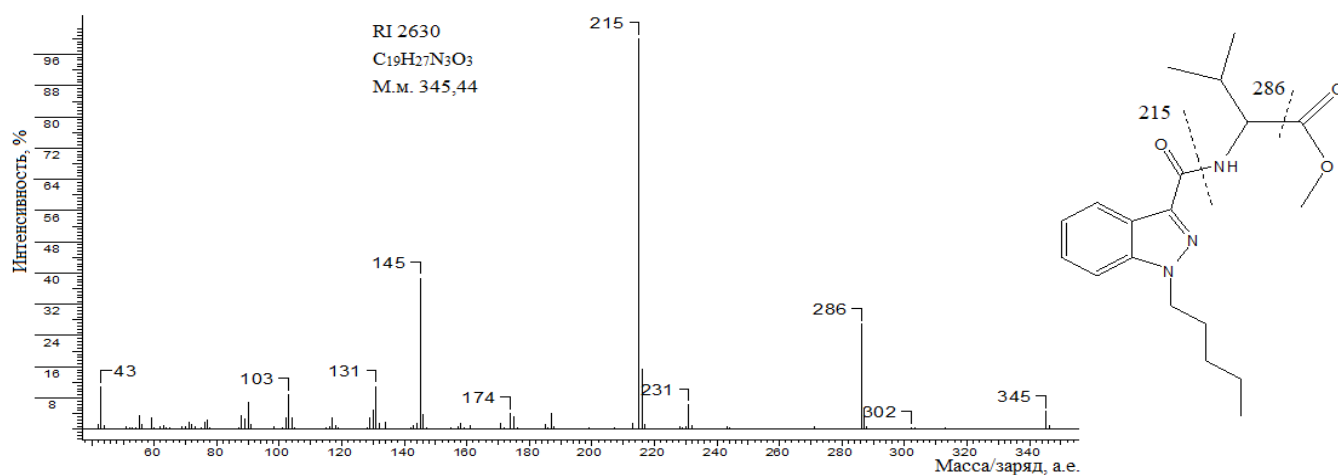


Рисунок 4.37 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M1

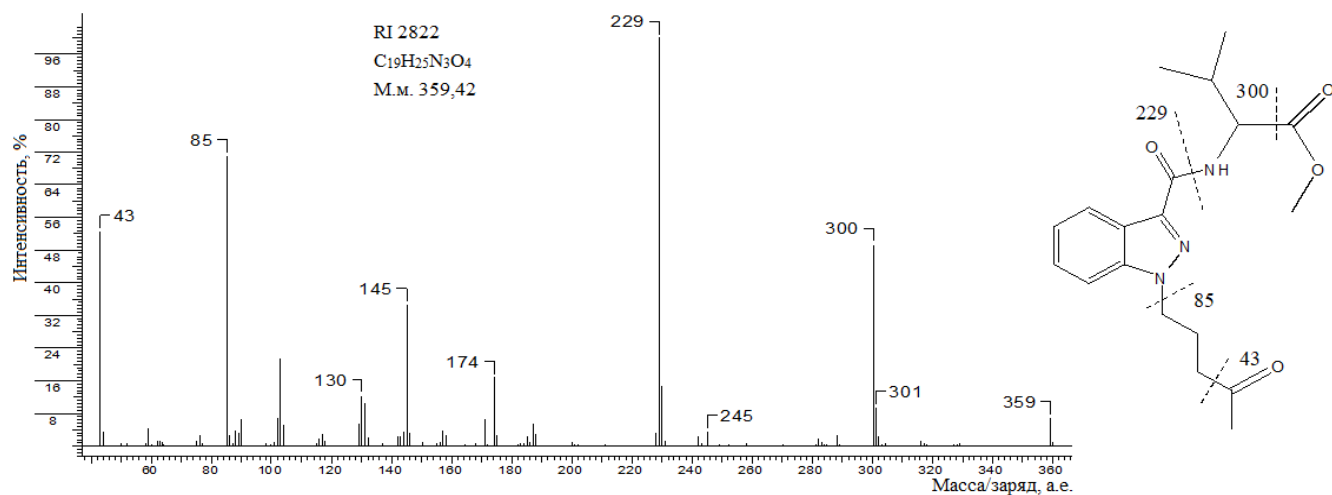


Рисунок 4.38 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2

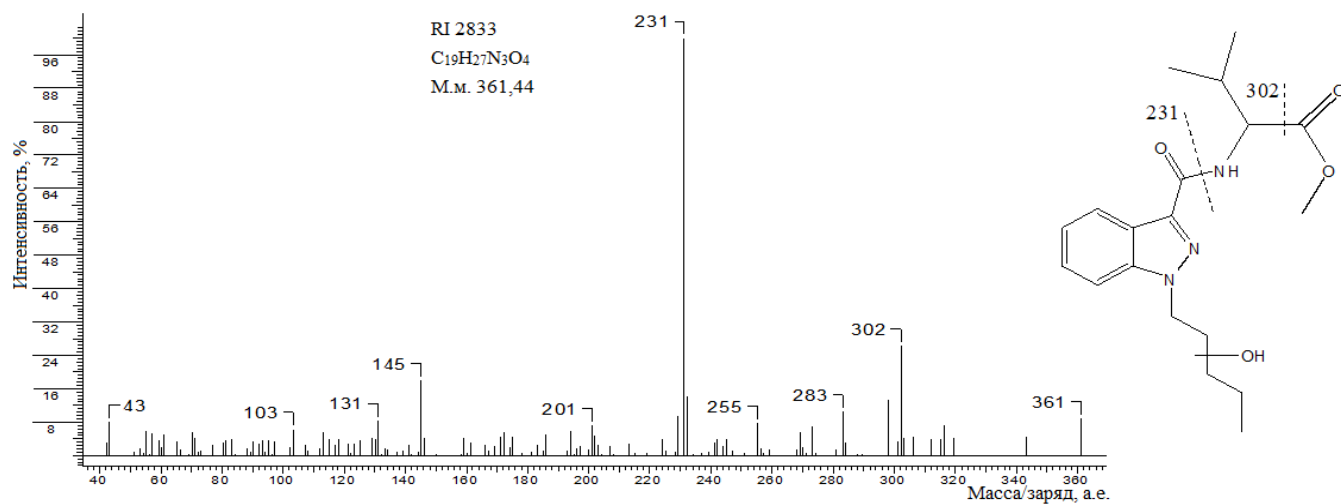


Рисунок 4.39 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M3

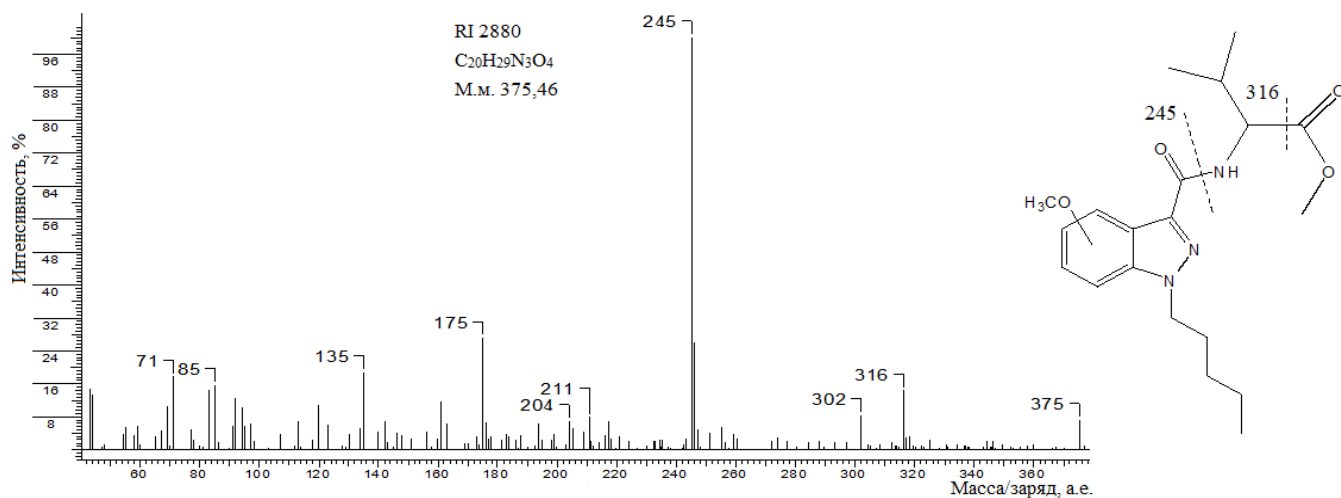


Рисунок 4.40 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита M4

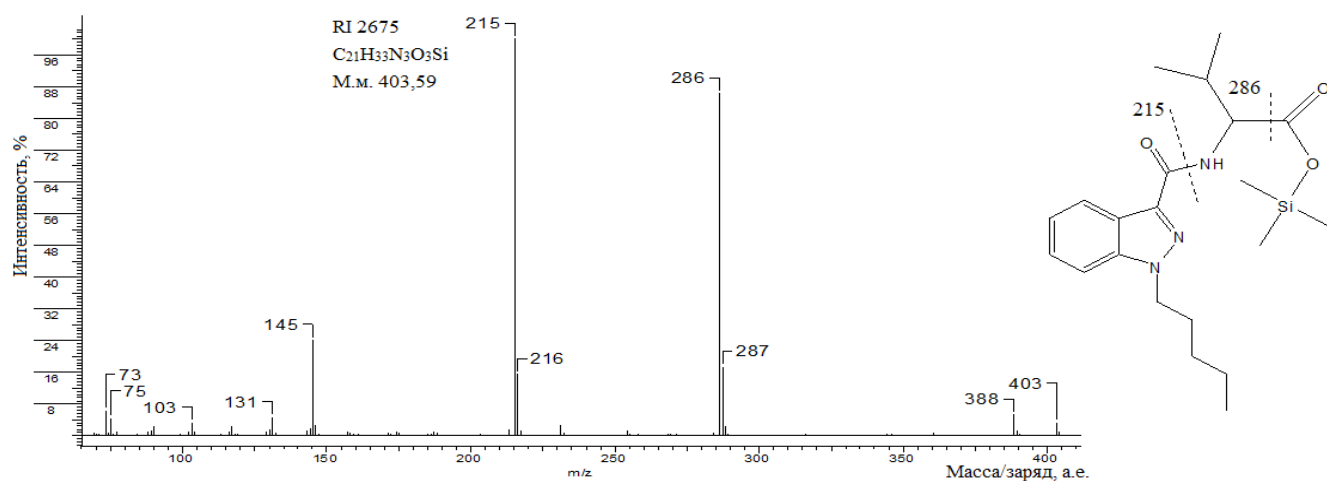


Рисунок 4.41 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита M1

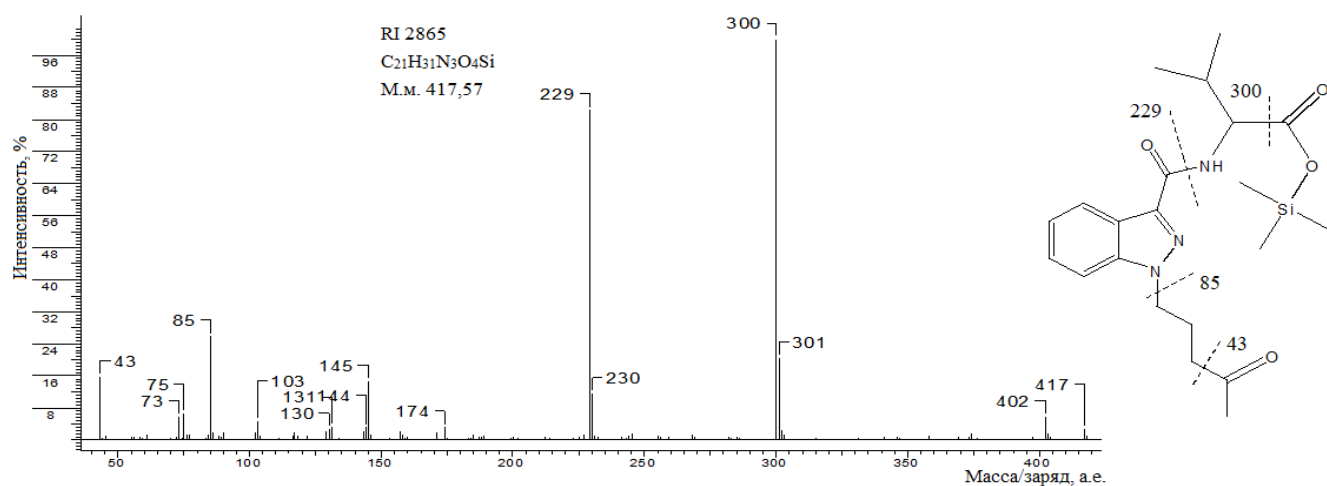


Рисунок 4.42 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита M2

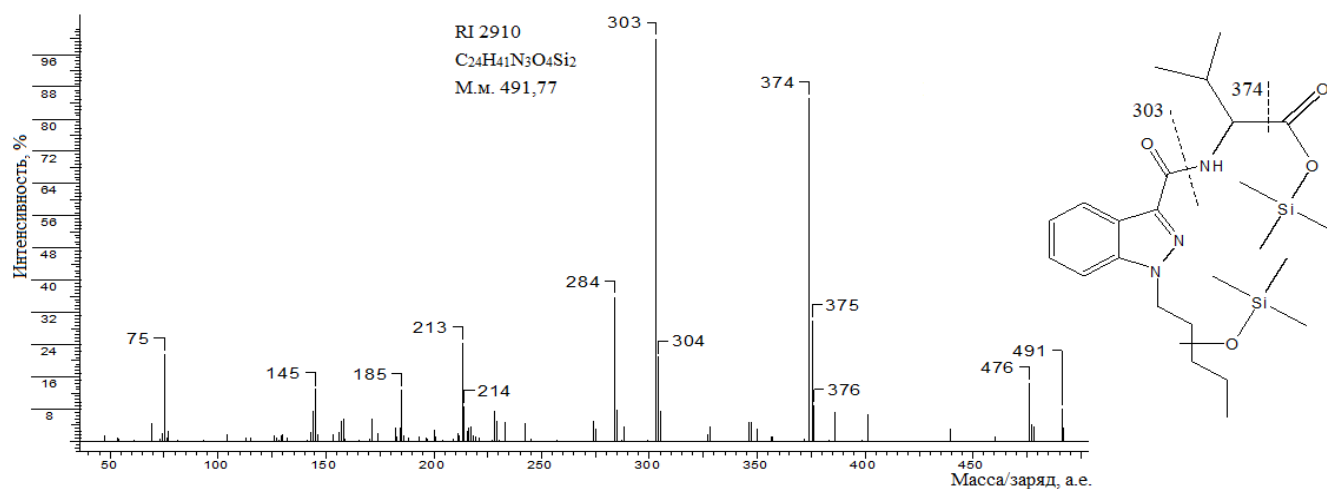


Рисунок 4.43 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M3

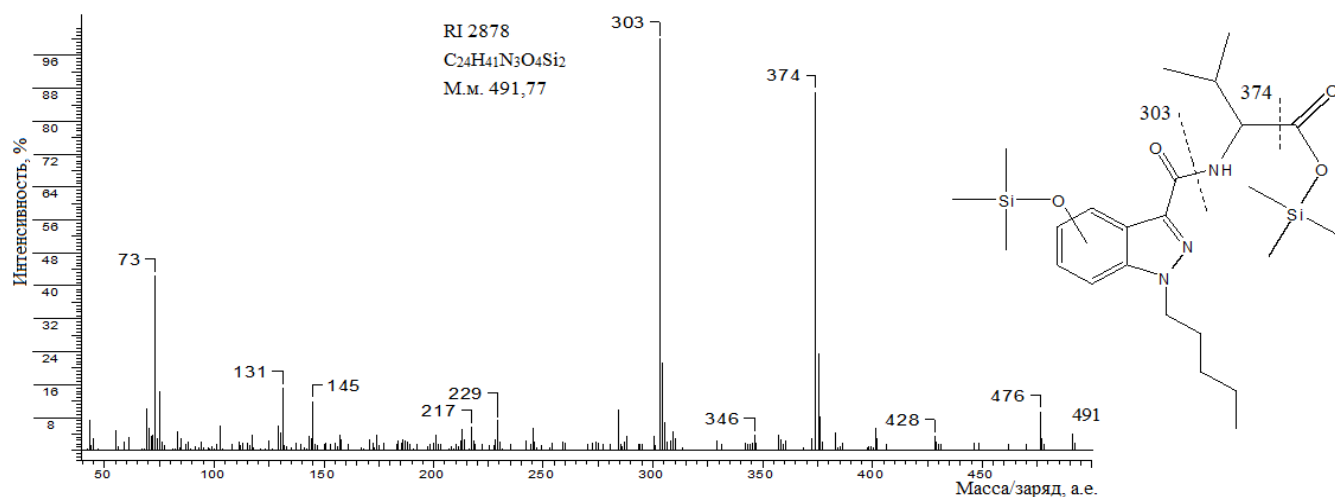


Рисунок 4.44 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита М4

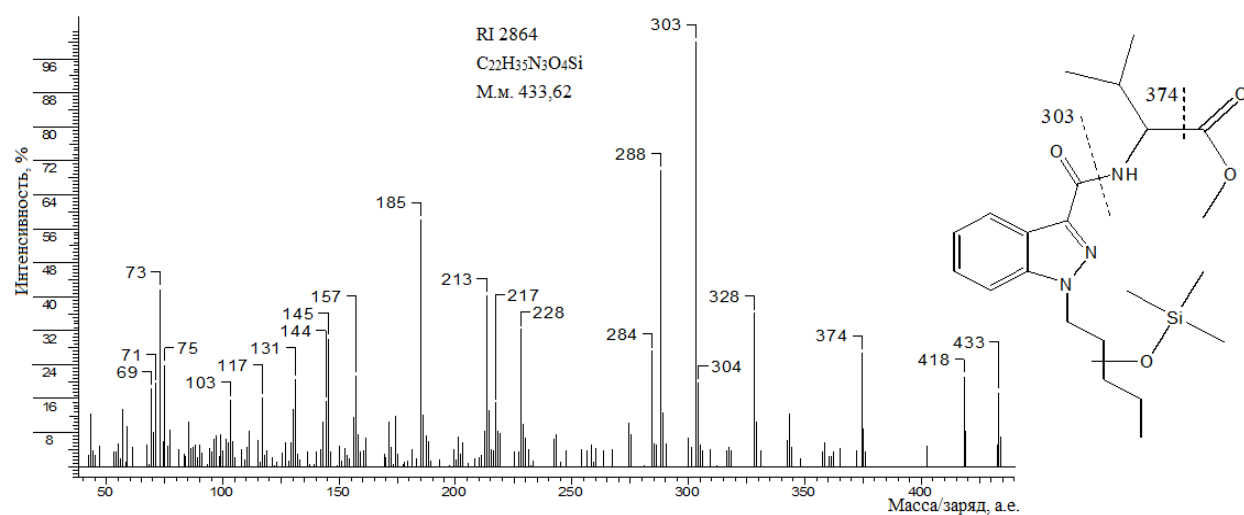


Рисунок 4.45 – Масс-спектр, структура и характеристики смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М3

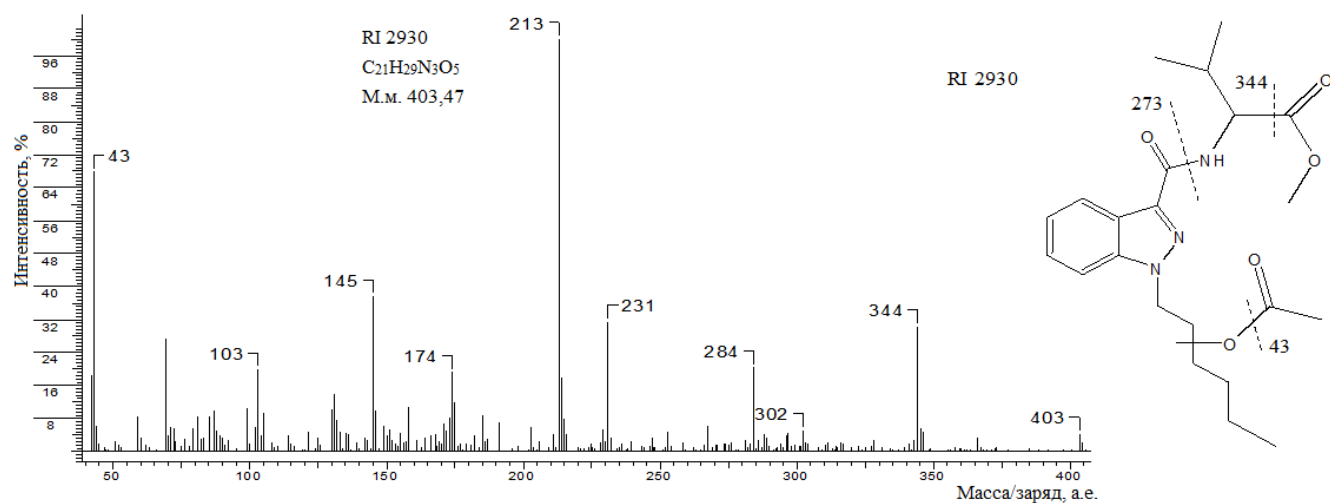


Рисунок 4.46 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М3 после ацетилирования

В масс-спектрах всех приведенных соединений наблюдается пик молекулярного иона, что облегчает интерпретацию. Имеются общие направления фрагментации, характерные для эфиров, образованных карбоксильной группой метаболитов М1-М4: для метиловых эфиров такие как $[M-59]^+$ и $[M-130]^+$, для триметилсилильных дериватов – $[M-117]^+$ и $[M-188]^+$.

Общие характеристические ионы для метаболитов М1 – М3 с величинами m/z 145 и 174 представлены на рис. 4.47. Для диметилового эфира метаболита М4 наблюдается выраженный ион с величиной m/z 175, при этом ион с величиной m/z 145 в масс-спектре отсутствует.

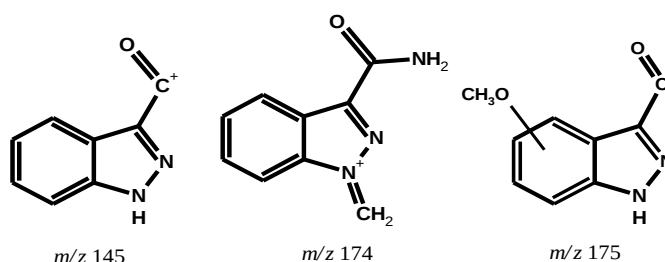


Рисунок 4.47 – Предполагаемые структурные формулы ионов, образующихся при масс-фрагментации метаболитов АВ-PINACA

Все идентифицированные метаболиты АВ-PINACA были обнаружены в элюате I. Применение ферментативного гидролиза имеет значение в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-PINACA.

Расчеты физико-химических констант (LogP , K_{OC}) показывают, что каннабимиметик АВ-PINACA и его основные метаболиты М1 – М4 обладают различными свойствами с точки зрения липофильности.

Неизмененный АВ-PINACA и метаболит М1 являются высоколипофильными, метаболит М4 – средне-, а М2 и М3 – низколипофильными веществами. Результаты расчетов и полученных нами данных представлены в таблице 5.4.

Исследование трех образцов мочи потребителей каннабимиметика АВ-PINACA показало, что основные метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: М1 на 53-81% (медиана 66%), М2 на 6-29% (медиана 16%), М3 на 22-60% (медиана 41%) и М4 на 31-44% (медиана 37%).

Таблица 4.4 – Характеристики каннабимиметика АВ-PINACA и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение)

Соединение	LogP	K _{oc} (pH=4,8)	Конъюгирование, % (n)	Относительное содержание*, %
AB-PINACA	3,00	1022,35	н.д.	н.д.
M1	3,17	49,16	53-81 (3)	100
M2	1,10	3,65	6-29 (3)	15-40
M3	1,17	4,00	22-60 (2)	0-5
M4	2,44	16,93	31-44 (2)	0-1,6

*Содержание M1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади характеристических ионов, имеющих интенсивность 100% в масс-спектре метаболитов

н.д. – не детектируется

В исследованных образцах мочи неизмененный каннабимиметик АВ-PINACA обнаружен не был. Из относительного содержания метаболитов в образцах мочи следует, что соединение M1 превалирует в процессе элиминации метаболитов из организма человека.

Основным метаболитом каннабимиметика АВ-PINACA, определяющимся в моче, является M1 как продукт гидролиза концевой амидной связи АВ-PINACA. Хроматографический пик метаболита M1 характеризуется наибольшей интенсивностью по сравнению с пиками остальных метаболитов, поэтому метаболит M1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-PINACA. Метаболит M2 выявляется в значительном количестве, но не во всех случаях (найден в 3-х из 4-х исследованных проб мочи), а метаболиты M3 и M4 не имеют аналитического значения в виду их минорных количеств [405, 406].

4.2.2 Основные метаболиты и маркеры 5F-AB-PINACA

Структурные формулы метаболитов 5F-AB-PINACA, предположительно идентифицированных при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших курительные смеси, представлены на рис. 4.48.

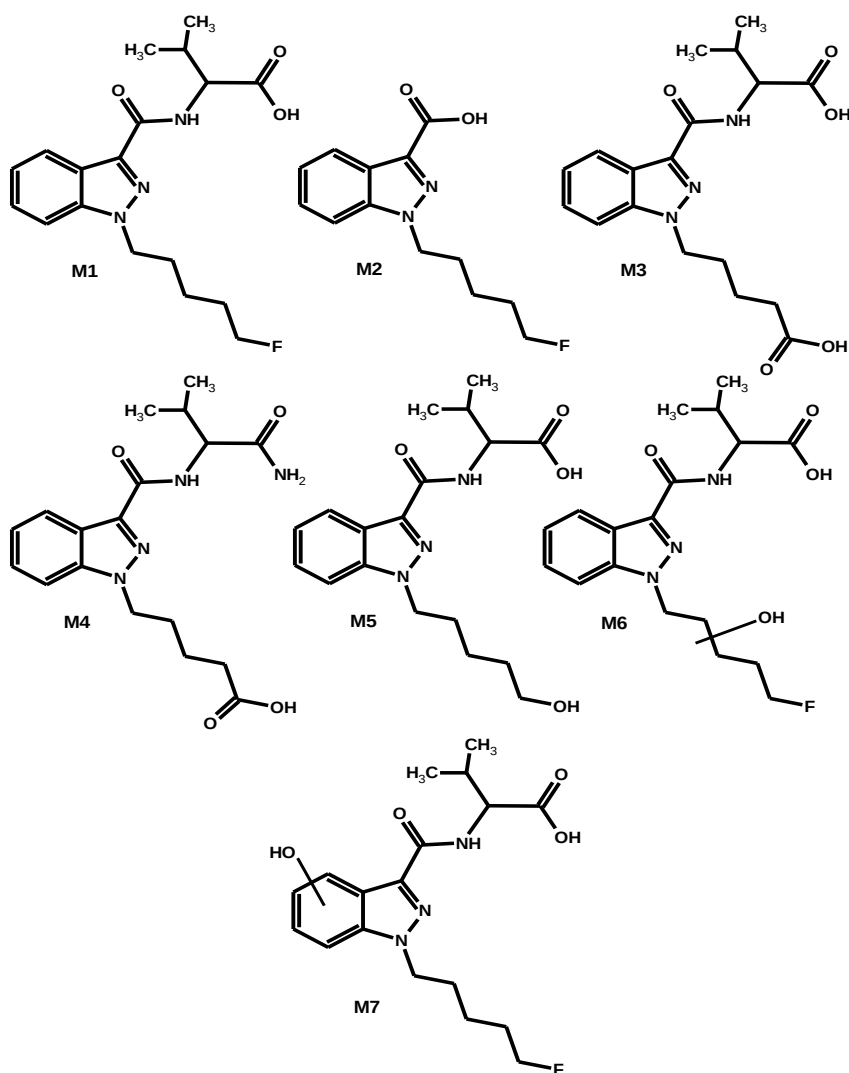


Рисунок 4.48 – Предполагаемые структуры обнаруженных метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA

На рисунках 4.49 – 4.63 приведены предложенные нами структуры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и масс-спектры производных метаболитов M1-M7 каннабимиметика 5F-AB-PINACA.

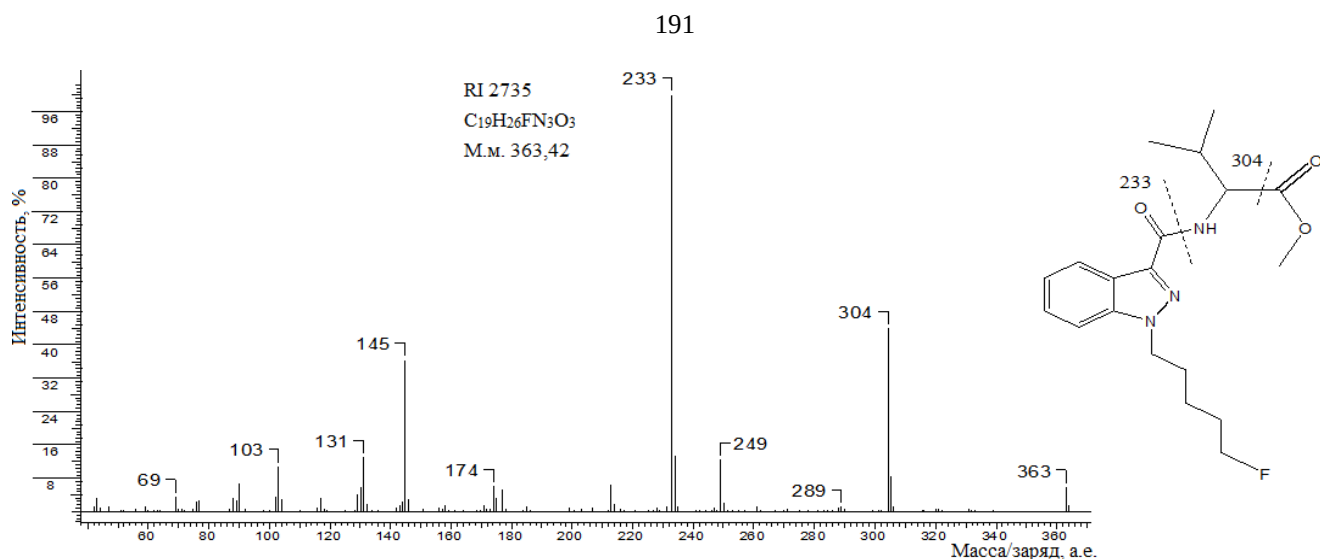


Рисунок 4.49 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M1

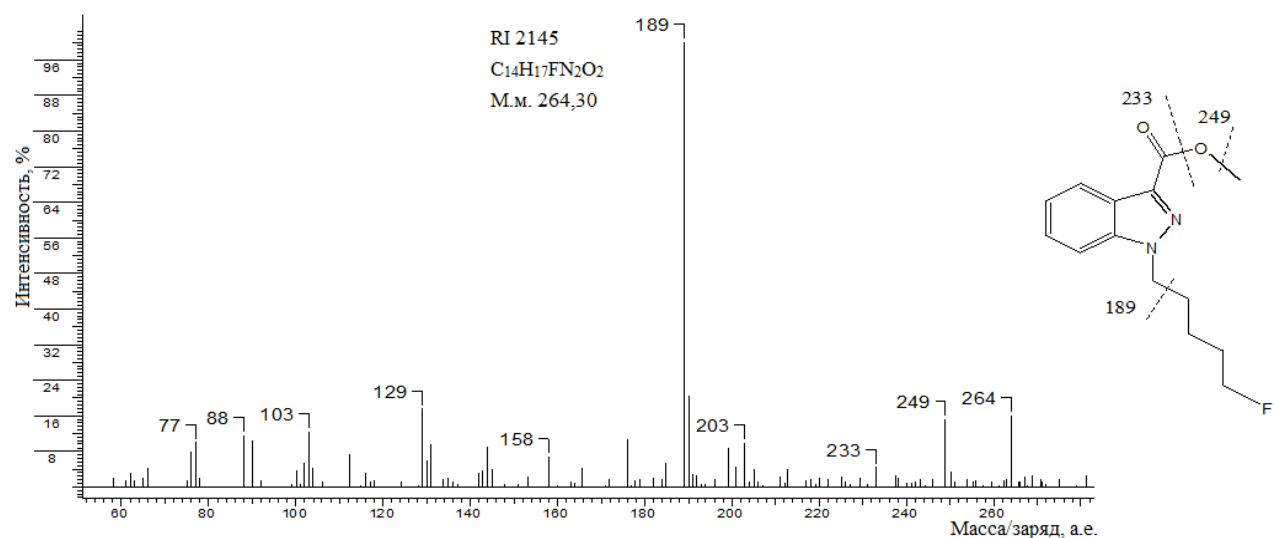


Рисунок 4.50 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита M2

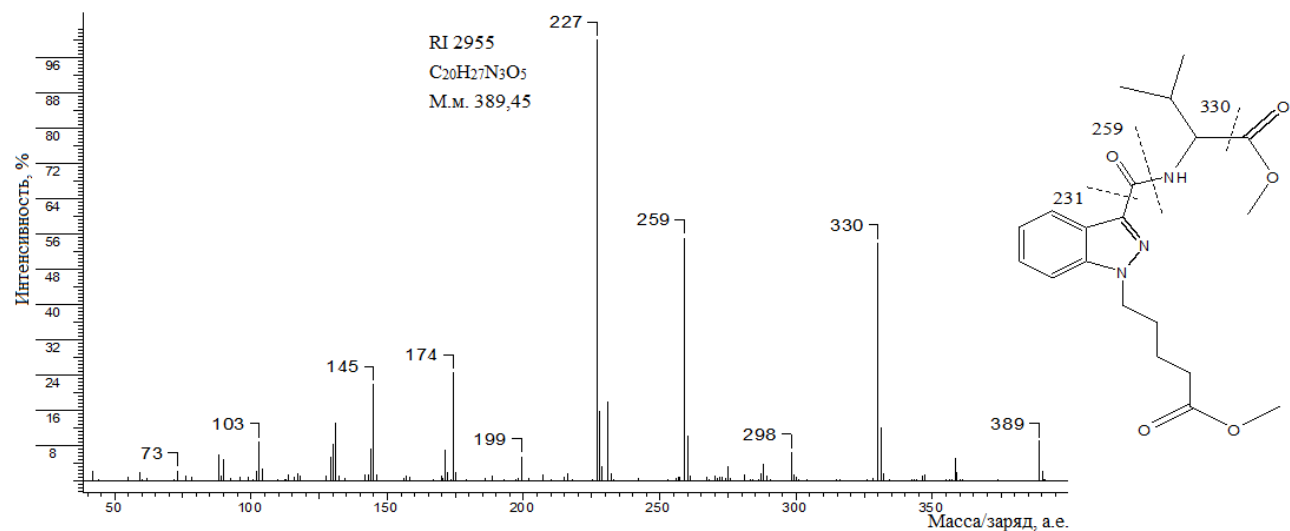


Рисунок 4.51 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита M3

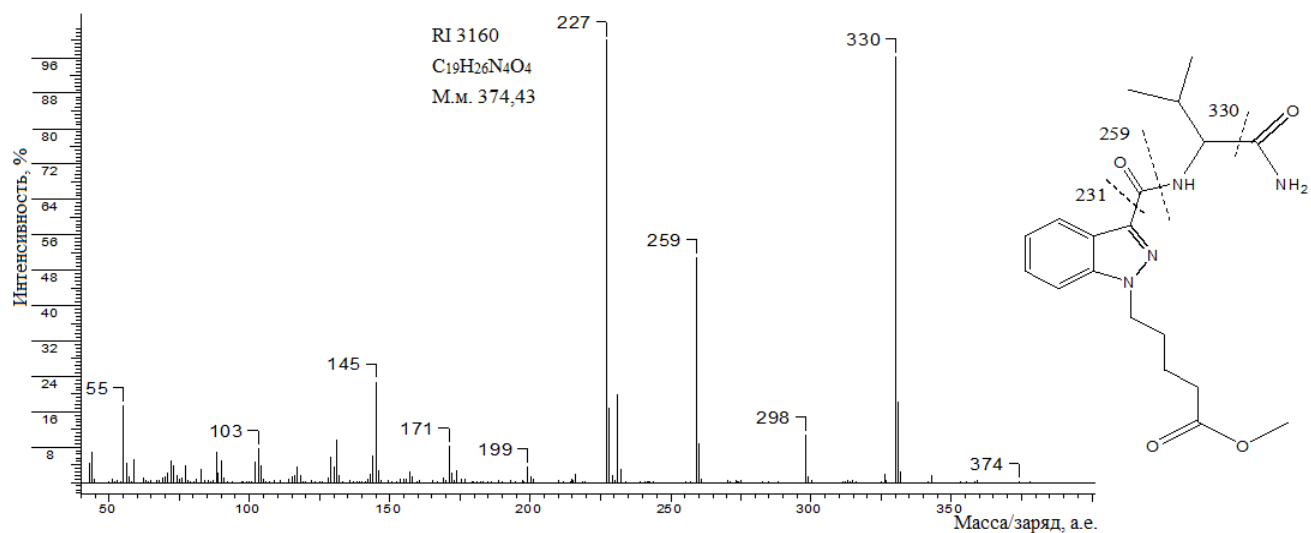


Рисунок 4.52 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М4

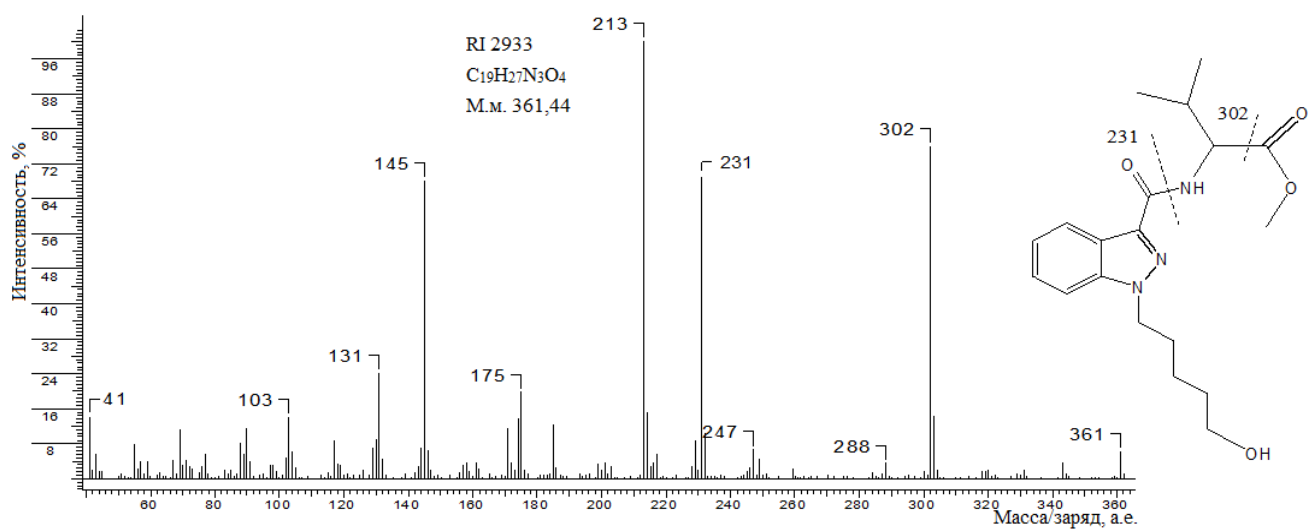


Рисунок 4.53 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М5

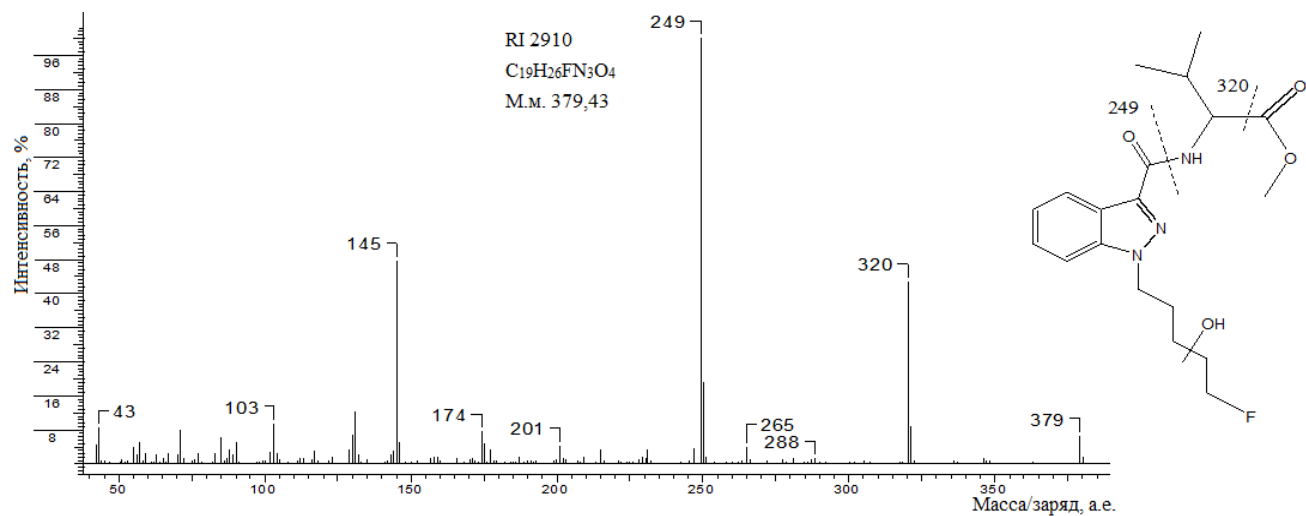


Рисунок 4.54 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М6

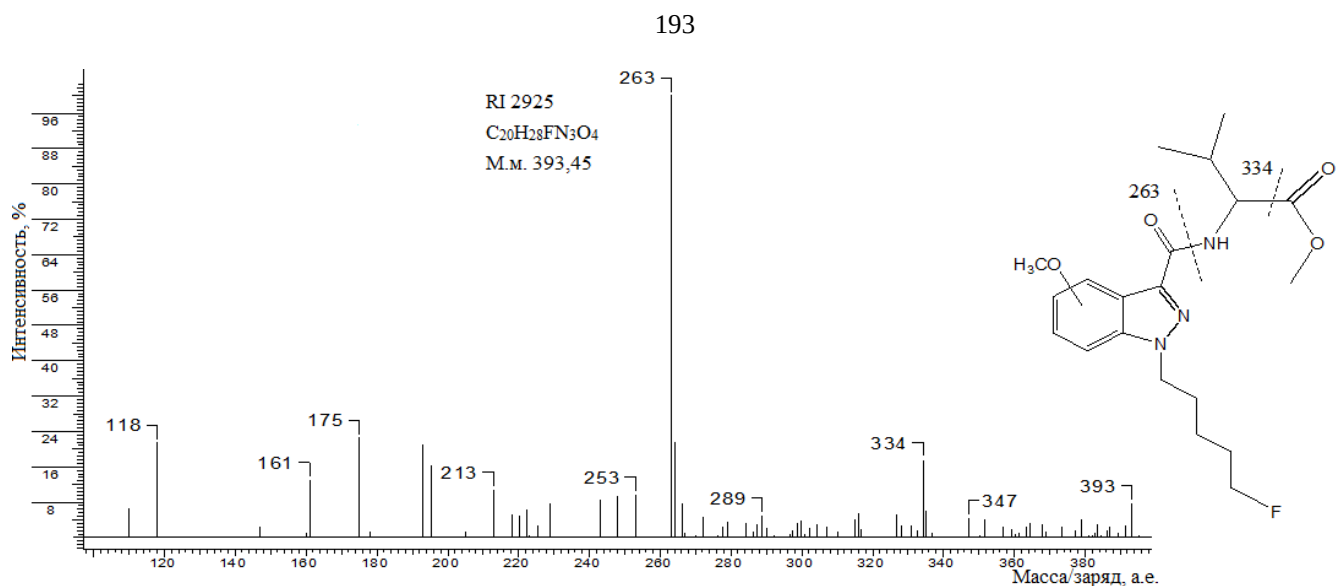


Рисунок 4.55 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира метаболита М7

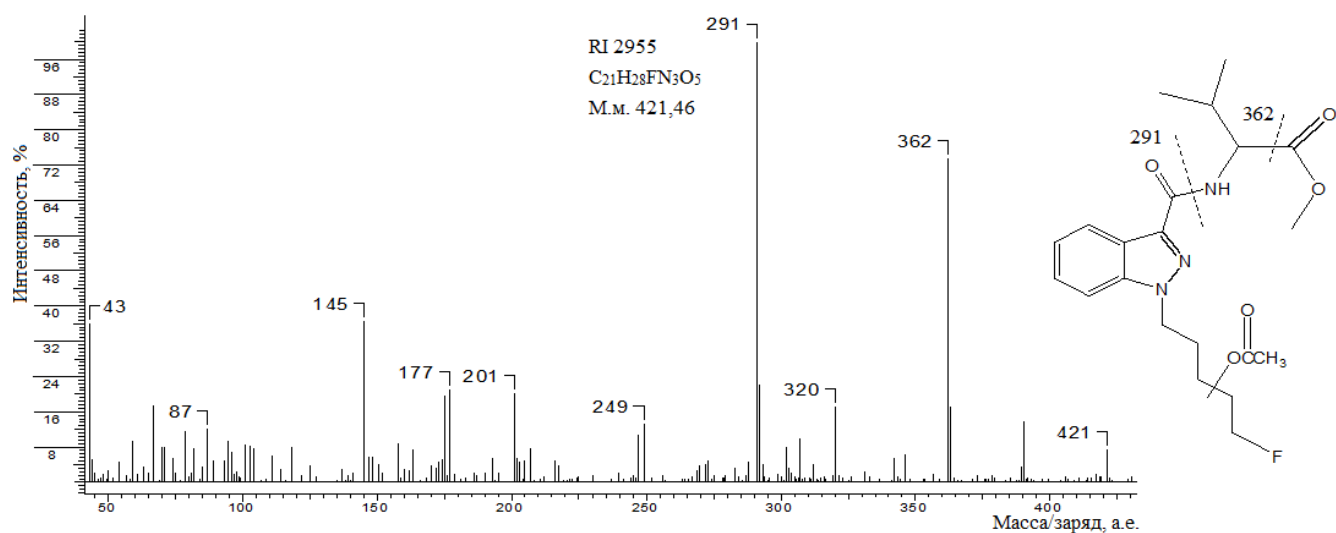


Рисунок 4.56 – Масс-спектр, структура и характеристики монометилового эфира метаболита М6.1, после ацетилирования

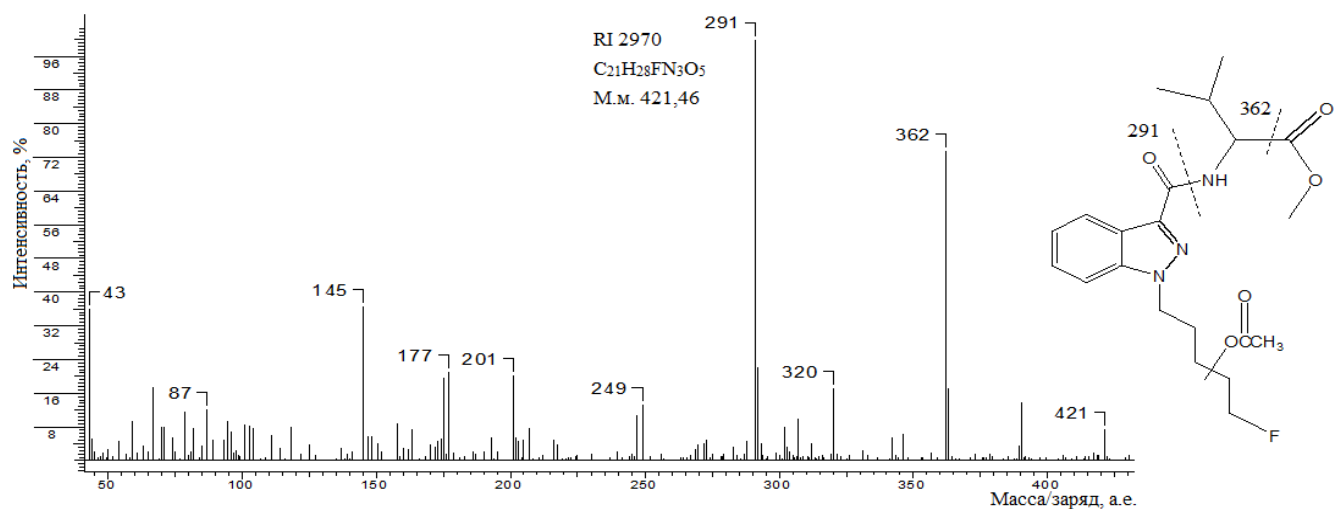


Рисунок 4.57 – Масс-спектр, структура и характеристики монометилового эфира метаболита М6.2 после ацетилирования

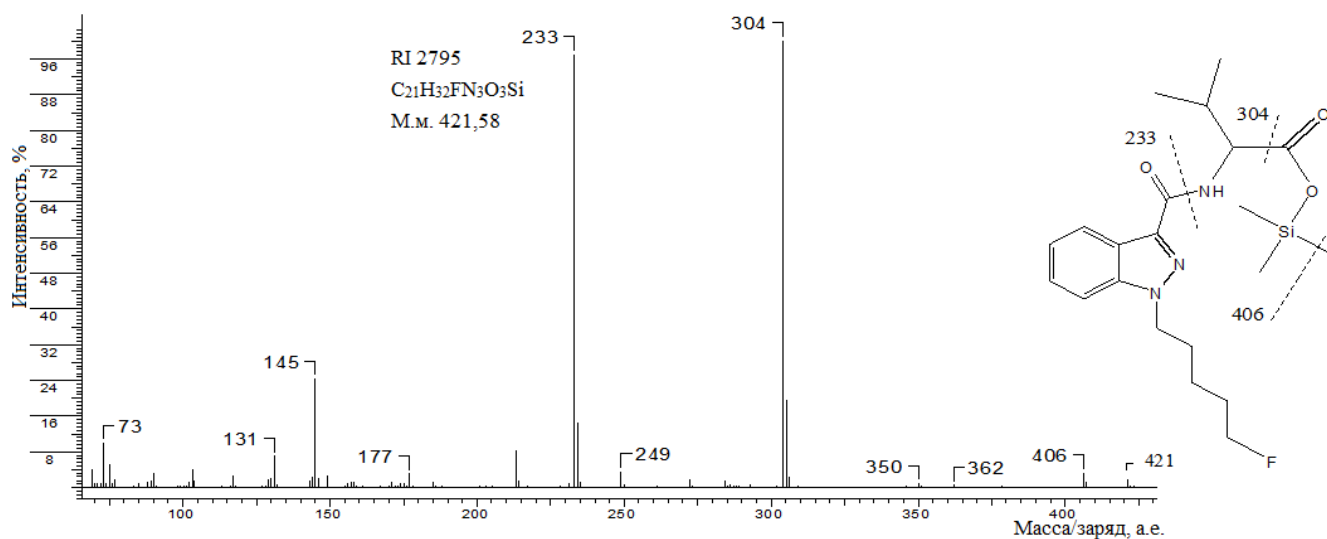


Рисунок 4.58 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита M1

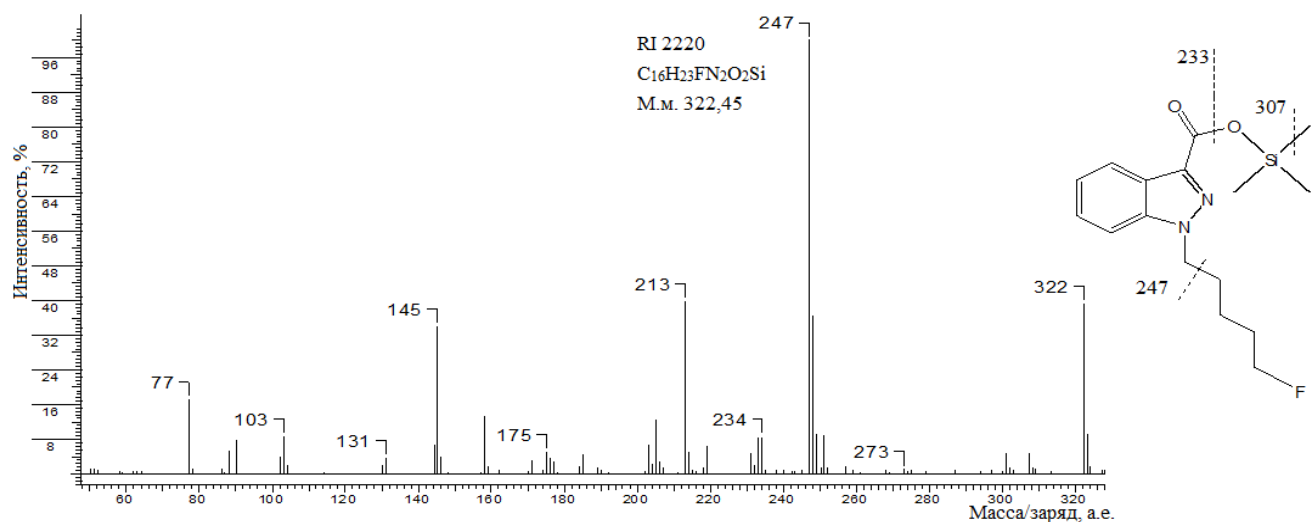


Рисунок 4.59 – Масс-спектр, структура и характеристики триметилсилилового эфира метаболита M2

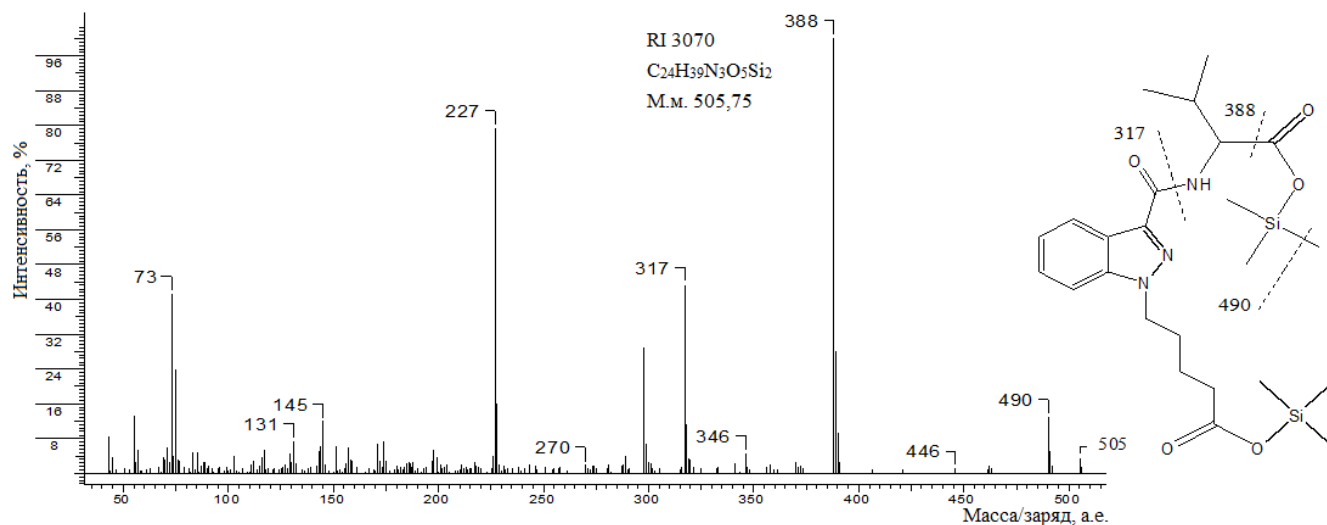


Рисунок 4.60 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита M3

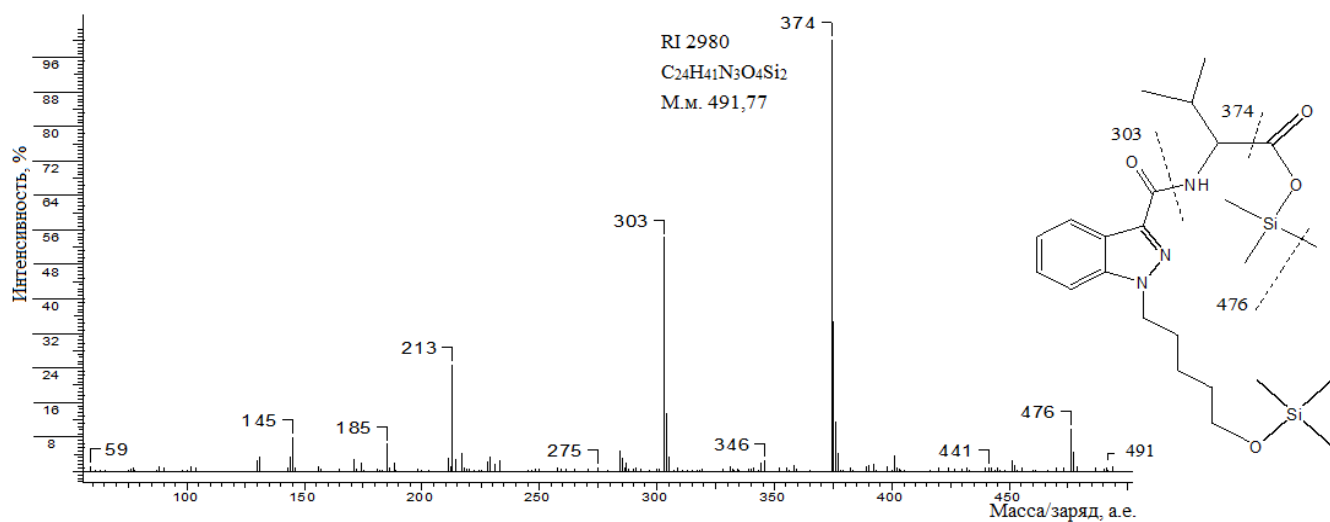


Рисунок 4.61 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита М5

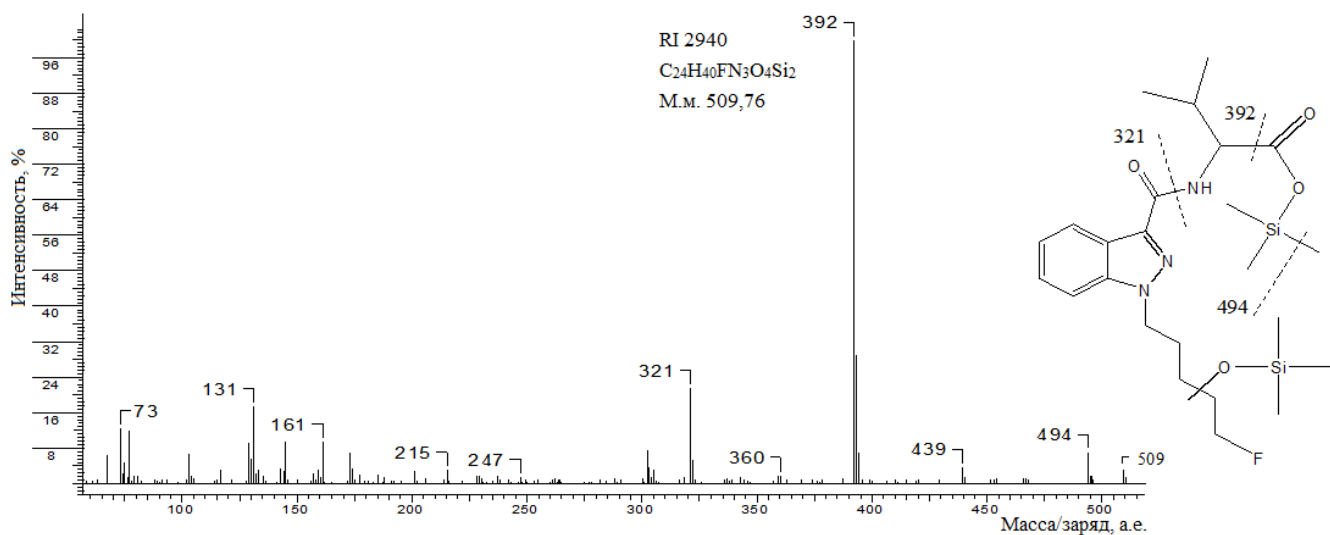


Рисунок 4.62 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита М6.1

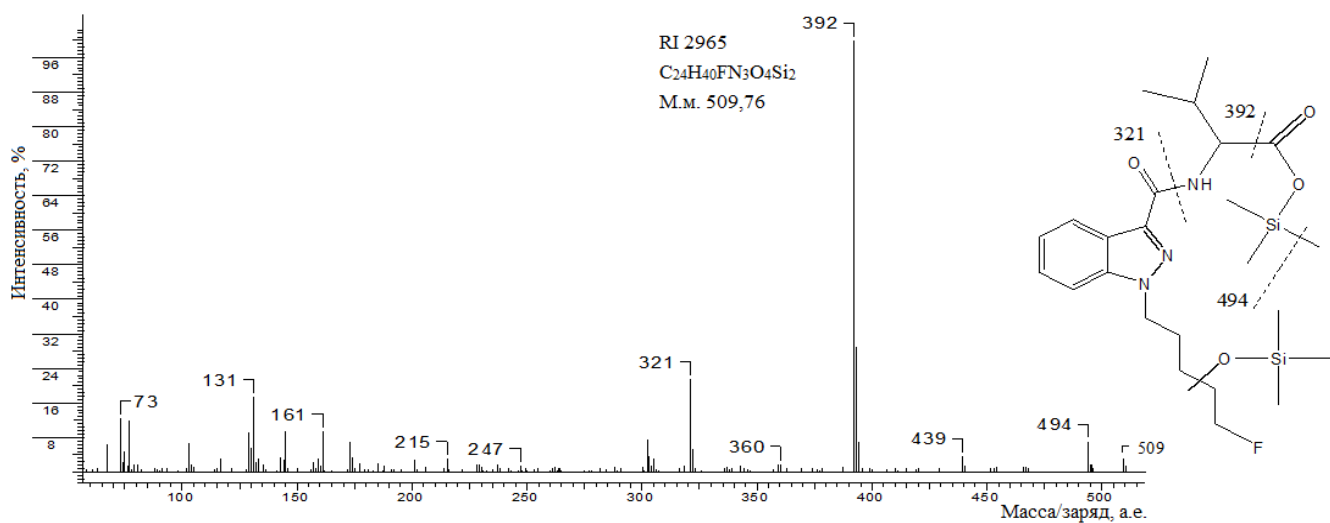


Рисунок 4.63 – Масс-спектр, структура и характеристики бис-триметилсилилового эфира метаболита М6.2

На рисунках 4.64 и 4.65 приведены предполагаемые структуры ионов, образующихся при масс-фрагментации метиловых эфиров метаболитов M1 и M4, соответственно.

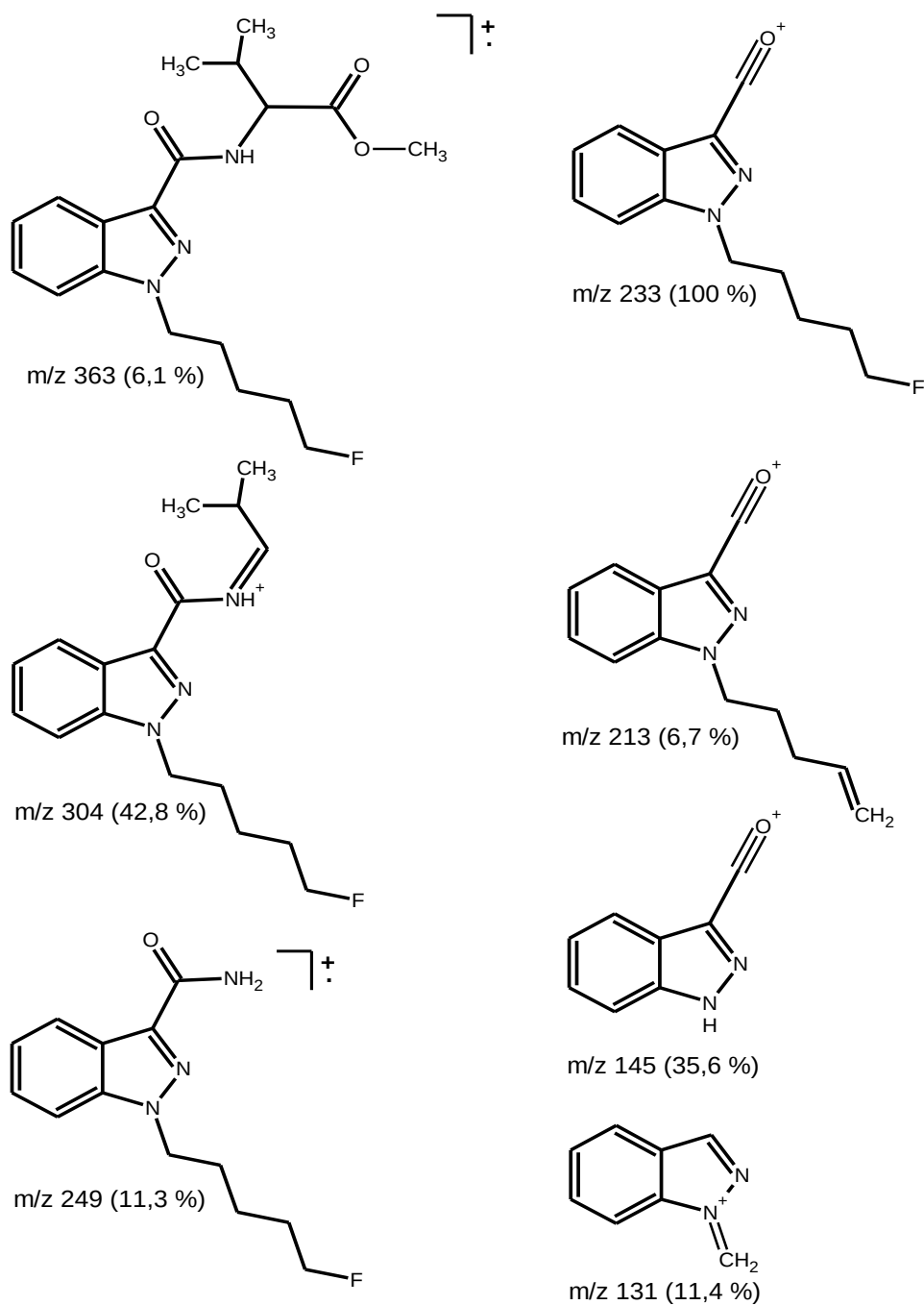


Рисунок 4.64 – Предполагаемые структурные формулы ионов, образующихся при масс-фрагментации метил-N-{[1-(5- фторпентил)-1H-индазол-3-ил]карбонил}валината

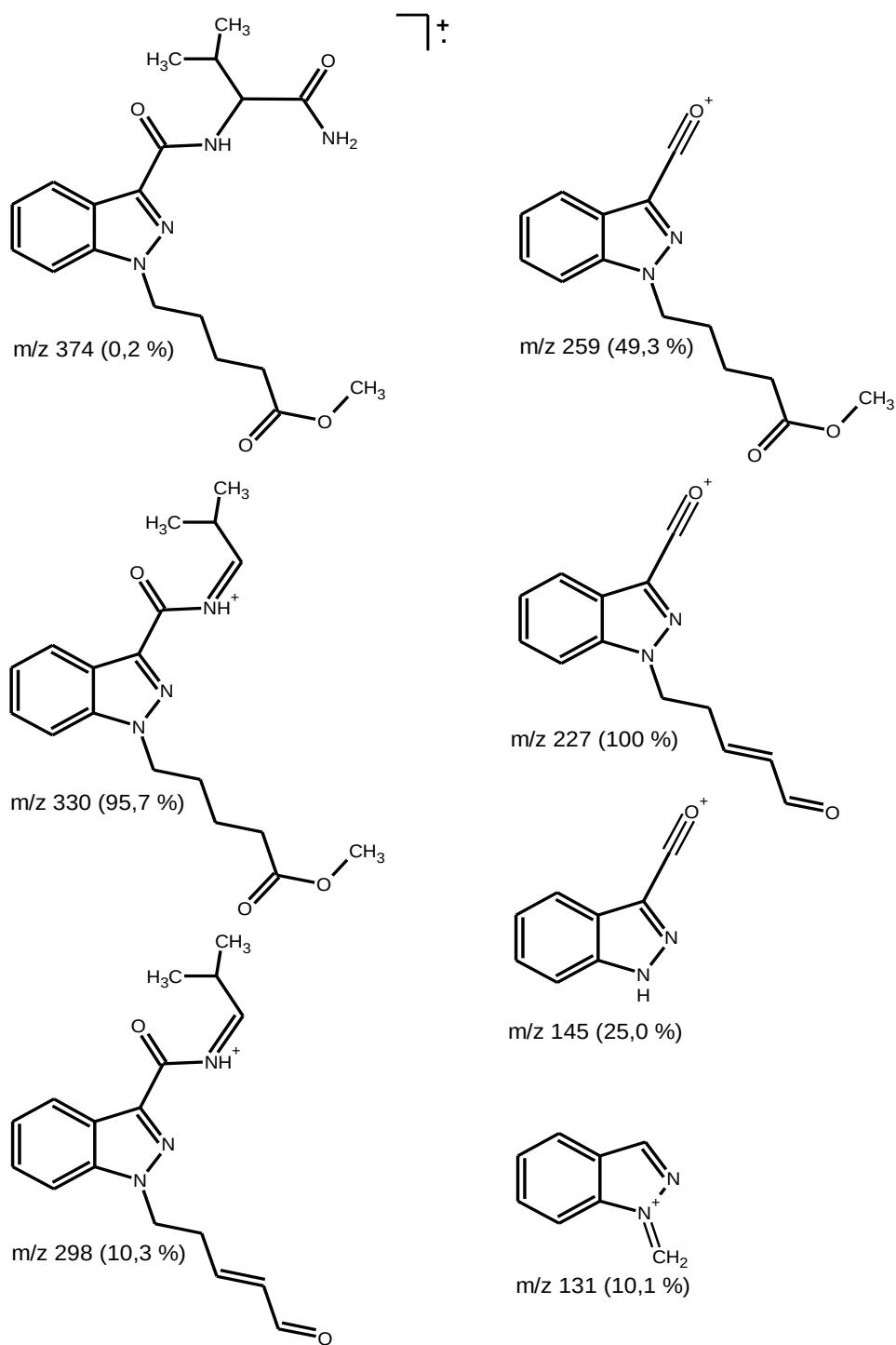


Рисунок 4.65 – Предполагаемые структурные формулы ионов, образующихся при масс-фрагментации метилового эфира 3-[N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-амино]-карбонил}-1H-индазол-1-пентановой кислоты

В масс-спектрах всех приведенных соединений наблюдаются пики молекулярных ионов. Для дериватов метаболитов, образованных гидролизом

концевой амидной связи (M1-M3, M5-M7), имеются общие направления фрагментации, приводящие к формированию ионов $[M-59]^+$ и $[M-130]^+$ для метилатов и $[M-117]^+$ и $[M-188]^+$ – для триметилсиликатов. Они образуются при последовательной фрагментации боковой цепи в 3-м положении индазольного цикла. В случае метаболита M4, в структуре которого сохранена амидная группа, величины m/z этих ионов соответствуют $[M-44]^+$ и $[M-115]^+$. Ион с m/z 227 в спектре M4 образуется при элиминировании метанола от боковой цепи.

Общие характеристические ионы для метаболитов M1-M6 с величинами m/z 131, 145 и 174 представлены на рисунке 4.66. Для диметилового эфира метаболита M7, гидроксильированного по индазольному циклу, в спектре наблюдаются ионы с величинами m/z 161 и 175, при этом ионы с величинами m/z 131 и 145 отсутствуют.

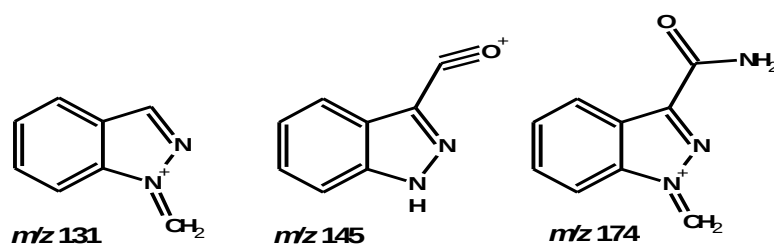


Рисунок 4.66 – Характеристические ионы, свойственные масс-фрагментации метаболитов 5F-AB-PINACA

Расчеты физико-химических констант логарифма коэффициента распределения октанол-вода (LogP) и коэффициента адсорбции (K_{OC}), результаты определения степени конъюгирования, относительное содержание в исследованных образцах мочи каннабимиметика 5F-AB-PINACA и его метаболитов M1-M7 приведены в таблице 4.5.

Все идентифицированные метаболиты 5F-AB-PINACA были обнаружены в элюате I.

Таблица 4.5 – Характеристика каннабимиметика 5F-AB-PINACA и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение; Md – медиана)

Соединение	Log P	K _{oc} (pH = 4.8)	Конъюгирование		Относительное содержание*		
			n	Md, %	Интервал (n = 9), %	n	Md, %
5F-AB-PINACA	2,23	386,44	9	н.д.	н.д.	-	-
M1	2,40	18,64	5	65	100	-	-
M2	2,75	43,34	4	88	0,79-13,49	12	2,86
M3	1,32	2,11	4	0	0,15-56,30	9	6,17
M4	1,15	43,84	2	0	0,84-261,74	4	89,96
M5	1,17	4,00	н.о.	н.д.	0,37-4,96	2	2,67
M6	0,95	3,03	4	55	0,39-18,08	10	3,18
M7	1,66	6,58	2	100	0,09-0,27	2	0,18

*Содержание M1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков характеристических ионов в масс-спектрах метаболитов

н.д. – не детектируется, н.о. – не определяли.

Исследование пяти образцов мочи потребителей каннабимиметиков 5F-AB-PINACA показало, что некоторые метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: M1 на 38-82% (медиана 65%), M2 на 7-100% (медиана 88%), M3 на 0-27% (медиана 0%), M6 на 1-73% (медиана 55%). Метаболиты M4 обнаруживали полностью в свободной форме, а для M7 конъюгация составила 100%. Высокая степень конъюгирования маркеров каннабимиметиков требует проведения гидролиза перед их анализом. Применение ферментативного гидролиза предпочтительно при подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов 5F-AB-PINACA.

В исследованных образцах мочи неизмененный каннабимиметик 5F-AB-PINACA обнаружен не был. Основным метаболитом каннабимиметика 5F-AB-PINACA, определяющимся в моче, является M1, как продукт гидролиза концевой

амидной связи 5F-AB-PINACA. В силу его выраженного характера в исследованных объектах, метаболит M1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика 5F-AB-PINACA [402, 407].

Метаболит M3 каннабимиметика 5F-AB-PINACA в ряде случаев также выявлялся нами при исследовании образцов мочи лиц, употреблявших каннабимиметик AB-PINACA. Это указывает на образование некоторых общих продуктов биотрансформации для двух выше названных соединений. Метаболит M4, обнаруженный в 4 из 12 проб мочи, сохранил в своей структуре концевую амидную группу. Прочие метаболиты 5F-AB-PINACA не имеют диагностического значения.

Учитывая появление новых видов каннабимиметиков ряда индазол-3-карбоксамидов, имеющих вместо концевой амидной группы метоксигруппу (5F-AMB), совместное обнаружение метаболитов M1 и M4 может являться диагностическим показателем использования синтетического каннабимиметика 5F-AB-PINACA. При отсутствии в образце мочи метаболита M4, являющегося маркером употребления 5F-AB-PINACA, и обнаружении других описанных метаболитов, однозначного заключения об употреблении 5F-AB-PINACA дать нельзя. Так как большинство метаболитов 5F-AB-PINACA будет наблюдаться и при приеме 5F-AMB.

4.2.3 Основные метаболиты и маркеры AB-CHMINACA

Структуры основных метаболитов AB-CHMINACA, представленных на рисунке 4.67, определяли на основании интерпретации масс-спектров пиков их метилированных, триметилсилильных и смешанных дериватов, идентифицированных в пробах мочи потребителей курительных смесей с учетом особенностей масс-фрагментации исходного AB-CHMINACA.

На рисунках 4.68 – 4.75 приведены полученные масс-спектры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и предложенные

нами структуры каннабимиметика АВ-CHMINACA и производных метаболитов M1-M3 каннабимиметика АВ-CHMINACA.

Основным путем биотрансформации у АВ-CHMINACA, по аналогии с АВ-PINACA и АВ-FUBINACA, является гидролиз концевой амидной связи с образованием метаболитов, структура которых содержит карбоксильную группу [405, 408].

Наблюдается также гидролиз амидной связи карбамоильной группы в положении 3 индазольного фрагмента (метаболит M2).

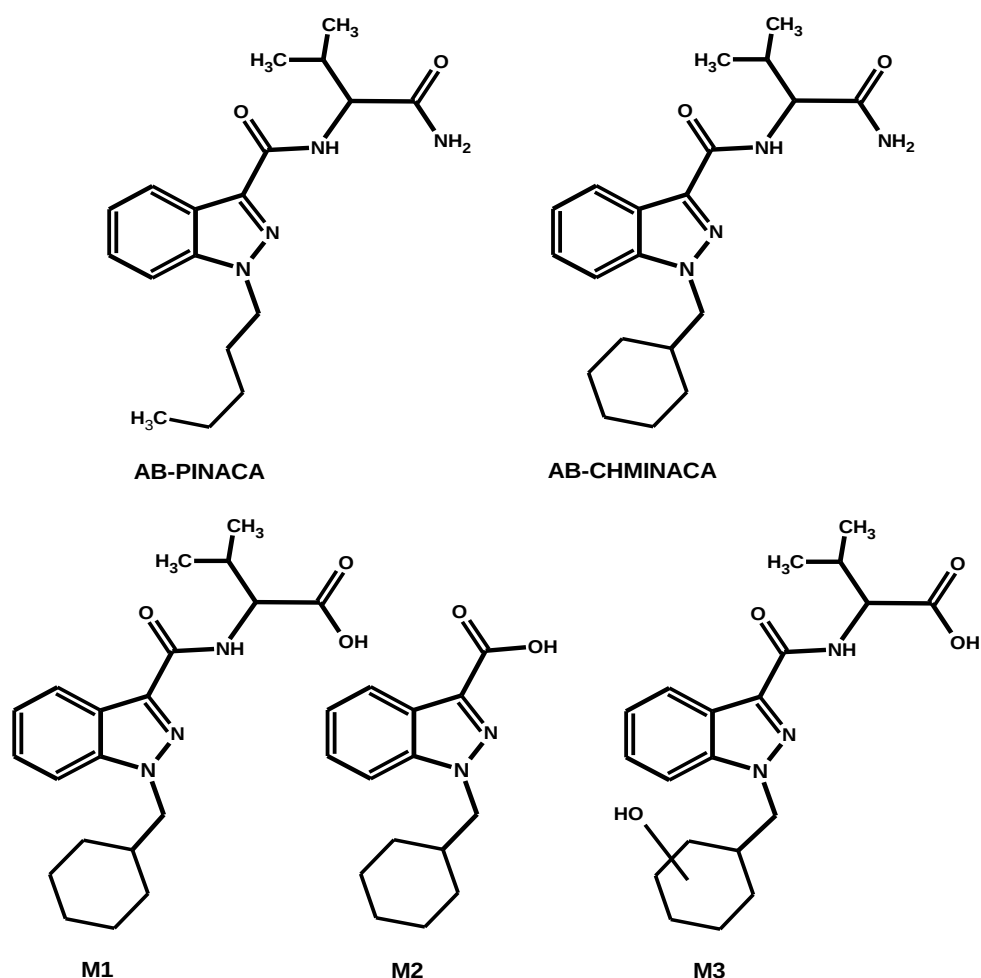


Рисунок 4.67 – Химические структуры каннабимиметиков АВ-PINACA, АВ-CHMINACA и основных предполагаемых метаболитов АВ-CHMINACA (M1–M3)

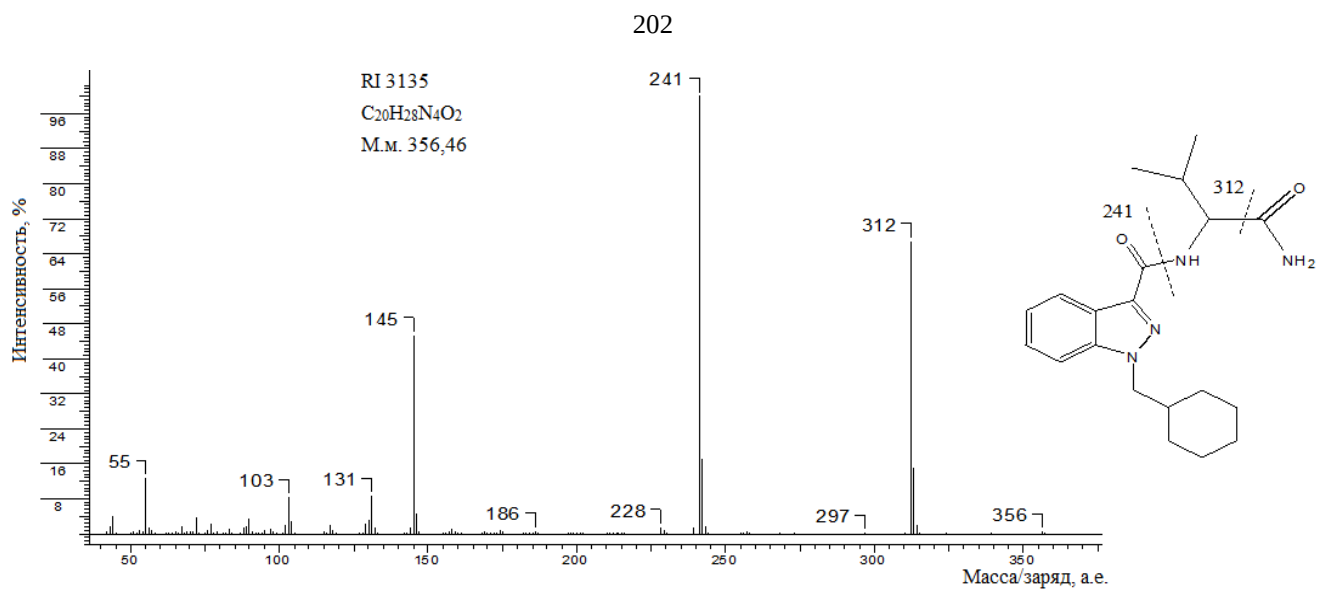


Рисунок 4.68 – Масс-спектр, структура и характеристики каннабимиметика АВ-CHMINACA

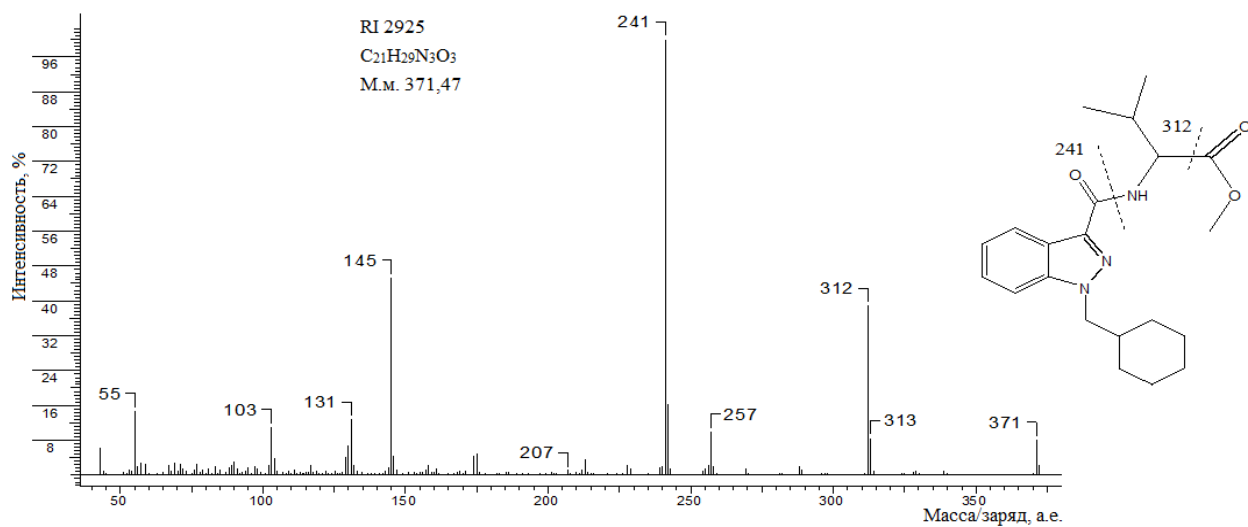


Рисунок 4.69 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М1 каннабимиметика АВ-CHMINACA

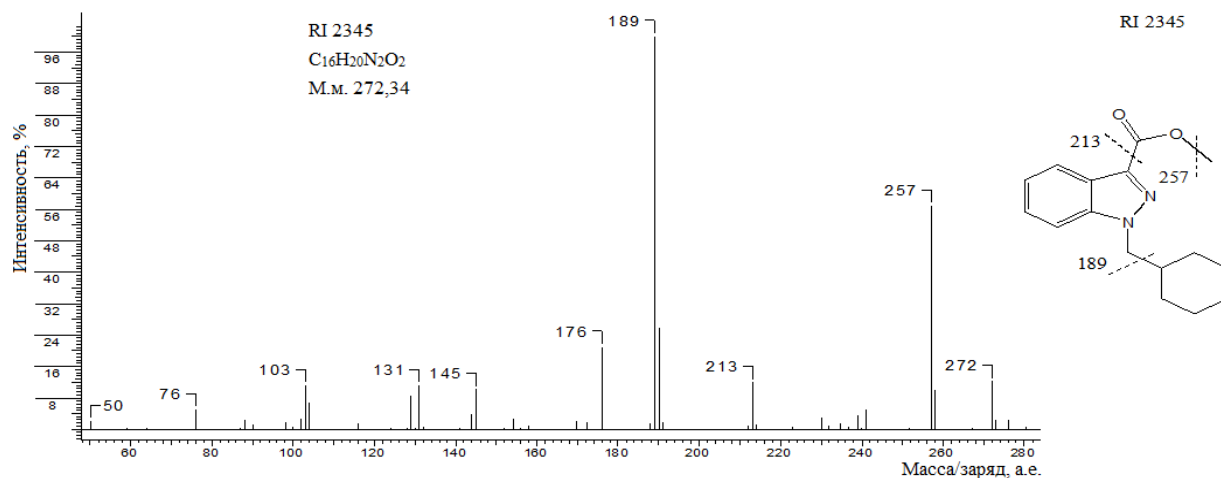


Рисунок 4.70 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М2 каннабимиметика АВ-CHMINACA

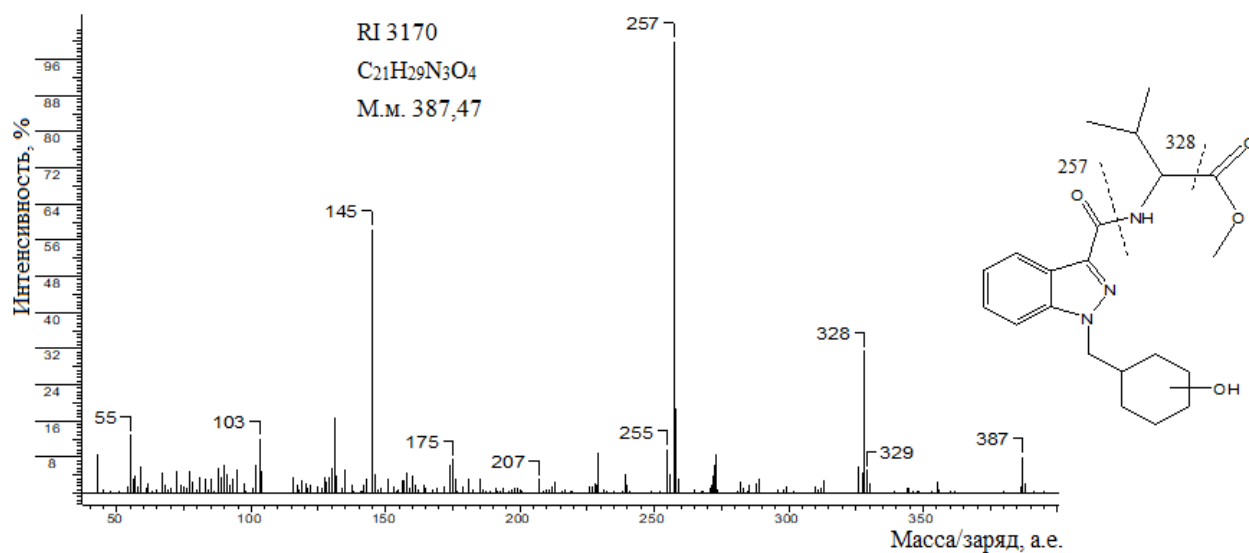


Рисунок 4.71 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-CHMINACA

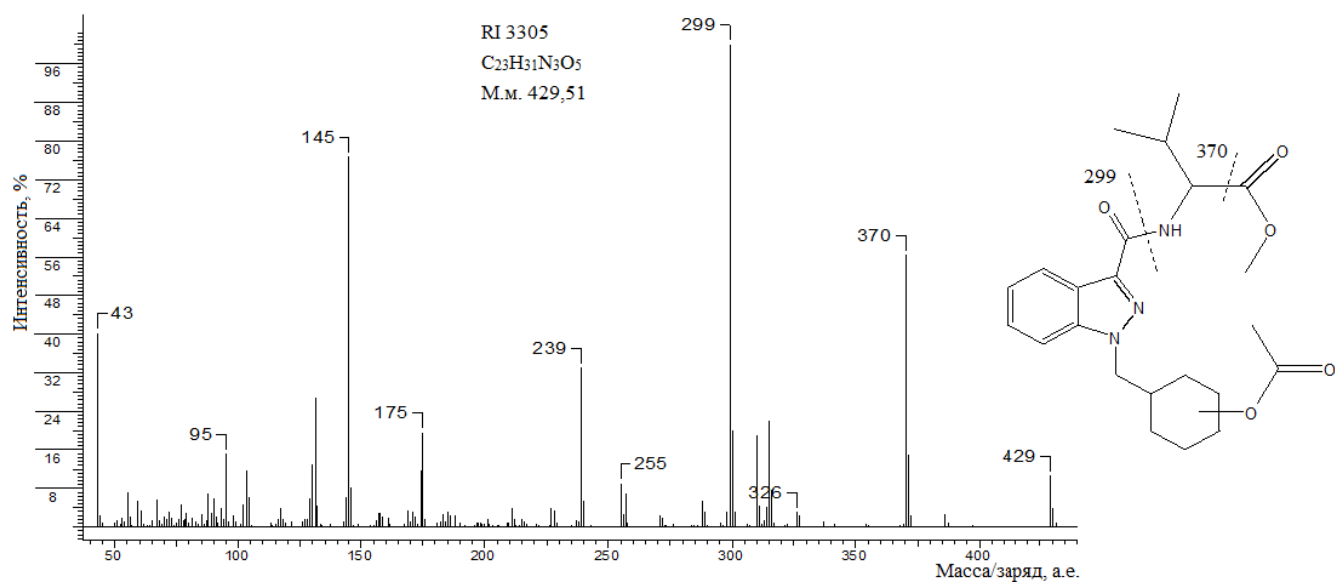


Рисунок 4.72 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-CHMINACA после ацетилирования

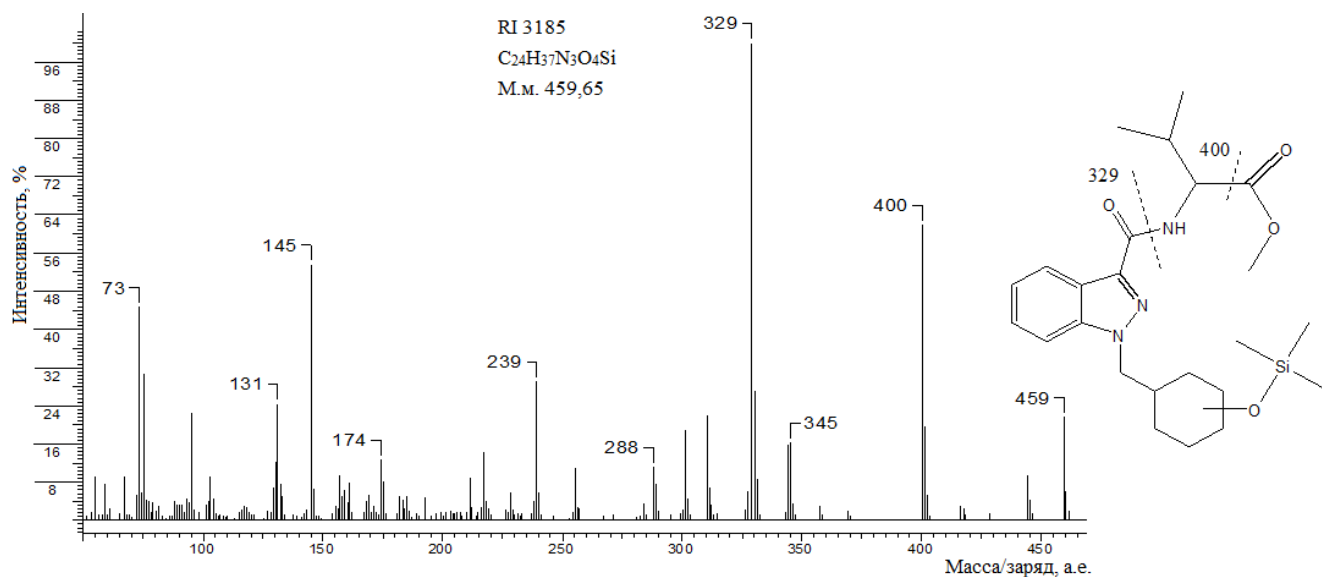


Рисунок 4.73 – Масс-спектр, структура и характеристики смешанного метилового и триметилсилилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-CHMINACA

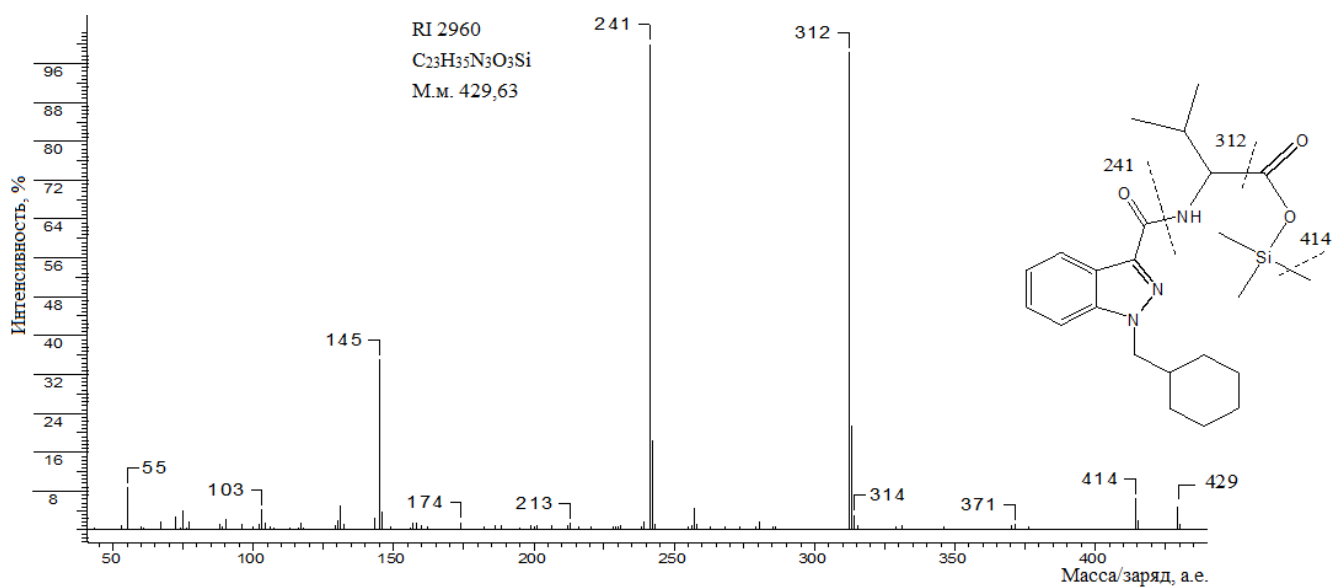


Рисунок 4.74 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира метаболита М1 каннабимиметика АВ-CHMINACA

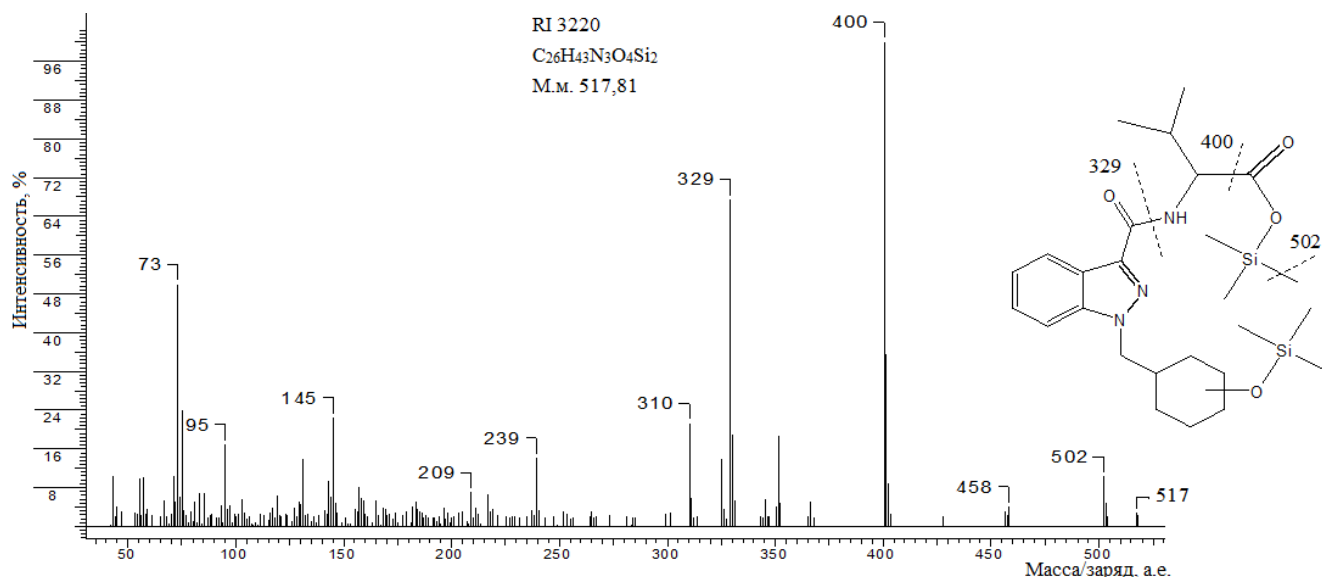


Рисунок 4.75 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура бис-триметилсилилового эфира метаболита М3 каннабимиметика АВ-CHMINACA

Для всех идентифицированных соединений в масс-спектрах наблюдается пик молекулярного иона, а также характерные для эфиров метаболитов, образованных карбоксильной связью, фрагменты: $[M-59]^+$ – для метиловых эфиров и $[M-117]^+$ – для триметилсилильных дериватов.

Результаты расчета некоторых физико-химических констант АВ-CHMINACA и его метаболитов, влияющих на поведение их в организме и на выбор условий их извлечения из мочи, приведены в таблице 4.6.

Расчеты LogP и K_{oc} показывают, что липофильность неизмененного соединения и метаболитов M1, M2 достаточно высока, что по видимому, объясняет выведение АВ-CHMINACA с мочой, в основном, в виде метаболитов и высокий уровень конъюгации метаболитов. Поэтому применение гидролиза является важной стадией в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-CHMINACA.

Исследование трех образцов мочи потребителей каннабимиметиков АВ-CHMINACA показало, что основные метаболиты выводятся частично в конъюгированном виде: M1 на 78-91% (медиана 88%), M2 на 91-100% (медиана 91%), M3 на 22-57% (медиана 49%).

Таблица 4.6 – Характеристика каннабимиметика АВ-CHMINACA и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение)

Соединение	LogP	K _{oc} (pH = 4.8)	n	Конъюгирование, %	Относительное содержание*, %
АВ-CHMINACA	3,47	1831,49	3	н.д.	н.д.
M1	3,64	88,46	3	78-91	100
M2	4,00	207,37	3	91-100	13-57
M3	1,84	9,23	3	22-57	13-47

*Содержание M1 принято за 100%, значение прочих метаболитов рассчитывали по соотношению площади характеристических ионов, имеющих интенсивность 100% в масс-спектре метаболитов

н.д. – не детектируется

В исследованных образцах мочи неизмененный каннабимиметик АВ-CHMINACA обнаружен не был. Все описанные метаболиты АВ-CHMINACA были определены в элюате I.

Из относительного содержания метаболитов в моче следует, что основной путь биотрансформации АВ-CHMINACA в организме человека – гидролиз концевой амидной связи с образованием метаболита M1 и дальнейшей конъюгации с глюкуроновой кислотой. Поэтому метаболит M1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-CHMINACA [409].

4.2.4 Основные метаболиты и маркеры АВ-FUBINACA

Каннабимиметик АВ-FUBINACA – *N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-карбоновой кислоты амид структурно близок к другому каннабимиметику АВ-PINACA, метаболиты которого описаны в работе [405]. Отличительным в структуре двух этих каннабимиметиков является заместитель у атома азота 1 в индазольном фрагменте (рисунок 4.76).

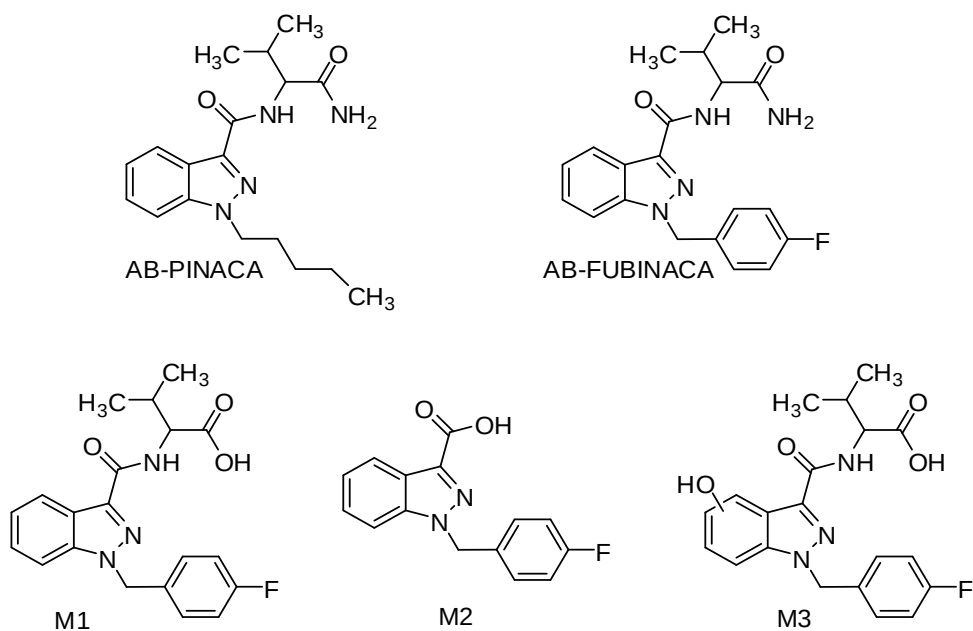


Рисунок 4.76 – Химические структуры каннабимиметиков AB-PINACA, AB-FUBINACA и основных предполагаемых метаболитов AB-FUBINACA (M1–M3)

Структуры предполагаемых метаболитов AB-FUBINACA, представленных на рисунке 4.76, определяли на основании интерпретации масс-спектров пиков их метилированных и триметилсилильных производных, обнаруженных в пробах мочи потребителей курительных смесей с учетом масс-фрагментации нативного AB-FUBINACA [327]. Полученные данные согласуются с данными работы [330] в отношении метаболитов M1 и M3.

На рисунках 4.77–4.81 приведены предложенные нами структуры, рассчитанные индексы удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы и полученные масс-спектры метильных и триметилсилильных производных основных метаболитов AB-FUBINACA. Основным путем биотрансформации у AB-FUBINACA, как и у AB-PINACA, является гидролиз концевой амидной связи до образования карбоксильной группы. Наблюдается также гидролиз амидной связи карбамоильной группы в положении 3 индазольного фрагмента (метаболит M2).

В спектрах всех идентифицированных соединений наблюдается молекулярный ион, а также характерные для сложных эфиров, пики ионов с m/z

$[M-59]^+$ и $[M-117]^+$ для метиловых эфиров и для триметилсилильных дериватов, соответственно.

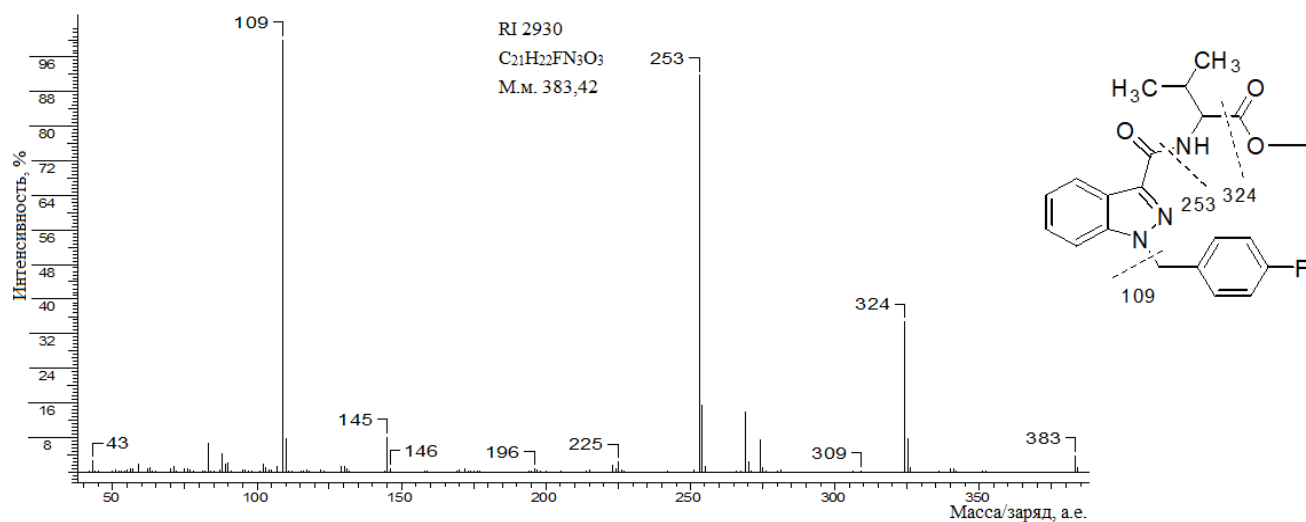


Рисунок 4.77 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира M1 каннабимиметика AB-FUBINACA

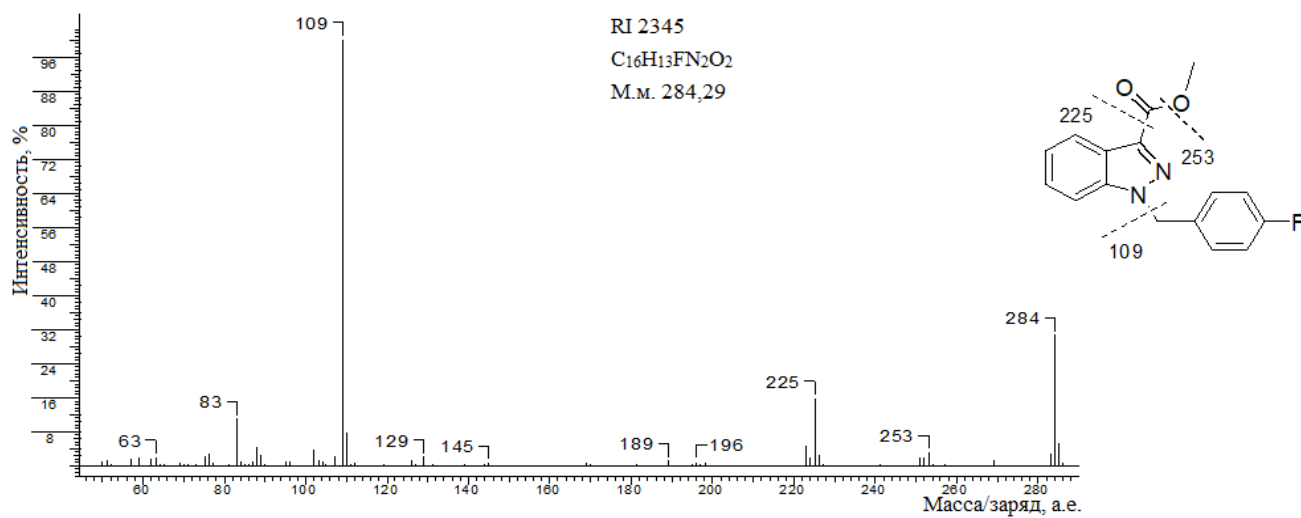


Рисунок 4.78 – Масс-спектр, структура и характеристики метилового эфира M2 каннабимиметика AB-FUBINACA

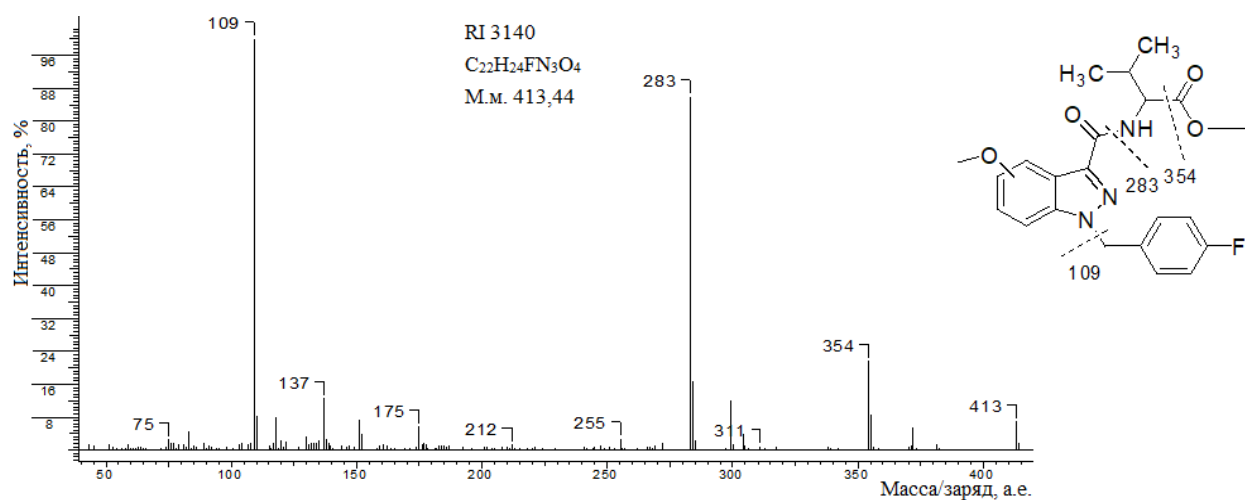


Рисунок 4.79 – Масс-спектр, структура и характеристики диметилового эфира М3 каннабимиметика АВ-FUBINACA

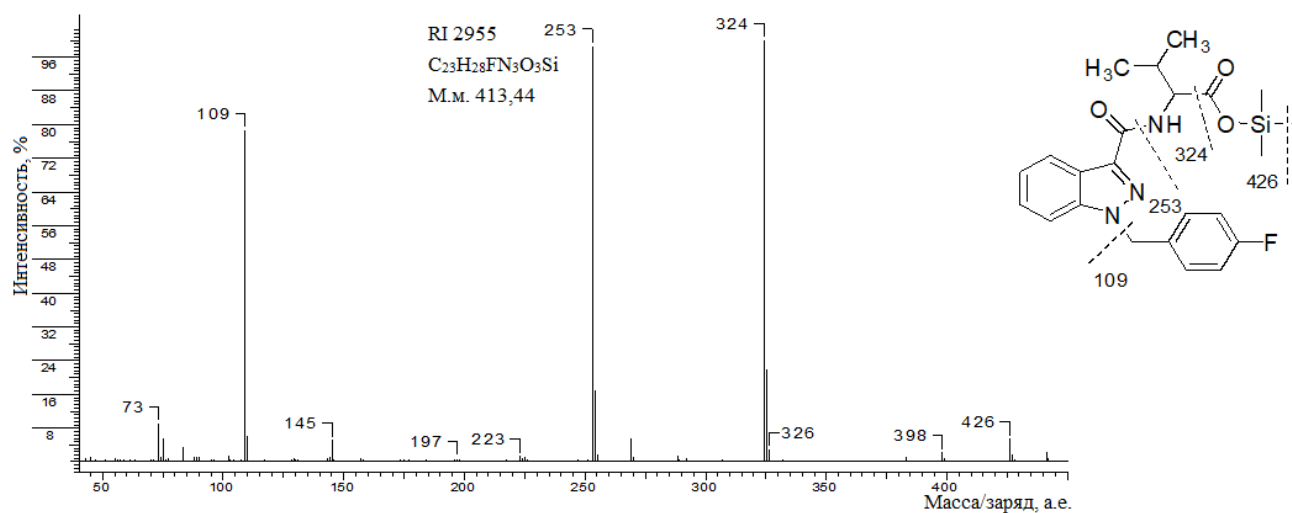


Рисунок 4.80 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира М1 каннабимиметика АВ-FUBINACA

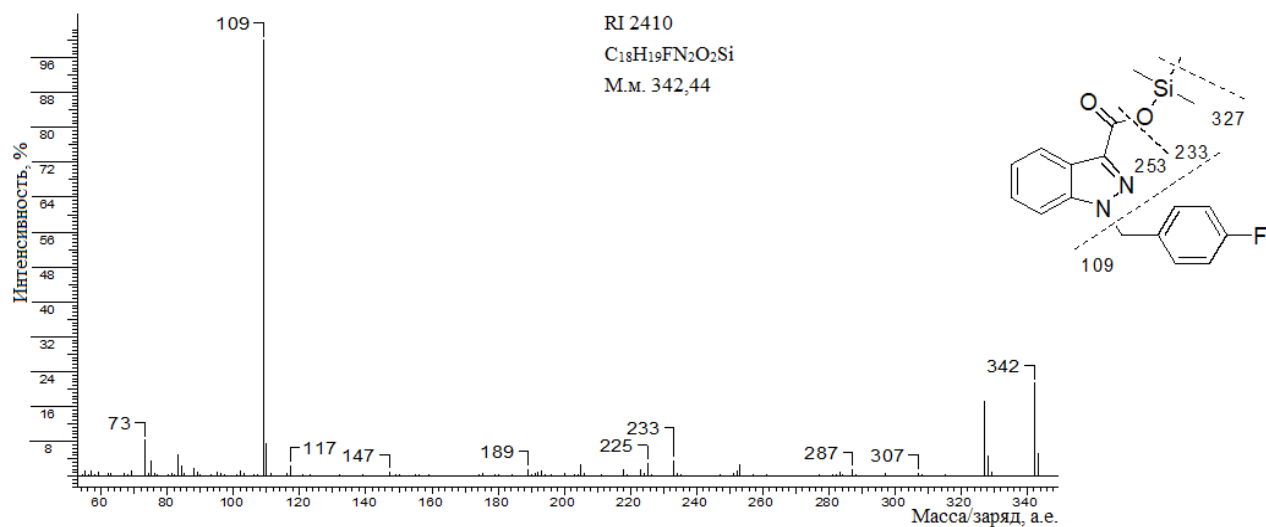


Рисунок 4.81 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилилового эфира М2 каннабимиметика АВ-FUBINACA

Получение триметилсилильных эфиров метаболита М1 частично сопровождается образованием бис-триметилсилильных производных вследствие замещения водорода амидного атома азота на триметилсилильную группу.

Для подтверждения структуры основного метаболита М1 и представления схемы его фрагментации под действием электронного удара был использован метод ГХ-МС/МС. Для характеристических ионов с m/z 324 и 253, которые наблюдаются в спектрах триметилсилильного производного М1 и нативного АВ-FUBINACA, изъятых из нелегального оборота и идентифицированного по библиотеке масс-спектров SWGDRUG [410], получены спектры ионов-продуктов при энергии соударительной диссоциации 10 эВ (рисунки 4.82 и 4.83).

Как видно из рисунков 4.82 и 4.83, спектры ионов-продуктов для исходного АВ-FUBINACA и триметилсилильного производного М1 полностью совпадают, что говорит о том, что в молекулах этих веществ присутствуют одинаковые структурные фрагменты.

На основании полученных данных составлена схема фрагментации (под действием электронного удара) метилового эфира основного метаболита АВ-FUBINACA – N -[1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-ил}карбонил]валина (рисунок 4.84).

Общий характеристический ион с m/z 109 наблюдается в спектре неизмененного АВ-FUBINACA и его основных метаболитов. Он образуется при разрыве связи между индазольным и фторбензильным фрагментами и имеет, как правило, максимальную интенсивность в масс-спектре электронного удара.

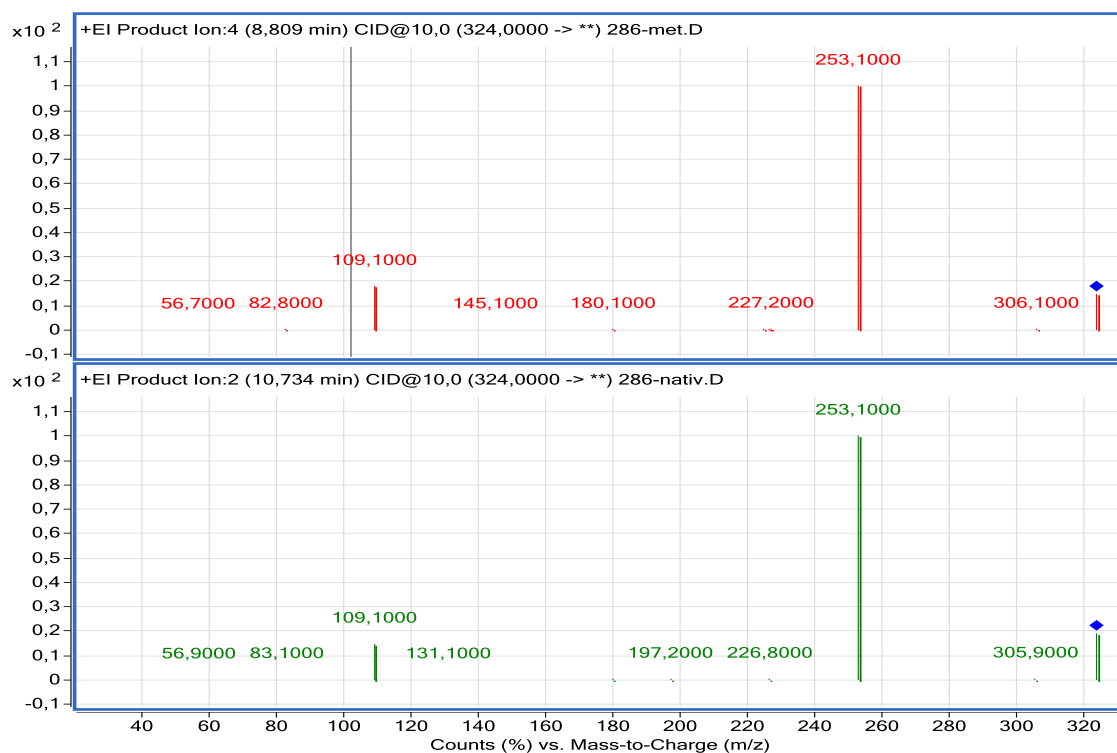


Рисунок 4.82 – Спектры ионов-продуктов для прекурсора с m/z 324. Метилвый эфир M1 (сверху), исходный каннабимиметик АВ-FUBINACA (снизу). Энергия соударений 10 эВ



Рисунок 4.83 – Спектры ионов-продуктов для прекурсора с m/z 253. Метилвый эфир M1 (сверху), исходный каннабимиметик АВ-FUBINACA (снизу). Энергия соударений 10 эВ

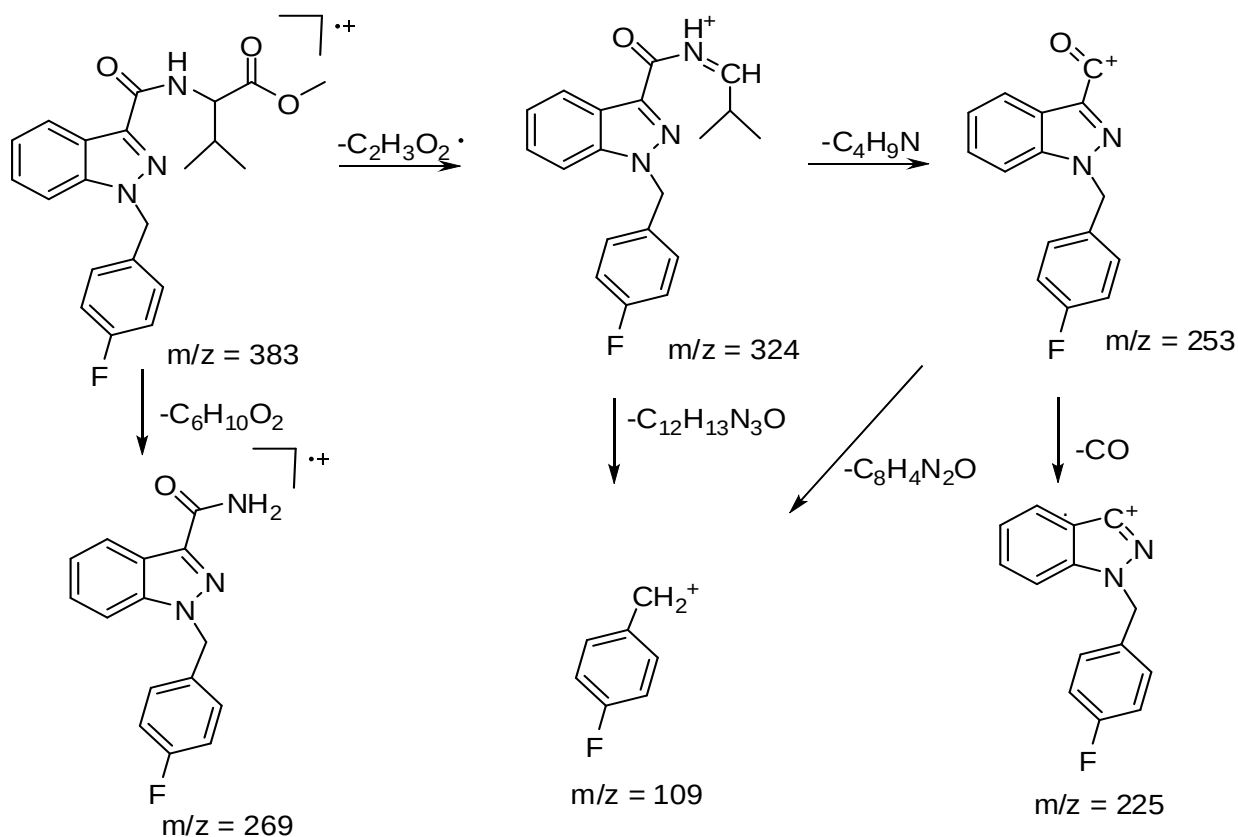


Рисунок 4.84 – Масс-фрагментация метилового эфира *N*-[{1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-ил} карбонил]Валина

Результаты расчета некоторых физико-химических констант АВ-FUBINACA и его метаболитов, влияющих на поведение их в организме и на выбор условий их извлечения из биожидкости, приведены в таблице 4.7.

Расчеты физико-химических констант LogP и K_{OC} показывают, что липофильность нативного соединения и основных метаболитов достаточно высока, что объясняет выведение АВ-FUBINACA с мочой, в основном, в виде метаболитов и высокий уровень их конъюгирования. Поэтому применение гидролиза является важной стадией в подготовке образцов мочи с целью выявления метаболитов АВ-FUBINACA.

В исследованных образцах мочи неизмененный каннабимиметик АВ-FUBINACA обнаружен не был. Все описанные метаболиты АВ-FUBINACA были определены в элюате I.

Таблица 4.7 – Некоторые характеристики каннабимиметика АВ-FUBINACA и его основных метаболитов (n-число образцов, где было найдено соединение; Md - медиана)

Соединение	LogP	Кос (pH = 4,8)	n	Конъюгирование, % (Md, %)	Относительное содержание*, % (Md, %)
АВ- FUBINACA	2,63	646	5	н.д.	н.д.
М1	2,81	30	5	18-96 (88)	100
М2	3,16	63	4	67-100 (89)	3-91 (13)
М3	2,07	10	2	74-77 (75,5)	0,6-2,3 (1,5)

* Содержание М1 принято за 100 %, содержание других метаболитов рассчитывали по соотношению площади пиков иона 109 в масс-спектре
н.д. – не детектируется

Из относительного содержания метаболитов в моче следует, что основной путь биотрансформации АВ-FUBINACA в организме человека – гидролиз концевой амидной связи с образованием метаболита М1 и дальнейшей конъюгации с глюкуроновой кислотой. Поэтому метаболит М1 может использоваться в качестве маркера употребления каннабимиметика АВ-FUBINACA. Метаболит М2 также фиксируется в моче в заметных количествах и может использоваться для подтверждения употребления данного каннабимиметика [408].

Таким образом, характерной особенностью каннабимиметиков группы индазола, производных амида валина, является гидролиз концевой амидной группы в организме человека при биотрансформации. Это приводит к образованию соответствующих каннабимиметичеких метаболитов, содержащих карбоксильную группу, которые могут использоваться как маркеры для выявления употребления веществ данной группы [403-409].

Общая схема образования маркеров СК из АВ-PINACA, 5F-AB-PINACA, АВ-FUBINACA, АВ-CHMINACA представлена на рисунке 4.85.

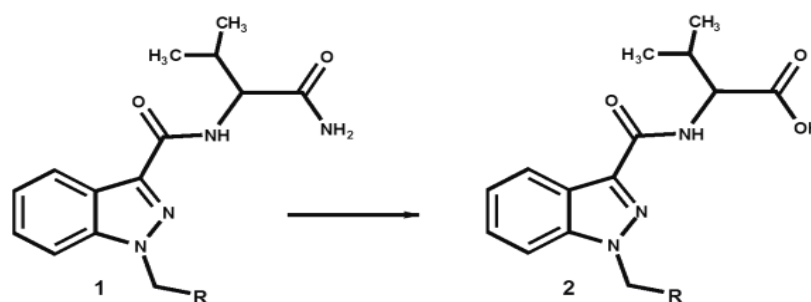


Рисунок 4.85 – Структурные формулы каннабимиметиков АВ-PINACA (R= *n*-бутил), 5F-AB-PINACA (R= 4-фтор-*n*-бутил), АВ-FUBINACA (R = 4-фторфенил) , АВ-CHMINACA (R = циклогексил) (1) и их маркеров (2)

4.3 Сравнение методов совместного обнаружения маркеров синтетических и природных каннабиноидов при варьировании способов деконъюгирования, экстракции и дериватизации

Учитывая использование в практике химико-токсикологических и судебно-химических исследований различных методов пробоподготовки мочи с целью определения природных и синтетических каннабиноидов, было изучено применение двух распространенных методов в сравнении с разработанным методом ТФЭ в сочетании с ферментативным гидролизом.

Как показала практика применения модифицированного метода определения каннабиноидов, в ряде случаев, наряду с ТГК, в реальных пробах мочи обнаружены в виде метиловых эфиров и маркеры СК.

Методики определения классических каннабиноидов (метод 1), синтетических каннабимиметиков (метод 2), скрининга с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ (метод 3) приведены в п. 2.3.

Получение метильных и ацетильных дериватов природных каннабиноидов и синтетических каннабимиметиков приведено в п. 2.5.

Режим работы газового хроматографа Agilent 7820 с моноквадропольным детектором Agilent 5975 приведен в п. 2.6.

Регистрация масс-спектров для ацетильных и метильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 150 - 400 а.е.

Оценку содержания исследуемых соединений проводили по оценке площади ионов с величиной m/z : 245 – для диметилового эфира 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты, 159 – для диметильного производного N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валина, 215 – для метилового эфира N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валина, относительно площади иона с величиной m/z 149 стандарта – динонилфталата.

На рисунке 4.86 приведены химические структуры изученных в отношении различных методов пробоподготовки соединений.

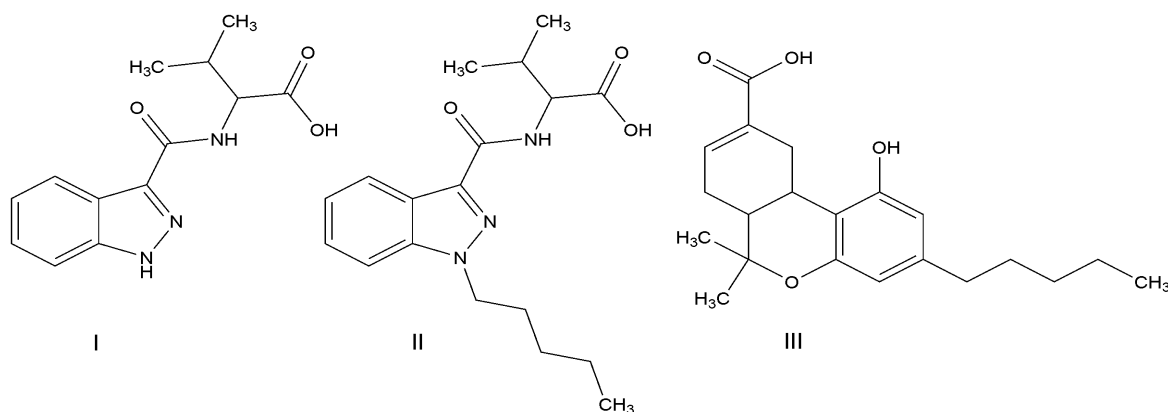


Рисунок 4.86 – Химические структуры: I – N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин (нор-AB-PINACA M1), II – N-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин (AB-PINACA M1), III – 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота (Δ^8 -ТГК-СООН)

N-[(1-Пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин (AB-PINACA M1) и N-(1*H*-индазол-3-илкарбонил)валин (нор-AB-PINACA M1) являются метаболитами синтетического каннабимиметика N-(1-карбамоил-2-метилпропил)-1-пентил-1*H*-индазол-3-карбоксамид (AB-PINACA) [407]. Нор-AB-PINACA M1 образуется вследствие N-деалкилирования метаболита AB-PINACA M1, который для группы каннабимиметиков AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA является общим. 11-Нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая

кислота (Δ^8 -ТГК-СООН) использовалась как аналог маркера употребления Δ^9 -тетрагидроканнабинола.

Результаты оценки выхода целевых аналитов для трех методов приведены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Эффективность экстракции маркеров природных и синтетических каннабиноидов при сравнении методов пробоподготовки мочи, %

Метод	Эффективность экстракции, % (n=5, RSD, %)		
	нор-АВ-PINACA M1	АВ-PINACA M1	Δ^8 -ТГК-СООН
1. (ТГК к-та)	7,6 ± 17,9	95,2 ± 14,3	95,5 ± 8,3
2. (СК)	22,1 ± 10,7	55,0 ± 7,8	34,6 ± 8,3
3. (ТФЭ)	13,0 ± 27	102,3 ± 10	60,3 ± 16

Метод 1 был разработан для определения 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиварин-9-карбоновой и 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислот в моче потребителей каннабиса [411], в дальнейшем была показана возможность применения данного метода для совместного скрининга мочи на метаболиты природных и синтетических каннабиноидов [397, 402]. Выходы АВ-PINACA M1 и Δ^8 -ТГК-СООН имеют значения близкие к 100 %, в то время как у метаболита нор-АВ-PINACA M1 - менее 10 %. Последнее обусловлено гидрофильными свойствами нор-АВ-PINACA M1 (Таблица 4.9).

Метод 2 в различных модификациях традиционно широко применяется для определения метаболитов каннабиноидов как природного, так и синтетического характера. Метод показал самый высокий выход для нор-АВ-PINACA M1 и самые низкие выходы для АВ-PINACA M1 и Δ^8 -ТГК-СООН. Для двух последних аналитов это связано с высокой липофильностью, потери веществ могут быть обусловлены адгезией на поверхности используемой посуды.

Метод 3 применяется для скрининга наркотических и лекарственных веществ в моче с применением ТФЭ. Значения величин выхода для АВ-PINACA M1 и Δ^8 -ТГК-СООН можно оценить как значительные, поэтому метод может

быть успешно применен при исследованиях на наличие маркеров природных и синтетических каннабиноидов.

Таблица 4.9 – Значения pK_a , LogP, LogD маркеров природных и синтетических каннабиноидов

Соединение	pK_a	LogP	LogD	
			pH=2,0	pH=4,8
N-(1 <i>H</i> -Индазол-3-илкарбонил)валин	3,39; 12,58	0,94	0,92	- 0,48
N-[(1-Пентил-1 <i>H</i> -индазол-3-ил)карбонил]валин	3,40	3,17	3,15	1,76
11-Нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота	4,74; 9,86	6,02	6,02	5,69

Результаты исследований показали [412], что с различными выходами маркеров, но все три метода могут быть использованы для определения природных и синтетических каннабиноидов. Таким образом, рассмотрение проблемы существующих подходов к пробоподготовке мочи и дериватизации с целью выявления метаболитов новых синтетических и природных каннабиноидов при их совместном присутствии при судебно-химических и химико-токсикологических исследованиях позволяет рекомендовать к использованию разработанную скрининговую методику с применением ТФЭ.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Впервые идентифицированы основные метаболиты синтетических каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов: PB-22, PB-22F, FUB-PB-22 и группы алкилиндазол-3-карбоксамидов, производных амида валина: AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-CHMINACA в процедуре скрининга реальных образцов мочи с применением методов ТФЭ и ГХ-МС.

2. Составлены общие схемы образования маркеров синтетических каннабимиметиков рассматриваемых групп. Описаны метаболиты, идентифицированные в моче потребителей курительных смесей, позволяющие

установить факт употребления синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA. Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара.

Установлено, что наряду с 8-гидроксихинолином, маркером каннабимиметика PB-22, определяющимся в моче, является 1-пентил-1*H*-индол-3-карбоновая кислота, PB-22F - 1-(5-фторпентил)-1*H*-индол-3-карбоновая кислота, FUB-PB-22 - 1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индол-3-карбоновая кислота.

Основным метаболитом AB-CHMINACA является *N*-[{1-(циклогексилметил)-1*H*-индазол-3-ил} карбонил]валин, AB-FUBINACA - *N*-[{1-[(4-фторфенил)метил]-1*H*-индазол-3-ил} карбонил]валин, AB-PINACA - *N*-[(1-пентил-1*H*-индазол-3-ил)карбонил]валин, 5F-AB-PINACA - *N*-[{1-(5-фторпентил)-1*H*-индазол-3-ил} карбонил]валин (M1) и 3-[{*N*-(1-карбамоил-2-метилпропил)-амино]-карбонил}-1*H*-индазол-1-пентановая кислота (M4), они могут использоваться в качестве маркеров употребления соответствующих синтетических каннабимиметиков.

3. Рассчитаны физико-химические (LogP, K_{oc}) и получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA.

4. Установлено, что идентифицированные метаболиты PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, AB-FUBINACA выводятся из организма человека с мочой в значительной степени или частично в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов предпочтительным является ферментативный гидролиз.

5. По результатам сравнения нескольких способов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации установлено, что наиболее эффективным для выявления метаболитов новых синтетических каннабимиметиков и природных

каннабиноидов при совместном присутствии является твердофазная экстракция в сочетании с ферментативным гидролизом.

Работы автора к главе 4

1. Катаев, С.С. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, Н.Б. Зеленина, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.34, №4. – С. 116–122.
2. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, Н.Б. Зеленина, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.35, №9. – С. 131–138.
3. Катаев, С. С. Определение в моче основных метаболитов каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // Проблемы экспертизы в медицине. – 2013. – Т. 13, № 2[50]. – С. 28–30.
4. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче / С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, №10. – С. 29–36.
5. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче методом ГХ-МС/ А.Б. Мелентьев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, №11. – С. 111–118.
6. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика FUB-РВ-22 в моче / С.С. Катаев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, №12. – С. 15–21.
7. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-SHMINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, №12. – С. 27–33.
8. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 21 с.
9. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче :

информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев. – 17 с.

10. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче / О.Н. Дворская [и др.] // Наркология. – 2014. – №3. – С. 55–65.

11. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22F в моче / С.С. Катаев, О.Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т.37, №2. – С. 114.–121.

12. Идентификация метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т.39, №8. – С. 150–160.

13. Волкова, Е.С. Синтетические каннабимиметики – алкилиндолы группы 8-оксихинолина, выявленные в Пермском крае в 2012-2013 годах / Е.С. Волкова, О.Н. Дворская // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: материалы межрегиональной науч.-практ. конф. с международным участием (15-17 мая 2014 года). – Пермь, 2014. – С. 28.–31.

14. Стрелкова, Д.В. Синтетические каннабимиметики группы алкилиндазола, выявленные в Пермском крае в 2013 году / Д.В. Стрелкова, О.Н. Дворская // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами: материалы межрегиональной науч.-практ. конф. с международным участием (15-17 мая 2014 года). – Пермь, 2014. – С. 71–75.

15. Катаев, С. С. Сравнение различных вариантов пробоподготовки для выявления маркеров синтетических и природных каннабиноидов в моче / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, Ю. Н. Аникина // Организация судебно-медицинской службы России на современном этапе: задачи, пути решения, результаты : тр. Всерос. науч.-практ. конф. (20–22 апреля 2016 года). – Воронеж, 2016. – С. 432–437.

16. Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах : информационное письмо рекомендовано к изданию

Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 34 с.

17. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская. – Москва : Изд-во «Перо», 2016. – 326 с.

ГЛАВА 5. ВЫЯВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ СИНТЕТИЧЕСКОГО НАРКОТИЧЕСКОГО АНАЛЬГЕТИКА АЦЕТИЛФЕНТАНИЛА В МОЧЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ГАЗОВОЙ И ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Изучение особенностей биотрансформации нового синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила и характеристик его метаболитов выделено в отдельную главу ввиду явного отличия его структуры и фармакологического действия от синтетических каннабимиметиков, рассмотренных в предыдущей главе.

Несмотря на то, что неизмененный ацетилфентанил экскретируется с мочой, его наблюдаемое содержание незначительно по сравнению с содержанием метаболитов [292]. Данная особенность приводит к затруднениям обнаружения исходного соединения при приеме малых доз и/или при значительном времени, прошедшем от приема до отбора мочи для анализа. Следовательно, скрининговые процедуры должны включать возможность обнаружения метаболитов ацетилфентанила. Для этого необходима информация о физико-химических свойствах и хроматомасс-спектрометрических характеристиках как самих метаболитов, так и их производных.

Использованные при исследовании оборудование, материалы, реактивы приведены в главе 2.

Стандартная процедура скрининга мочи на наличие наркотических и психотропных веществ состояла из процедуры подготовки проб и анализа методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Подготовка образцов мочи с применением ЖЖЭ с кислотным гидролизом [413] и ТФЭ с ферментативным гидролизом приведена в п. 2.3. Идентифицированные метаболиты ацетилфентанила и сам ацетилфентанил были обнаружены в элюате II.

Дериватизацию экстрактов мочи осуществляли согласно п. 2.5.

Метаболиты АЦФ идентифицировали по их молекулярным ионам, определенным методом ВЭЖХ-МС с химической ионизацией, и полным масс-спектром электронного удара (ЭУ) после анализа методом ГХ-МС.

Режим работы газового хроматографа Agilent 6890 с моноквадрупольным масс-спектрометрическим детектором 5975 приведен в п. 2.6. Сухие остатки (кроме триметилсилильных производных) растворяли в 200 мкл бутилацетата и 2 мкл при помощи автоматического дозатора вводили в устройство ввода газового хроматографа Agilent 6890.

Экстракты после триметилсилилирования анализировали на газовом хроматографе Shimadzu с масс-селективным детектором PQ 5050 с ручным вводом пробы. Режимы работы приведены в п. 2.6.

Степень конъюгирования гидроксильированных метаболитов определяли методом ГХ-МС по отношению пиков иона с m/z 231 для метаболитов и ацетилфентанила в экстрактах без гидролиза и с кислотным/ферментативным гидролизом.

Условия анализа методом ВЭЖХ-МС приведены в п. 2.6. Метод ВЭЖХ-МС с химической ионизацией использовали для определения массы протонированных молекул предполагаемых метаболитов ацетилфентанила и подтверждения их структуры по фрагментным ионам.

Структуры метаболитов предложены с учетом биотрансформации изученных ранее производных фентанила. При составлении схем фрагментации метаболитов под действием электронного удара учитывали результаты работ [414, 415], в которых приведена фрагментация фентанила и некоторых его аналогов. Структуры фрагментарных ионов ацетилфентанила и его метаболитов, полученных в условиях химической ионизации, согласуются с результатами [416, 417] фрагментации фентанила, его аналогов и гомологов.

Более поздние работы других авторов (после 2015 года) согласуются и подтверждают полученные нами данные (Глава 1). Отметим, что в исследовании [418], где оценивалась способность гепатоцитов человека h-iPS-HEP и гепатоцитов мыши PXB-клетки [419] к метаболизму фентанила и АЦФ, авторы

методом ЖХ-МС/МС идентифицировали метаболиты, обнаруженные нами [420], и ряд других.

5.1 Основные метаболиты и маркеры ацетилфентанила

Учитывая данные о биотрансформации фентанила и некоторых его аналогов [421–424], можно предположить, что основными метаболитами ацетилфентанила могут быть N-дезалкилированный и деацетилованный ацетилфентанил. Также возможно образование гидроксилированных по фенилэтильному и пиперидиновому фрагментам продуктов. Однако на хроматограммах экстрактов мочи потребителей ацетилфентанила метаболитов, гидроксилированных по пиперидиновому и фенильному фрагментам молекулы, нами обнаружено не было. К таким же выводам пришли и авторы работ [423, 424], которые исследовали метаболизм фентанила и α -метилфентанила.

На рисунке 5.1 приведена схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека, составленная нами по результатам исследования образцов мочи от трупов после передозировок ацетилфентанила [420].

Из схемы следует, что в отличие от описанных ранее фентанила и α -метилфентанила, основным путем биотрансформации ацетилфентанила является не N-дезалкилирование, а гидроксилирование по фенилэтильному фрагменту (метаболиты 3, 5, 7-10) на рисунке 5.1.

Таким образом, к основным путям метаболизма ацетилфентанила относятся:

- ароматическое гидроксилирование (метаболиты M3, M5, M7–M10);
- N - деалкилирование (нор-метаболиты M2, M6);
- N - деацетилирование (метаболиты M4–M6, M9, M10);
- конъюгация метаболитов M3, M5, M7–M10, в том числе, метилирование одного из гидроксильных у дигидроксилированных метаболитов (метаболиты M8, M10).

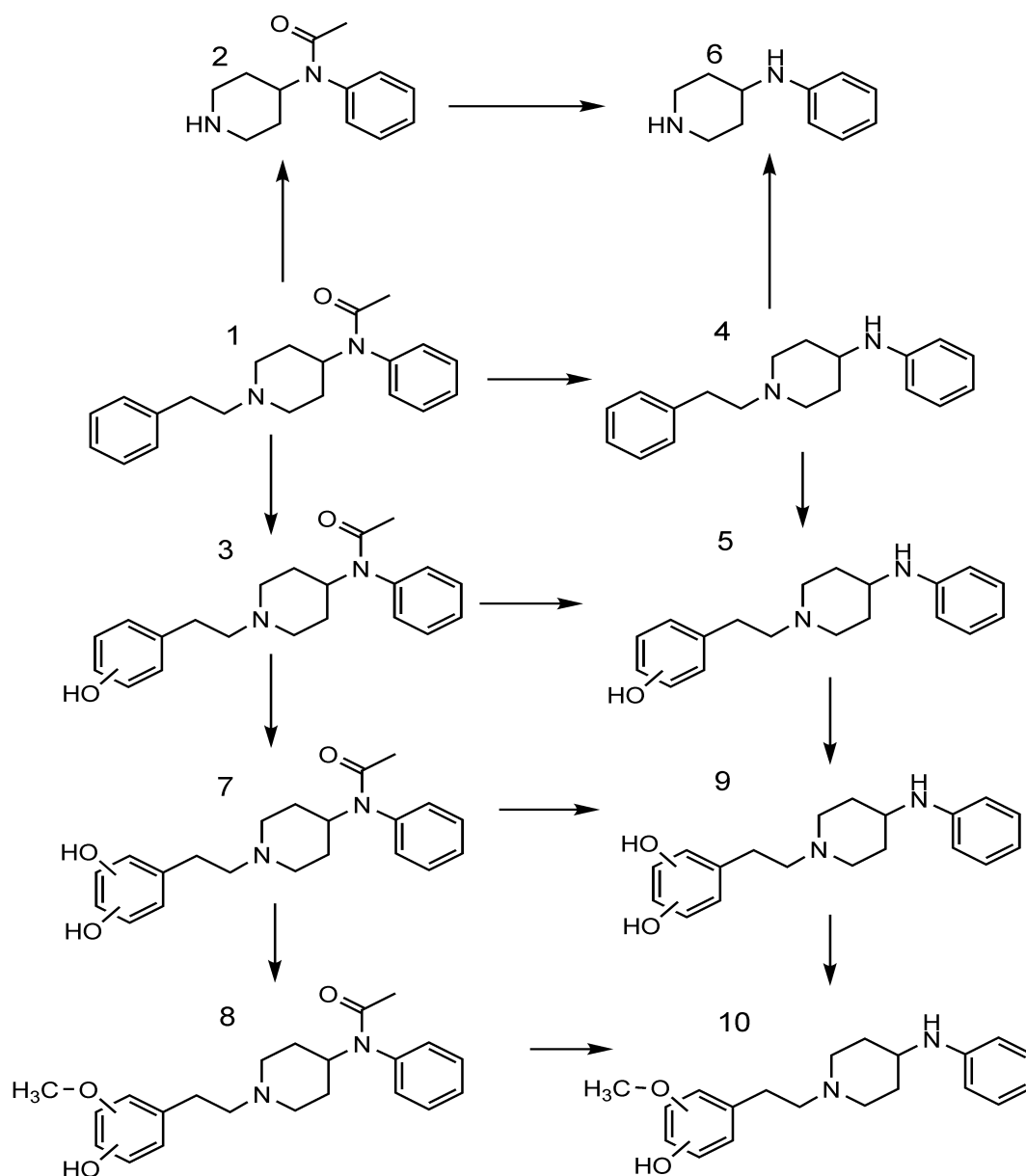


Рисунок 5.1 – Предполагаемая схема биотрансформации ацетилфентанила в организме человека (со стадией образования метильных конъюгатов)

На рисунке 5.2 приведена хроматограмма (ГХ-МС) ионного профиля экстракта мочи потребителя ацетилфентанила после гидролиза и ацетилирования. Наибольшую интенсивность на хроматограммах различных производных по общему ионному току имеют пики гидроксированных метаболитов (М3 и М8 на рисунке 5.1), тогда как пики дезацетилированных метаболитов АЦФ были малоинтенсивны.

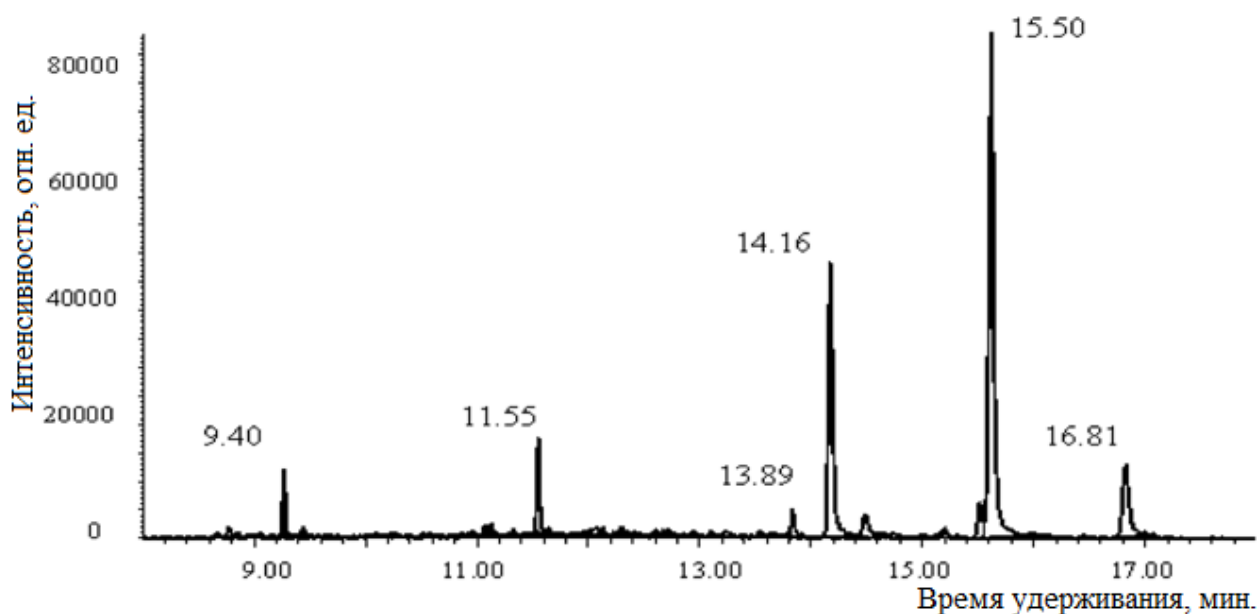


Рисунок 5.2 – ГХ-МС (ЭИ) хроматограмма образца мочи (при передозировке ацетилфентанила) после гидролиза и ацетилирования.

Время удерживания 9,40 мин соответствует ацетилированному производному норфентанила ($m/z = 217$); 11,55 мин – ацетилфентанилу (соединение 1 рисунок 5.1); 14,16 и 13,89 мин – изомерам 1 и 2 ацетилированных производных М3; 15,50 – ацетилированному производному М8 и 16,81 мин – диацетилированному производному М7.

5.2 Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила

Масс-спектры электронного удара, рассчитанные времена удерживания, брутто-формулы, молекулярные массы, структуры и предполагаемая фрагментация основных метаболитов ацетилфентанила и их производных представлены на рисунках 5.3 – 5.5.

На рисунках 5.6 и 5.7 приведены предполагаемые структуры ионов, образующихся при масс-фрагментации ацетилфентанила и диацетилированного метаболита М7, и пентафторпроизводных метаболитов ацетилфентанила М2 и М8, соответственно.

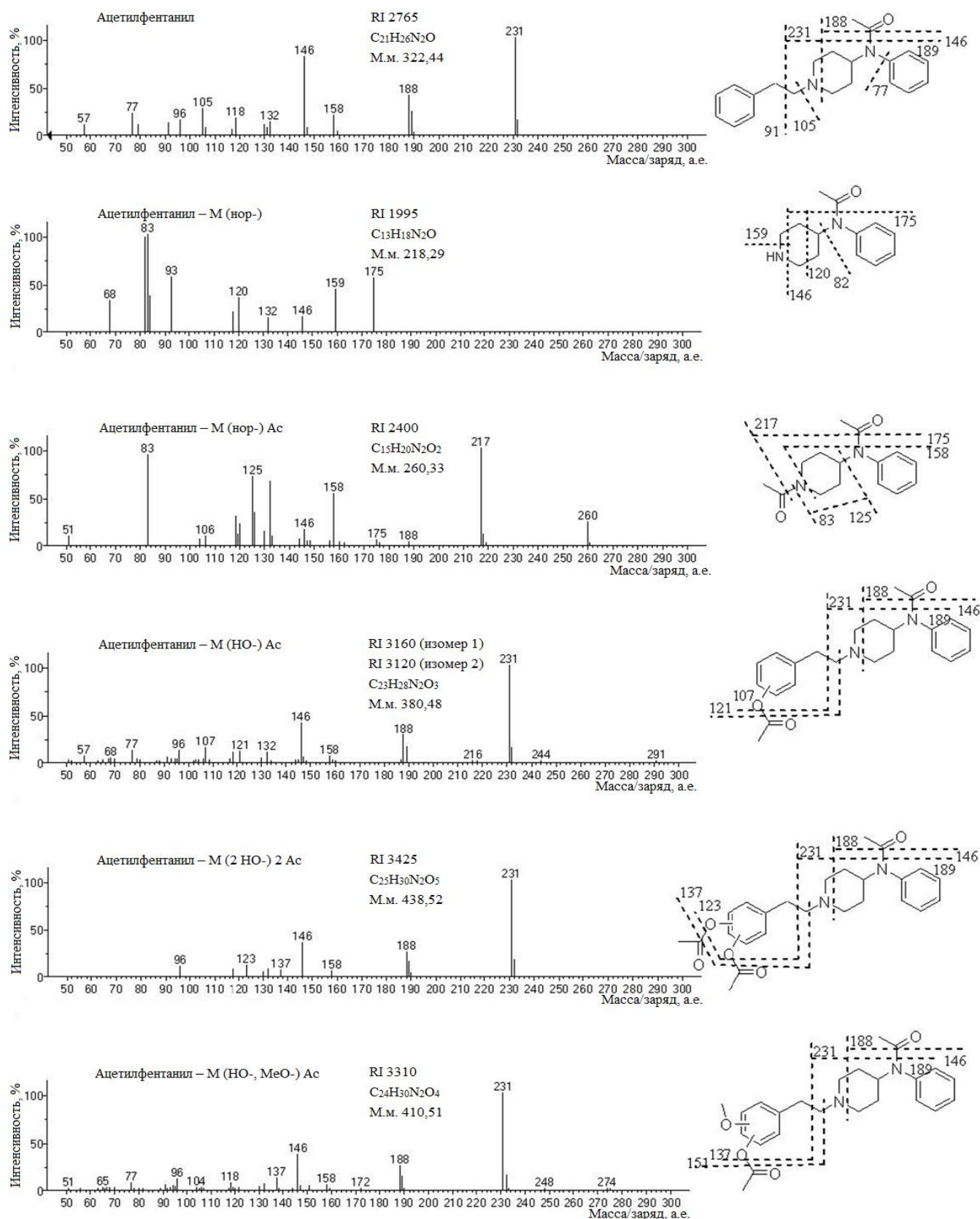


Рисунок 5.3 – Масс-спектры (ЭУ), структуры и характеристики ацетилфентанила и ацетилированных (Ас) дериватов его метаболитов М2, М3, М6 – М8

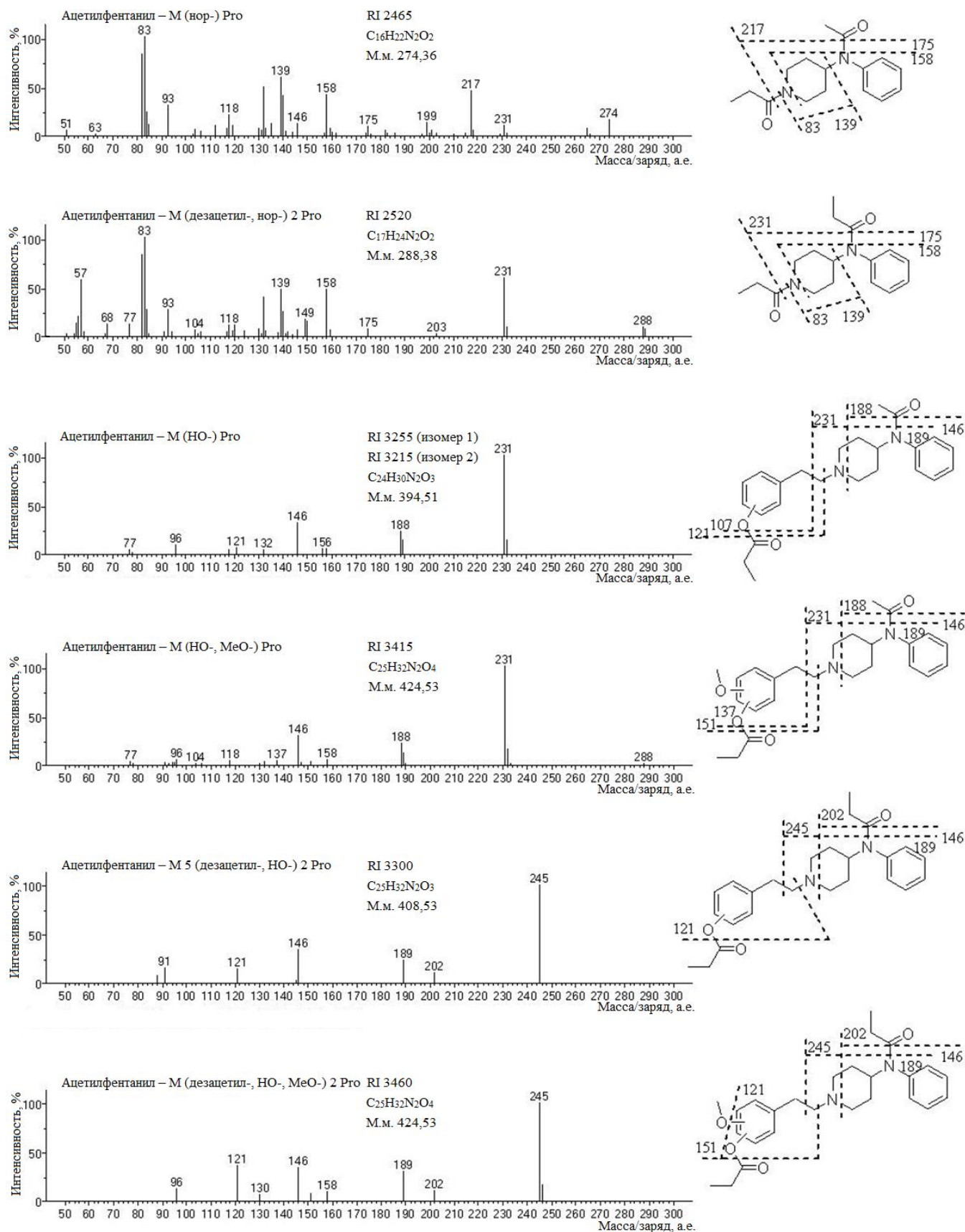


Рисунок 5.4 – Масс-спектры (ЭУ), структуры и характеристики пропионовых (Pro) дериватов метаболитов ацетилфентанила M2, M3, M5, M6, M8, M10

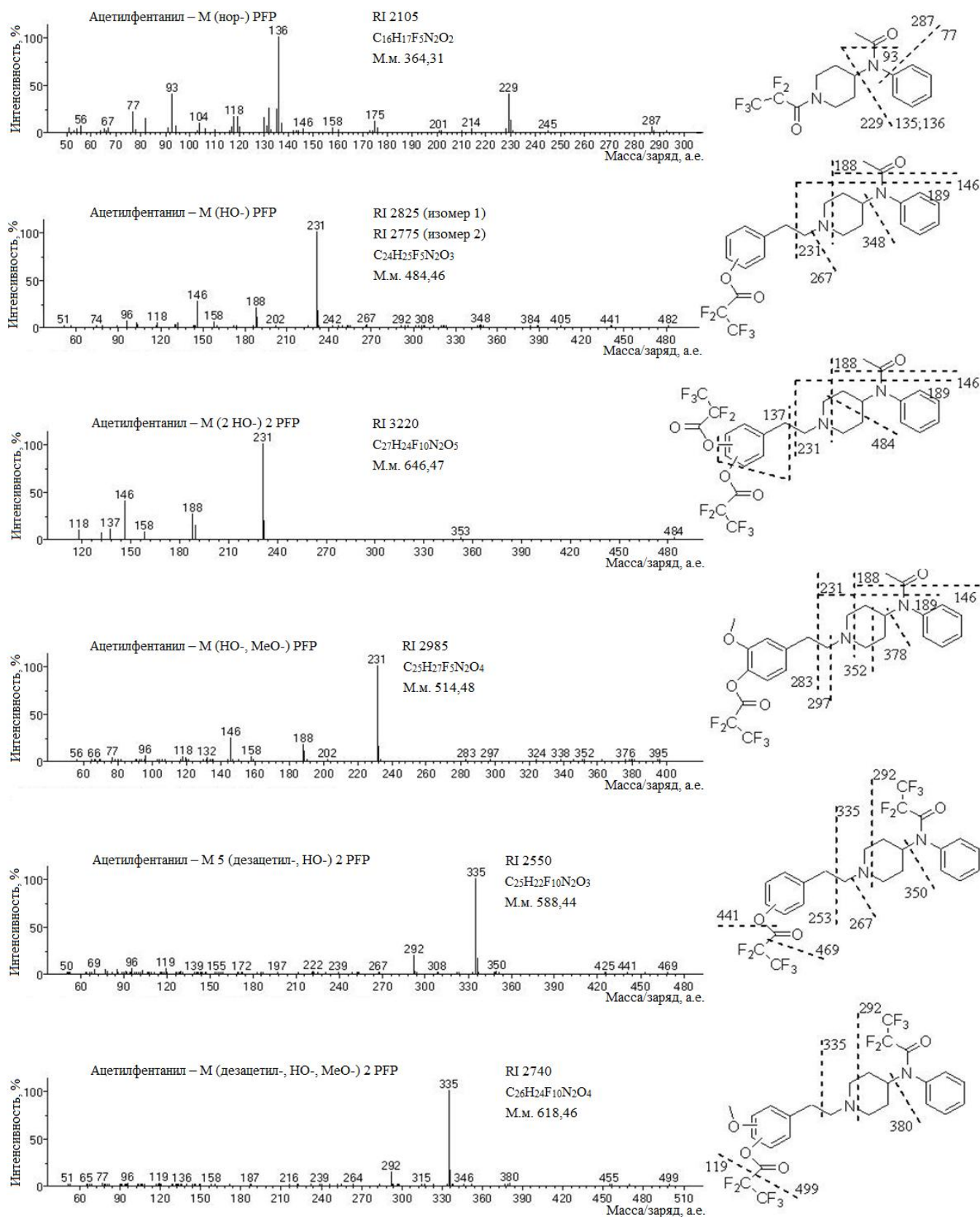


Рисунок 5.5 – Масс-спектры (ЭУ), структуры и характеристики пентафторпропионовых (PFP) дериватов метаболитов ацетилфентанила М2, М3, М5, М6, М8, М10

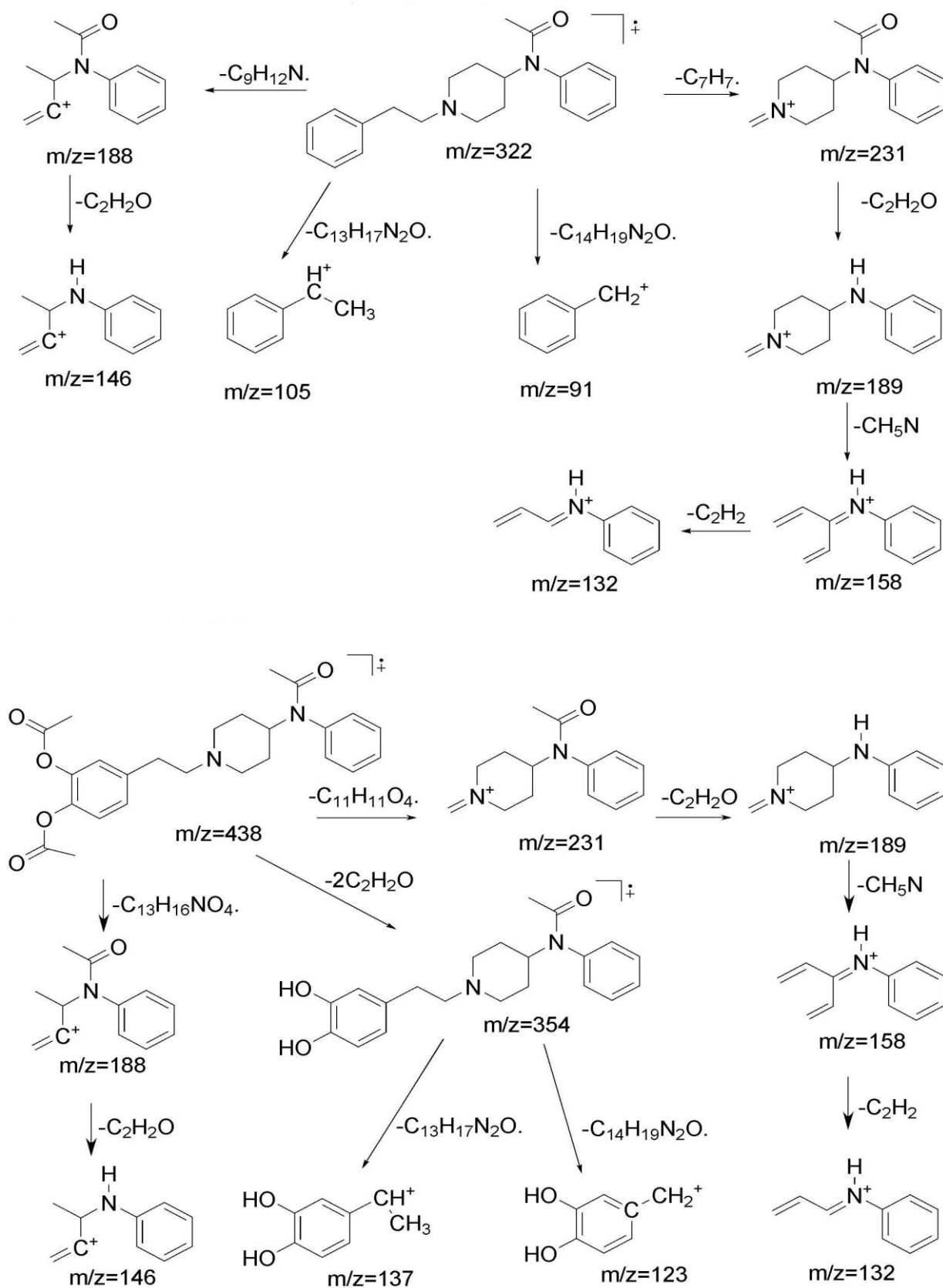


Рисунок 5.6 – Предполагаемые структурные формулы ионов, образующихся при масс-фрагментации (ЭУ) ацетилфентанила (вверху) и диацетилированного метаболита М7 (внизу)

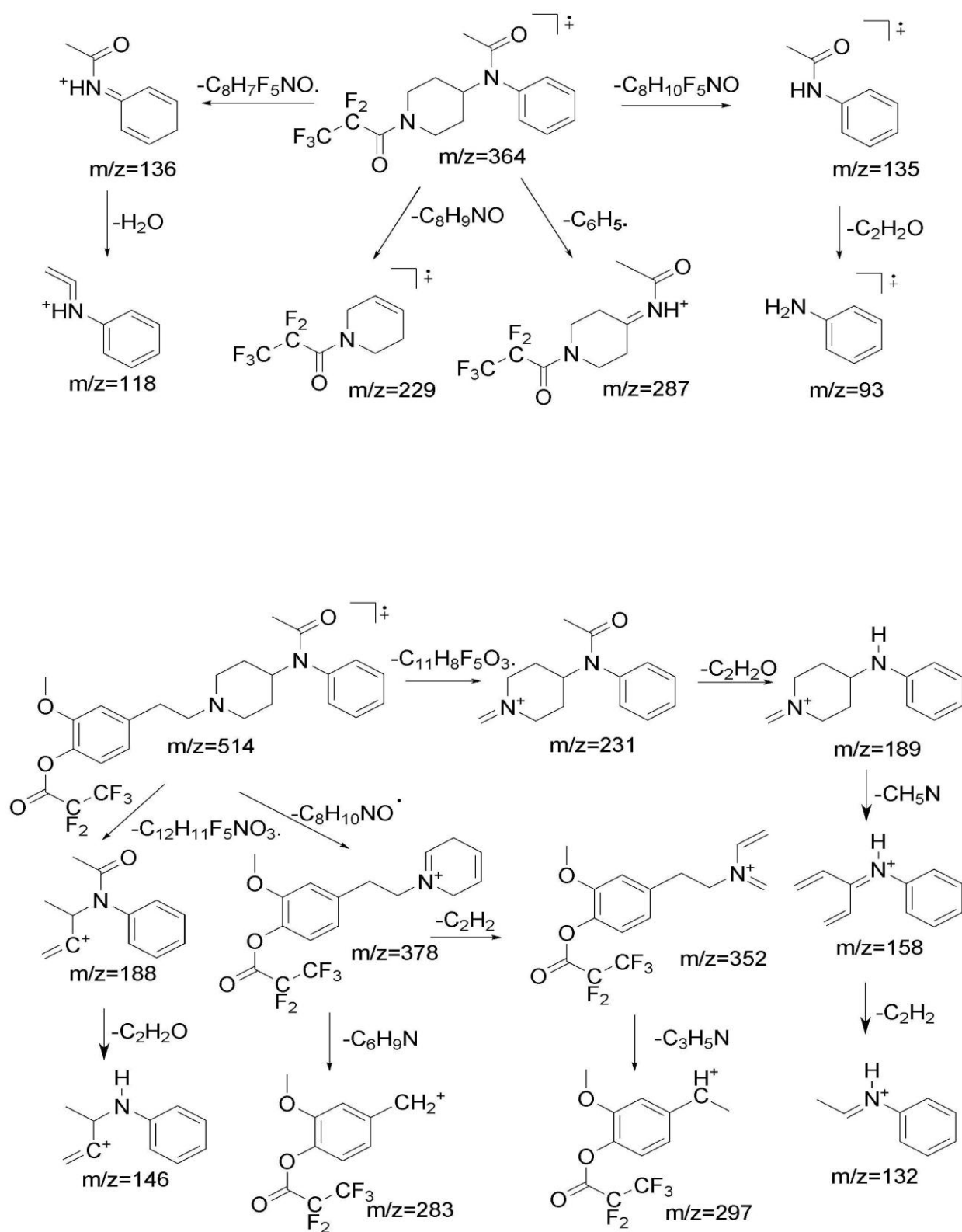


Рисунок 5.7 – Предполагаемые структурные формулы ионов, образующихся при масс-фрагментации (ЭУ) пентафторпроизводных метаболитов М2 (вверху) и М8 (внизу)

Масс-спектры АЦФ и основных его метаболитов М3, М8, полученные в условиях химической ионизации при атмосферном давлении с частичной фрагментацией, приведены на рисунке 5.8. Параллельно приведены структуры основных фрагментных ионов, наблюдаемых в приведенных спектрах.

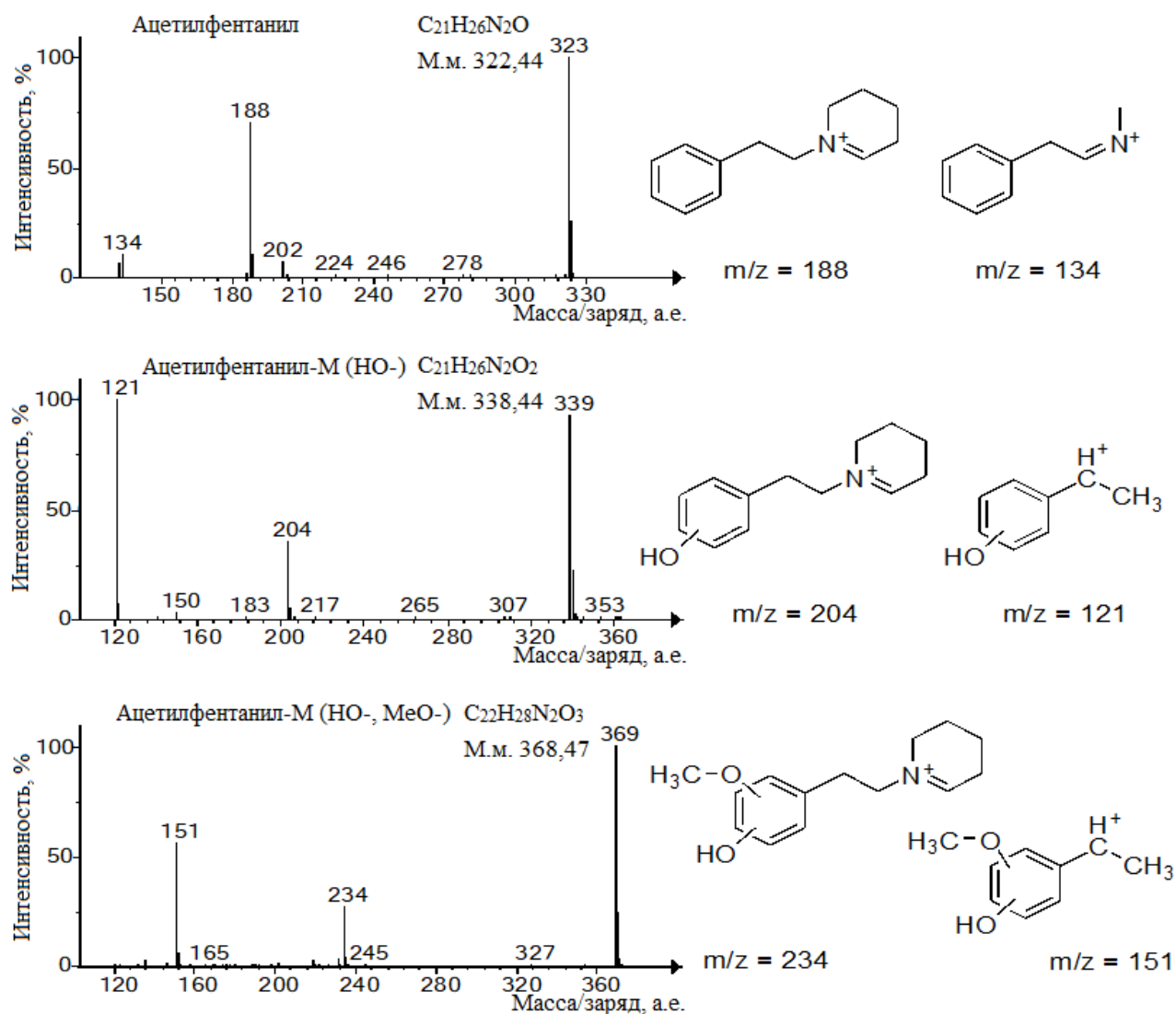


Рисунок 5.8 – Масс-спектры химической ионизации ацетилфентанила и его основных метаболитов М3 и М8 (напряжение на фрагменторе 200 В) и структуры их фрагментных ионов

В фазе II метаболизма ацетилфентанила происходит конъюгирование его метаболитов, гидроксированных по фенилэтильному фрагменту, в том числе, метилирование одного из гидроксильных групп.

Степень конъюгирования всех идентифицированных гидроксированных метаболитов АЦФ находится в пределах от $74 \pm 10 \%$ ($n=3$) для моногидроксированных и до 100% ($n=3$) для дигидроксированного метаболита.

В таблице 5.1 приведены результаты расчетов некоторых физико-химических характеристик ацетилфентанила и его основных метаболитов.

Таблица 5.1 – Физико-химические характеристики ацетилфентанила и его основных метаболитов

Соединение (рисунок 5.1)	pKa	LogP
1	9,2	3,4
2	10,5	1,1
3	9,2	2,6
4	9,0	3,9
5	8,7	3,2
7	8,8	2,0
8	8,8	2,3

Для обнаружения фактов употребления ацетилфентанила для дериватизации экстрактов мочи наиболее удобно использование ацетилирования вследствие того, что после ацетилирования отношение сигнал/шум аналитических сигналов возрастает за счет сложения сигналов производных гидроксированных метаболитов и их N-дезацетилированных аналогов. Для идентификации отдельных метаболитов рекомендуется использовать пентафторпропионовые производные. Использование триметилсилилирования и трифторацетилирования для идентификации показало худшие результаты по сравнению с ацетилированием и образованием пентафторпропионовых дериватов. В качестве маркеров употребления АЦФ в моче следует использовать метаболиты 3 и 8 (рис. 5.1) и сам ацетилфентанил [404, 420].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. С использованием методов газовой и жидкостной хроматографии в образцах мочи потребителей ацетилфентанила идентифицированы основные его метаболиты. Предполагаемые структуры метаболитов подтверждены их фрагментацией под действием электронного удара и химической ионизацией при атмосферном давлении.

2. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых производных (ацетилированных, пропионовых, пентафторпропионовых) метаболитов ацетилфентанила.

3. Установлено, что основным путем биотрансформации ацетилфентанила является гидроксирование по фенилэтильному фрагменту. Образующиеся метаболиты подвергаются во 2 фазе конъюгации, в том числе, метилированию одного из гидроксильных групп.

4. В качестве маркеров употребления ацетилфентанила в моче следует использовать его гидроксированные по фенилэтильному фрагменту метаболиты 3 и 8 (рисунок 5.1), а также сам ацетилфентанил.

5. Полученные данные использованы для обнаружения фактов употребления ацетилфентанила при судебно-химическом анализе посмертных образцов мочи потребителей после его передозировок.

Работы автора к главе 5

1. Мелентьев, А.Б. Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т.70, №2. – С. 216–224.

2. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская. – Москва : Перо, 2016. – 326 с.

Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических объектах с использованием ТФЭ и ГХ-МС

На основе проведенных экспериментальных исследований разработан единый методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологическом материале с использованием ТФЭ и ГХ-МС, включающий:

- пробоподготовку биологического объекта до этапа ТФЭ и добавление внутренних стандартов для контроля процедур подготовки проб. Пробоподготовка осуществляется в зависимости от вида биологического объекта (биожиidкости, печень, почка и др.) с процедурой разбавления буферным раствором, центрифугированием и получением надосадочной жидкости (супернатанта);
- проведение процедуры твердофазной экстракции на патроне со смешанной фазой, предусматривающей подбор рациональных условий для кондиционирования патрона, загрузки супернатанта с контролируемой скоростью, промывки, сушки патрона, элюирования с фракционированием веществ на соединения кислотного, нейтрального, основного характера и получением элюатов;
- процедуру дериватизации для улучшения газохроматографических свойств полярных соединений с образованием метильных (для элюата I) и ацетильных (для элюата II) производных лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов;
- аналитический этап методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, обработку полученных хроматограмм и масс-спектров с применением специализированных библиотек с целью идентификации и количественного определения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов;
- оформление результатов анализа по выявлению лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов в биологических объектах (рисунок 5.9).

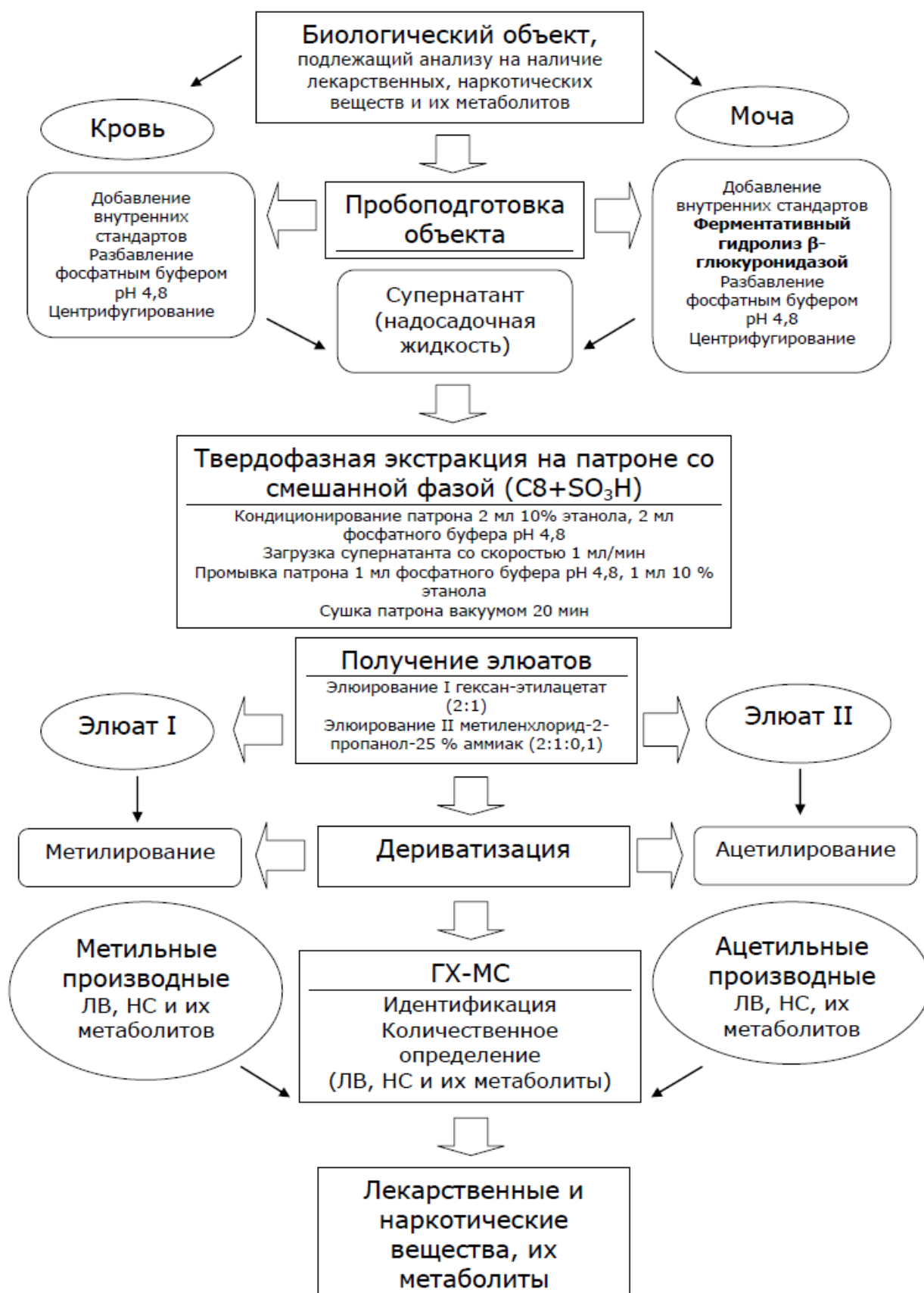


Рисунок 5.9 – Схема скрининга лекарственных и наркотических веществ и их метаболитов в биологических объектах с использованием ТФЭ и ГХ-МС

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На примере исследования модельных соединений с различными кислотными и липофильно-гидрофильными свойствами разработана методика скринингового исследования крови на наличие лекарственных и наркотических веществ с применением ТФЭ и ГХ-МС. С использованием компьютерного моделирования Бокса-Бенкена и подтверждающих экспериментальных исследований установлены оптимальные параметры ТФЭ на патронах со смешанной фазой, которые могут быть применены для скрининга широкого круга токсикологически значимых веществ.
2. Разработана методика идентификации и количественного определения некоторых НПВС при скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови с применением ТФЭ и ГХ-МС. На основе процедуры валидации показана пригодность методики для количественной оценки содержания индометацина, кетопрофена, напроксена, ибупрофена и диклофенака в крови.
3. Оценена эффективность подготовки проб крови для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ с применением патронов ТФЭ со смешанной фазой разных производителей. Показана возможность использования патронов марок Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex), EVIDEX SampliQ (Agilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo). Исходя из показателей максимальных выходов анализируемых веществ и экономичности, к применению в экспертной практике рекомендованы патроны двух марок: Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Agilent).
4. При апробации разработанной методики скрининга крови на реальных образцах цельной и посмертной крови выявлено 111 токсикологически значимых соединений, а также их метаболитов, которые сгруппированы по кислотным и гидрофильно-липофильным свойствам на основании рассчитанных значений pK_a и LogP . Среди выявленных соединений также обнаружены неизмененные метилендиоксипировалерон, пирролидиновалерофенон и их метаболиты; метаболиты каннабимиметиков AB-PINACA и AMB, MDMB(N)-2201, AB-FUBINACA, 5-F-AB-PINACA, AB-CHMINACA, XLR-11.

5. Впервые в процедуре скрининга реальных образцов мочи с применением методов ТФЭ и ГХ-МС выявлены основные метаболиты и маркеры синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, FUB-PB-22 AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-FUBINACA, AB-SHMINACA, позволяющие установить факт их употребления.

Рассчитаны физико-химические и получены газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов PB-22, PB-22F, FUB-PB-22, AB-PINACA, 5F-AB-PINACA, AB-SHMINACA, AB-FUBINACA. Установлено, что идентифицированные метаболиты данных синтетических каннабимиметиков выводятся из организма человека с мочой в значительной степени или частично в конъюгированном виде. Для гидролиза конъюгатов предпочтительным является ферментативный гидролиз.

6. По результатам сравнения нескольких методов пробоподготовки мочи с использованием различных вариантов гидролиза, экстракции и дериватизации установлено, что для выявления метаболитов новых синтетических и природных каннабиноидов при совместном присутствии наиболее эффективно применение твердофазной экстракции в сочетании с ферментативным гидролизом.

7. По результатам исследования образцов посмертной мочи после передозировок нового синтетического наркотического анальгетика ацетилфентанила с использованием методов газовой и жидкостной хроматографии выявлены его основные метаболиты и предложены маркеры, доказывающие факт употребления ацетилфентанила. Получены масс-спектральные и хроматографические характеристики некоторых производных метаболитов ацетилфентанила. Установлено, что основным путем биотрансформации ацетилфентанила является гидроксирование по фенилэтильному фрагменту с последующим конъюгированием глюкуроновой кислотой и метилированием одного из гидроксильных групп.

8. Предложен научно-методологический подход к скринингу токсикологически значимых веществ и их метаболитов в биологическом

материале с использованием твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющий эффективно использовать поисковые библиотеки масс-спектров для идентификации и количественного определения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов.

Перспективы применения. Разработанный научно-методологический подход к скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов с использованием ТФЭ и ГХ-МС может быть использован в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе при серийной пробоподготовке различных биологических объектов, что позволит оптимизировать деятельность соответствующих экспертных подразделений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМД – амперометрический детектор

АФД – азотно-фосфорный детектор

АС – аналитический сигнал

АЦФ – ацетилфентанил, нор-АЦФ – норацетилфентанил

БАВ – биологически активные вещества

БДА – бензодиазепины

БСА – N,O-бис(триметилсилил)ацетамид, БСТФА – N,O-бис(триметилсилил) трифторацетамид

БЭ (ВЕ) – бензоилэкгонин

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВС (IS) – внутренний стандарт

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием

ВЭЖХ - МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография

ГГА (ННА) – 3,4-дигидроксиамфетамин, ГМА (НМА) – 4-гидрокси-3-метоксиамфетамин, ГММА (НММА) – 4-гидрокси-3-метоксиметамфетамин

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГХ-ПИД – газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектированием

ГХ-МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия

ГХ - МС/МС – газовая хроматография – тандемная масс-спектрометрия

ИПС – изо-пропиловый спирт (2-пропанол)

ИФА – иммуноферментный анализ

ЖХ – жидкостная хроматография

ЖХ-МСВР – жидкостная хроматография – масс-спектрометрия высокого разрешения

ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция

ЛП – лекарственные препараты

ЛСД – диметиламид лизергиновой кислоты

6-МAM – 6-моно-ацетилморфин

МДПВ (MDPV) – метилендиоксипировалерон

МДА (MDA) – 3,4-метилендиоксиамфетамин, МДЕА (MDE) – 3,4-метилендиокси-N-этиламфетамин, МДМА (MDMA) – 3,4-метилендиокси-N-метамфетамин

МПЭ – математическое планирование эксперимента

НС – наркотические средства

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

ПАВ – психоактивные вещества

ПВП (PVP) – α -пирролидиновалерофенон

ПФПА – 2,2,3,3,3-пентафторпропионовый ангидрид

ПФП – 2,2,3,3,3-пентафторпропанол

РИА – радиоиммуноанализ

СК – синтетические каннабимиметики

СХА – судебно-химический анализ

СХО – судебно-химическое отделение

ТАД – трициклические антидепрессанты

ТГК (THC) – тетрагидроканнабинол

Δ^8 -ТГК-СООН – 11-нор- Δ^8 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота

ТГК-СООН (THC-СООН) – 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота, ТГК-СООН-Glu – глюкуронид 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты

ТМС эфир – триметилсилиловый эфир

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФЭ – твердофазная экстракция

УЗ – обработка ультразвуком

УК – уксусная кислота, СУК – концентрация уксусной кислоты

УЭЖХ-МС/МС – ультраэффективная жидкостная tandemная масс-спектрометрия

ФЛД – флуориметрический детектор

ФБ – фосфатный буфер

ФГ – функциональная группа

ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России – Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский центр судебно-медицинской экспертизы Минздрава России

ХЛД – хемолюминисцентный детектор

ХТА – химико-токсикологический анализ

ХТЛ – химико-токсикологическая лаборатория

ЭА – этилацетат

ЭДТА (EDTA) - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭХД – электрохимический детектор

ЭИ – электронная ионизация, ЭУ – электронный удар

ЭЭ – эффективность экстракции

ACN – ацетонитрил

Glu – глюкуронид

CYP – цитохром

ISTD – внешний стандарт

Кос – коэффициент адсорбции

LogD – коэффициент распределения октанол/вода ионизированной формы соединения, LogP – коэффициент распределения октанол/вода молекулярной формы соединения

MeOH – метанол, VMeOH – объем метанола, CMeOH – концентрация метанола

PCP – фенциклидин

pKa – константа диссоциации

RI – индекс удерживания

SIM – селективный ионный мониторинг

Scan – режим полного сканирования ионов

QqTOF – гибридный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр

El – элюент, Vэ – объем элюента

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. PubMed : US National Library of MedicineNational Institutes of Health [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (дата обращения: 16.11.2017).
2. Сычев, К. С. Подготовка пробы в газовой и жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – Москва : КОКОРО, 2012. – 160 с.
3. Разработка методик твердофазной экстракции (ТФЭ) с сорбентами смешанного типа для криминалистических задач [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://cn.agilent.com/cs/library/applications/5991-4695RU.pdf> (дата обращения: 21.05.2017).
4. Сапрыкин, Л. В. Методология аналитического применения твердофазной экстракции / Л. В. Сапрыкин, Л. В. Сапрыкина // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7, вып. 3. – С. 397-409.
5. Telepchak, M. J. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase extraction / M. J. Telepchak, T. F. August, G. Chaney. – Totowa, NJ : Humana Press, 2004. – 370 p.
6. Franke, J. P. Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis / J. P. Franke, R. A. de Zeeuw // J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. – 1998. – Vol. 713, № 1. – P. 51-59.
7. Battista, M. Extraction and isolation of triazine herbicides from water and vegetables by a double trap tandem system / M. Battista, A. Di Corcia, M. Marchetti // Anal. Chem. – 1989. – Vol. 61, № 9. – P. 935-939.
8. Скрининг и количественное определение следовых количеств пестицидов в пищевых продуктах методом tandemной масс-спектрометрии ГХ-МСМС и ВЭЖХ-МСМС [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vetrf.ru/fsvps-docs/ru/events/2008/14/files/2/7.pdf> (дата обращения: 25.06.2017).
9. Analysis of permethrin isomers in composite diet samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and isotope dilution gas chromatography-ion trap mass spectrometry / A. P. Vonderheide [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216, № 22. – P. 4633-4640.

10. Wan Ibrahim, W. A. Novel sol-gel hybrid methyltrimethoxysilane-tetraethoxysilane as solid phase extraction sorbent for organophosphorus pesticides / W. A. Wan Ibrahim, K. V. Veloo, M. M. Sanagi // J. Chromatogr. A. – 2012. – Vol. 1229. – P. 55-62.
11. Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological sample extracts. Determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography-tandem mass spectrometry / A. R. Fontana [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2011. – Vol. 1218, № 18. – P. 2490-2496.
12. Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods / L. Culleré [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216, № 18. – P. 4040-4045.
13. Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis / J. J. Rodríguez-Bencomo [et al.] // J. Sci. Food. Agric. – 2011. – Vol. 91, № 13. – P. 2484-2494.
14. Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography-mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry as potential loopholes / H. G. Schmarr [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2010. – Vol. 1217, № 43. – P. 6769-6777.
15. Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar / E. Durán Guerrero [et al.] // J. Sep. Sci. – 2008. – Vol. 31, № 16-17. – P. 3030-3036.
16. Busetti, F. Analysis of pharmaceuticals in indirect potable reuse systems using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / F. Busetti, K. L. Linge, A. Heitz // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216, № 31. – P. 5807-5818.

17. Baker, D. R. Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / D. R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – Vol. 1218, № 44. – P. 7901-7913.
18. Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments / D. Mutavdžić Pavlović [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1258. – P. 1-15.
19. Hladik, M. L. A multi-residue method for the analysis of pesticides and pesticide degradates in water using HLB solid-phase extraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry / M. L. Hladik, K. L. Smalling, K. M. Kuivila // *Bull. Environ Contam. Toxicol.* – 2008. – Vol. 80, № 2. – P. 139-144.
20. Román, I. P. Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples / I. P. Román, A. Chisvert, A. Canals // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – Vol. 1218, № 18. – P. 2467-2475.
21. Gros, M. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry / M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1248. – P. 104-121.
22. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry / I. González-Mariño [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol. 1217, № 11. – P. 1748-1760.
23. Beceiro-González, E. Optimisation of a headspace-solid-phase micro-extraction method for simultaneous determination of organometallic compounds of mercury, lead and tin in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry / E. Beceiro-González, A. Guimaraes, M. F. Alpendurada // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216, № 29. – P. 5563-5569.

24. Barron, L. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry / L. Barron, J. Tobin, B. Paull // *J. Environ Monit.* – 2008. – Vol. 10, № 3. – P. 353-361.
25. Azzouz, A. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples / A. Azzouz, B. Souhail, E. Ballesteros // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – Vol. 1217, № 17. – P. 2956-2963.
26. Grujić, S. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry / S. Grujić, T. Vasiljević, M. Lausević // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216, № 25. – P. 4989-5000.
27. Application of cation-exchange solid-phase extraction for the analysis of amino alcohols from water and human plasma for verification of Chemical Weapons Convention / P. K. Kanaujia [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – Vol. 1185, № 2. – P. 167-177.
28. Landis, M. S. The use of mixed-mode ion-exchange solid phase extraction to characterize pharmaceutical drug degradation / M. S. Landis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 44, № 5. – P. 1029-1039.
29. Analysis of pharmaceutical creams: a useful approach based on solid-phase extraction (SPE) and UV spectrophotometry / D. Bonazzi [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1995. – Vol. 13, № 11. – P. 1321-1329.
30. Multiresidue pesticide analysis of ginseng powders using acetonitrile- or acetone-based extraction, solid-phase extraction cleanup, and gas chromatography-mass spectrometry/selective ion monitoring (GC-MS/SIM) or -tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) / J. W. Wong [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – Vol. 58, № 10. – P. 5884-5896.
31. Mroczek, T. Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids / T. Mroczek, K. Głowniak, J. Kowalska // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – Vol. 1107, № 1–2. – P. 9-18.

32. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях / З. А. Темердашев [и др.] // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 211-218.
33. Hackett, J. Analysis of total caffeine and other xanthines in specialty coffees using mixed mode solid-phase extraction and liquid chromatography-diode-array detection after microwave digestion / J. Hackett, M. J. Telepchak, M. J. Coyer // J. Anal. Toxicol. – 2008. – Vol. 32, № 8. – P. 695-701.
34. Karthika, C. Gas chromatographic method for the determination of hexaconazole residues in black tea / C. Karthika, P. J. Sachin // J. Zhejiang Univ. Sci B. – 2008. – Vol. 9, № 2. – P. 160-164.
35. Lensmeyer, G. L. Therapeutic monitoring of tacrolimus concentrations in blood: semi-automated extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry / G. L. Lensmeyer, M. A. Poquette // Ther. Drug. Monit. – 2001. – Vol. 23, № 3. – P. 239-249.
36. de Zeeuw, R. A. SPEC disc solid-phase extraction for rapid broad-spectrum drug screening in urine / R. A. de Zeeuw, J. Wijsbeek, J. P. Franke // J. Anal. Toxicol. – 2000. – Vol. 24, № 2. – P. 97-101.
37. Ford, B. A rapid extraction method for acidic drugs in hemolyzed blood / B. Ford, J. Vine, T. R. Watson // J. Anal. Toxicol. – 1983. – Vol. 7, № 3. – P. 116-118.
38. Zief, M. Solid Phase Extraction for Sample Preparation / M. Zief, R. Kiser. – Philipsburg, NJ : J. T. Baker Inc, 1988.
39. Maurer, H. H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry / H. H. Maurer // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 580. – P. 3-41.
40. MacDonald, P. D. Solid phase extraction: applications guide and bibliography: a resource for sample preparation methods development manual and comprehensive compendium of worldwide Waters Sep-Pak cartridge: literature references since 1978 / P. D. MacDonald, E. S. P. Bouvier. – Milford : Waters, 1995. – 645 p.

41. Moore, C. M. Rapid extraction of anti-inflammatory drugs in whole blood for HPLC analysis / C. M. Moore, I. R. Tebbett // Forensic Sci Int. – 1987. – Vol. 34, № 1-2. – P. 155-158.
42. Сорбенты Bakerbond [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://adymis.com/good/506> (дата обращения: 21.02.2018).
43. Твердофазная экстракция и флеш-хроматография [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://galachem.ru/katalog/khromatografiya/> (дата обращения: 15.01.2018).
44. Sample Preparation [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.hplc.sk/pdf/Varian/Varian_Catalog_Sample_Preparation.pdf (дата обращения: 10.01.2018).
45. Agilent Bond Elut Specialty, Disk and Bulk SPE Selection Guide [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/Public/5990-8592EN.pdf> (дата обращения: 02.02.2018).
46. ISOLUTE® AL-A, AL-N & AL-B [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biotage.com/product-page/isolute-al-a-al-n--al-b> (дата обращения: 15.01.2018).
47. Сорбенты Waters Oasis для твердофазной экстракции [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://инком.бел/media/pdf/Oasis.pdf> (дата обращения: 02.01.2018).
48. Biotage ISOLUTE® SPE Columns and Plates [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biotage.com/product-group/isolute-spe-columns-and-plates> (дата обращения: 02.02.2018).
49. High Quality SPE Products. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata> (дата обращения: 02.01.2018).
50. Supelco Solid Phase Extraction Products [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.lsc.gr/attachments/File/spe_brochure.pdf (дата обращения: 25.05.2017).

51. Сычев, К. С. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и твердофазной экстракции / К. С. Сычев. – Москва, 2006. – 167 с.
52. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization / H. Zhao [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 586, № 1-2. – P. 399-406.
53. Сухно, И. В. Углеродные нанотрубки. Ч. 1. Высокотехнологичные приложения [Электронный ресурс] / И. В. Сухно, В. Ю. Бузько. – Режим доступа: <http://nanocarbons.com/wp-content/uploads/2008/02/uglerodnye-nanotrubki-chast-1-vysokotekhnologichnye-prilozheniya.pdf> (дата обращения: 02.01.2018).
54. Tebbett, I. R. Rapid extraction of codeine and morphine in whole blood for HPLC / I. R. Tebbett // *Chromatographia.* – 1987. – Vol. 23. – P. 377-378.
55. Sorbent Extraction Technology: [handbook] / ed. by K. C. van Horne; Analytichem International Inc. – Harbor City CA : Analytichem International Inc, 1985. – 124 p.
56. Об Утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации [Электронный ресурс] : приказ Минздравсоцразвития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_103821/, ограничен.
57. О порядке проведения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (алкогольного, наркотического или иного токсического) [Электронный ресурс] : приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 декабря 2015 г. № 933н. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195274/, свободный.
58. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics / ed. by C. Ioannides. – Chichester : UK John Wiley & Sons, Ltd, 2001. - 578 p.
59. Breiter, J. Evaluation of column extraction: a new procedure for the analysis of drugs in body fluids / J. Breiter, R. Helger, H. Lang // *J. Forensic Sci.* – 1976. – № 7. – P. 131-140.

60. Stolman, A. XAD-2 resin drug extraction methods for biologic samples / A. Stolman, P. A. Pranitis // *Clin. Toxicol.* – 1977. – Vol. 10, № 1. – P. 49-60.
61. Delbeke, F. T. Detection of sympathomimetic central nervous stimulants with special reference to doping. II. Comparative study of two adsorption chromatography methods using different XAD resins / F. T. Delbeke, M. Debackere // *J. Chromatogr.* – 1977. – Vol. 136, № 3. – P. 385-390.
62. Gelbke, H. P. Isolation of drugs from blood by column chromatography on Amberlite XAD-2 / H. P. Gelbke, T. H. Grell, G. Schmidt // *Arch. Toxicol.* – 1978. – Vol. 39, № 3. – P. 211-217.
63. Bogusz, M. Isolation of drugs from autopsy material by XAD-2 adsorption-elution technique. A routine procedure. / M. Bogusz, J. Gierz, J. Bialka // *Arch. Toxicol.* – 1978. – Vol. 41, № 2. – P. 153-162.
64. Thoma, J. J. Tricyclic antidepressants in serum by a Clin-ElutTM column extraction and high pressure liquid chromatographic analysis / J. J. Thoma, P. B. Bondo, C. M. Kozak // *Ther. Drug. Monit.* – 1979. – Vol. 1, № 3. – P. 335-358.
65. Elahi, N. Encapsulated XAD-2 extraction technique for a rapid screening of drugs of abuse in urine / N. Elahi // *J. Anal. Toxicol.* – 1980. – Vol. 4, № 1. – P. 26-30.
66. Wesley, J. F. High performance liquid chromatographic analysis of the antiarrhythmic drugs procainamide, disopyramide, quinidine, propranolol and metabolites from serum extracts / J. F. Wesley, F. D. Lasky // *Clin. Biochem.* – 1981. – № 3. – P. 113-118.
67. Woestenborghs, R. Rapid and sensitive gas chromatographic method for the determination of alfentanil and sufentanil in biological samples / R. Woestenborghs, L. Michielsen, J. Heykants // *J. Chromatogr.* – 1981. – Vol. 224, № 1. – P. 122-127.
68. Determination of glyceryl trinitrate in human plasma by gas chromatography--negative ion chemical ionization--selected ion monitoring / G. Idzu [et al.] // *J. Chromatogr.* – 1982. – Vol. 229, № 2. – P. 327-336.
69. Di Corcia, A. Chromatographic micro-procedure for trace determination of phenobarbital in blood serum / A. Di Corcia, L. Ripani, R. Samperi // *J. Chromatogr.* – 1982. – Vol. 229, № 2. – P. 365-372.

70. Elahi, N. Magnetically propelled, encapsulated XAD-2 and microphase extraction technique for a rapid quantitation of basic drugs in serum by GC / N. Elahi // *J. Chromatogr Sci.* – 1982. – Vol. 20, № 10. – P. 483-486.
71. Gas-chromatographic measurement of 3-hydroxybutyrate and lactate in plasma and 3-hydroxybutyrate in whole blood / G. Cosmi [et al.] // *Clin. Chem.* – 1983. – Vol. 29, № 2. – P. 319-321.
72. Kabra, P. M. Liquid chromatography with fluorometric detection of unconjugated estriol in serum of pregnant women / P. M. Kabra, Hwa Tsai Fen, L. J. Marton // *Clin. Chim. Acta.* – 1983. – Vol. 128, № 1. – P. 9-17.
73. Beierle, F. A. Liquid chromatographic separation of antidepressant drugs: I. Tricyclics / F. A. Beierle, R. W. Hubbard // *Ther. Drug. Monit.* – 1983. – Vol. 5, № 3. – P. 279-292.
74. Application of the combined use of fused silica capillary columns and NPD for the toxicological determination of codeine and ethylmorphine in a human overdose case / P. Demedts [et al.] // *Anal. Toxicol.* – 1983. – Vol. 7, № 3. – P. 113-115.
75. Lensmeyer, G. L. Stabilized analysis of antidepressant drugs by solvent-recycled liquid chromatography: procedure and proposed resolution mechanisms for chromatography / G. L. Lensmeyer, M. A. Evenson // *Clin. Chem.* – 1984. – Vol. 30, № 11. – P. 1774-1779.
76. Impact of biological matrix and isolation methods on detectability and interlaboratory variations of TLC R_f-values in systematic toxicological analysis / M. Bogusz [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 1984. – Vol. 8, № 4. – P. 149-154.
77. Stewart, J. T. A Comparison of Solid-Phase Extraction Techniques for Assay of Drugs in Aqueous and Human Plasma Samples / J. T. Stewart, T. S. Reeves, I. L. Honigberg // *J. Analytical Letters.* – 1984. – Vol. 17. – P. 181-1826.
78. Matsubara, K. Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction / K. Matsubara, C. Maseda, Y. Fukui // *Forensic Sci. Int.* – 1984. – Vol. 26, № 3. – P. 181-192.

79. Macdonald, I. A. An improved technique for extracting catecholamines from body fluids / I. A. Macdonald, D. M. Lake // *J. Neurosci Methods*. – 1985. – Vol. 13, № 3-4. – P. 239-248.
80. Harrison, P. M. Simple and rapid analysis of atenolol and metoprolol in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography / P. M. Harrison, A. M. Tonkin, A. J. McLean // *J. Chromatogr.* – 1985. – Vol. 339, № 2. – P. 429-433.
81. Lin, Q. Quantitation of cimetidine and cimetidine sulfoxide in serum by solid-phase extraction and solvent-recycled liquid chromatography / Q. Lin, G. L. Lensmeyer, F. C. Larson // *J. Anal. Toxicol.* – 1985. – Vol. 9, № 4. – P. 161-166.
82. Lensmeyer, G. L. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine, with concomitant detection of a cell-bound metabolite / G. L. Lensmeyer, B. L. Fields // *Clin. Chem.* – 1985. – Vol. 31, № 2. – P. 196-201.
83. Hyde, P. M. Evaluation of drug extraction procedures from urine / P. M. Hyde // *J. Anal. Toxicol.* – 1985. – Vol. 9, № 6. – P. 269-272.
84. Estriol and its conjugates in late pregnancy determined by extraction with Carbowax B and liquid chromatography with fluorometric detection / F. Andreolini [et al.] // *Clin. Chem.* – 1985. – Vol. 31, № 10. – P. 1698-1702.
85. Susanto, F. A simple high-performance liquid chromatographic determination of mexiletine in human plasma at therapeutic levels / F. Susanto, S. Humfeld, H. Reinauer // *Chromatographia*. – 1986. – Vol. 21. – P. 41-43.
86. Black, R. M. Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in human urine by gas chromatography-mass spectrometry / R. M. Black, R. J. Clark, R. W. Read // *J. Chromatogr. A*. – 1986. – Vol. 367. – P. 103-115.
87. A rapid HPLC method for monitoring plasma levels of caffeine and theophylline using solid phase extraction columns / C. E. Pickard [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 1986. – Vol. 24, pt. 4. – P. 440-446.
88. A simplified thin-layer chromatography system for the detection of commonly abused basic drugs / J. Blakesley [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 1987. – Vol. 24, pt 5. – P. 508-510.

89. Hartley, R. Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of chlormethiazole levels following solid-phase extraction from plasma / R. Hartley, M. Lucock, M. Becker // *J. Chromatogr.* – 1987. – Vol. 415, № 2. – P. 357-364.
90. Hayes, L. W. Concentrations of morphine and codeine in serum and urine after ingestion of poppy seeds / L. W. Hayes, W. G. Krasselt, P. A. Mueggler // *Clin. Chem.* – 1987. – Vol. 33, № 6. – P. 806-808.
91. Lensmeyer, G. L. Identification and analysis of nine metabolites of cyclosporine in whole blood by liquid chromatography. 1: Purification of analytical standards and optimization of the assay / G. L. Lensmeyer, D. A. Wiebe, I. H. Carlson // *Clin. Chem.* – 1987. – Vol. 33, № 10. – P. 1841-1850.
92. Anderson, W. H. A simplified procedure for the isolation, characterization, and identification of weak acid and neutral drugs from whole blood / W. H. Anderson, D. C. Fuller // *J. Anal. Toxicol.* – 1987. – Vol. 11, № 5. – P. 198-204.
93. Taylor, R. W. Simultaneous identification of cocaine and benzoylecgonine using solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry / R. W. Taylor, N. C. Jain, M. P. George // *J. Anal. Toxicol.* – 1987. – Vol. 11. – P. 233-234.
94. Analysis of drugs from biological fluids using disposable solid phase columns / E. Doyle [et al.] // *J. Chromatogr.* – 1987. – Vol. 411. – P. 325-333.
95. Tebbett, I. R. A rapid method for the extraction of cocaine and benzoylecgonine from body fluids / I. R. Tebbett, Q. W. McCartney // *Forensic Sci Int.* – 1988. – Vol. 39, № 3. – P. 287-291.
96. Franke, J. P. Impact of urine matrix and isolation procedure on retention behaviour of basic drugs in thin-layer chromatography / J. P. Franke, R. A. De Zeeuw, J. Wijsbeek // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1988. – Vol. 6, № 4. – P. 415-420.
97. Dumasia, M. C. Biotransformation of 1-dehydrotestosterone in the equine male castrate: identification of the neutral unconjugated and glucuronic acid conjugated metabolites in horse urine / M. C. Dumasia, E. Houghton // *Biomed. Environ Mass Spectrom.* – 1988. – Vol. 17, № 5. – P. 383-392.

98. Musch, G. Isolation of basic drugs from plasma using solid-phase extraction with a cyanopropyl-bonded phase / G. Musch, D. L. Massart // *J. Chromatogr.* – 1988. – Vol. 432. – P. 209–222.
99. Comparative study of extraction methods for the GC and GC-MS screening of urine for beta-blocker abuse / F. T. Delbeke [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1988. – Vol. 6, № 6-8. – P. 827-835.
100. Koves, E. M. The use of gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry for the determination of lorazepam in whole blood / E. M. Koves, B. J. Yen // *Anal. Toxicol.* – 1989. – Vol. 13, № 2. – P. 69-72.
101. Rosenfeld, J. M. Solid-phase sample preparation method for prostaglandins: integration of procedures for isolation and derivatization for gas chromatographic determination / J. M. Rosenfeld, M. Mureika-Russell, M. Love // *J. Chromatogr.* – 1989. – Vol. 489, № 2. – P. 263-272.
102. Logan, B. K. Liquid/solid extraction on diatomaceous earth for drug analysis in postmortem blood / B. K. Logan, D. T. Stafford // *J. Forensic Sci.* – 1989. – Vol. 34, № 3. – P. 553-564.
103. Mazhar, M. Analysis of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in serum using a common solid-phase clean-up and a common mobile phase / M. Mazhar, S. R. Binder // *J. Chromatogr.* – 1989. – Vol. 497. – P. 201-212.
104. Uedelhoven, W. M. Analysis of the major urinary thromboxane metabolites, 2,3-dinorthromboxane B₂ and 11-dehydrothromboxane B₂, by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry / W. M. Uedelhoven, C. O. Meese, P. C. Weber // *J. Chromatogr.* – 1989. – Vol. 497. – P. 1-16.
105. Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify / X. H. Chen [et al.] // *J. Chromatogr.* – 1990. – Vol. 529, № 1. – P. 161-166.
106. Simultaneous detection in urine of cocaine and its main metabolites / J. Ortuño [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1990. – Vol. 8, № 8–12. – P. 911–914.
107. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with

diode array detection / B. K. Logan [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1990. – Vol. 14, № 3. – P. 154159.

108. Dixit, V. Unique solid-phase extraction column for isolation of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid from in human urine / V. A. Dixit, V. M. Dixit // J. of Liquid Chromatogr. – 1990. – Vol. 13. – P. 3313-3325.

109. Antidepressants in serum determined by isolation with two on-line sorbent cartridges and liquid chromatography / G. Carfagnini [et al.] // J. Chromatogr. – 1990. – Vol. 530, № 2. – P. 359-366.

110. Lillsunde, P. Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification / P. Lillsunde, T. Korte // J. Anal. Toxicol. – 1991. – Vol. 15, № 2. – P. 71-81.

111. A derivatization procedure suitable for HPLC analysis of clenbuterol / P. A. Biondi [et al.] // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 29, № 5. – P. 190-193.

112. Cimaterol and clenbuterol residue analysis by HPLC-HPTLC in liver / J. M. Degroodt [et al.] // Z. Lebensm. Unters. Forsch. – 1991. – Vol. 192, № 5. – P. 430-432.

113. Lensmeyer, G. L. Application of the Empore solid-phase extraction membrane to the isolation of drugs from blood. I. Amiodarone and desethylamiodarone / G. L. Lensmeyer, D. A. Wiebe, T. Doran // Ther. Drug. Monit. – 1991. – Vol. 13, № 3. – P. 244-250.

114. Homma, M. pH-dependent column fractionation for characterization of endogenous digoxin-like immunoreactive factors in pregnant urine / M. Homma, T. Hirano, K. Oka // Biomed. Chromatogr. – 1991. – Vol. 5, № 4. – P. 175-179.

115. Lensmeyer, G. L. Application of a novel form of solid-phase sorbent (Empore membrane) to the isolation of tricyclic antidepressant drugs from blood / G. L. Lensmeyer, D. A. Wiebe, B. A. Darcey // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 29, № 10. – P. 444-449.

116. High-performance liquid chromatographic determination of morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide and codeine in biological samples using multi-wavelength forward optical detection / G. Chari [et al.] // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 571, № 1-2. – P. 263-270.

117. Balı'kova, M. Selective system of identification and determination of antidepressants and neuroleptics in serum or plasma by solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection in analytical toxicology / M. Balı'kova // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 58. – P. 175-181.
118. Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine / S. D. Ferrara [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1992. – Vol. 16. – P. 217-222.
119. Alcohol-specific cocaine metabolites in serum and urine of hospitalized patients / A. H. Wu [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1992. – Vol. 16. – P. 132-136.
120. Wernly, P. Drug of abuse confirmation in human urine using stepwise solid-phase extraction and micellar electrokinetic capillary chromatography / P. Wernly, W. Thormann // Anal. Chem. – 1992. – Vol. 64, № 18. – P. 2155-2159.
121. Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column / X. H. Chen [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1992. – Vol. 16, № 6. – P. 351-355.
122. A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine / X. H. Chen [et al.] // J. Forensic Sci. – 1992. – Vol. 37, № 1. – P. 61-71.
123. Analysis of meconium for cocaine in neonates / S. P. Browne [et al.] // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 575, № 1. – P. 158-161.
124. Solid-phase extraction and RP-HPLC screening procedure for diuretics, probenecid, caffeine and pemoline in urine / X. Jin [et al.] // Yao Xue Xue Bao. – 1992. – Vol. 27, № 11. – P. 875-880.
125. Determination of the HMG-CoA reductase inhibitors simvastatin, lovastatin, and pravastatin in plasma by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry / M. J. Morris [et al.] // Biol. Mass Spectrom. – 1993. – Vol. 22, № 1. – P. 1-8.
126. High-performance liquid chromatographic determination of morphine and its metabolites in plasma using diode-array detection / D. Wielbo [et al.] // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 615, № 1. – P. 164-168.

127. Semi-automated solid-phase extraction procedure for drug screening in biological fluids using the ASPEC system in combination with Clean Screen DAU columns / X. H. Chen [et al.] // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 613, № 2. – P. 289-294.
128. Short Communication Study of lot-to-lot reproducibilities of Bond Elut Certify and Clean Screen DAU mixed-mode solid-phase extraction columns in the extraction of drugs from whole blood / X. H. Chen [et al.] // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 617, № 1. – P. 147-151.
129. Reusability of Bond Elut Certify columns for the extraction of drugs from plasma / X. H. Chen [et al.] // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 619, № 1. – P. 137-142.
130. Solid phase extraction of morphine from whole blood by means of Bond Elut Certify columns / X. H. Chen [et al.] // Forensic Sci. – 1993. – Vol. 38, № 3. – P. 668-676.
131. Delbeke, F. T. Determination of alclofenac in equine plasma and urine by high-performance liquid chromatography / F. T. Delbeke, J. Landuyt, M. Debackere // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 621, № 2. – P. 209-214.
132. Pitfalls and solutions in the development of a fully automated solid-phase extraction method for drug screening purposes in plasma and whole blood / X. H. Chen [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1993. – Vol. 17, № 7. – P. 421-426.
133. Determination of basic drugs extracted from biological matrices by means of solid-phase extraction and wide-bore capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection plasma / X. H. Chen [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1994. – Vol. 18, № 3. – P. 150-153.
134. Toxicological analysis of whole blood samples by means of Bond-Elut Certify columns and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection / P. G. Zweipfenning [et al.] // J. Chromatogr. A. – 1994. – Vol. 674, № 1-2. – P. 87-95.
135. Corburt, M. R. Gas chromatography/mass spectrometry for the determination of cocaine and benzoylecgonine over a wide concentration range (< 0.005 -5 mg/dL) in postmortem blood / M. R. Corburt, E. M. Koves // J. Forensic Sci. – 1994. – Vol. 39, № 1. – P. 136-49.

136. Koves, E. M. Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology / E. M. Koves // J. Chromatogr. A. – 1995. – Vol. 692, № 1-2. – P. 103-119.
137. Determination of cocaine and its metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry after simultaneous use of cocaine and ethanol / R. de la Torre [et al.] // J. Pharm. Biomed Anal. – 1995. – Vol. 13, № 3. – P. 305-312.
138. Comprehensive screening procedure for detection of stimulants, narcotics, adrenergic drugs, and their metabolites in human urine / A. Solans [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1995. – Vol. 19, № 2. – P. 104-114.
139. Cosbey, S. H. Novel solid-phase extraction strategy for the isolation of basic drugs from whole blood. Preliminary study using commercially available extraction cartridges / S. H. Cosbey, I. Craig, R. Gill // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1995. – Vol. 669, № 2. – P. 229-235.
140. Takeda, A. Simultaneous analysis of tiaramide metabolites in horse urine and plasma by solid-phase extraction and reversed-phase ion-pair liquid chromatography / A. Takeda, T. Shinohara // J. Anal. Toxicol. – 1995. – Vol. 19, № 6. – P. 435-442.
141. Svensson, J. O. Determination of ketamine and norketamine enantiomers in plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/ J. O. Svensson, L. L. Gustafsson // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1996. – Vol. 678, № 2. – P. 373-376.
142. Sakamoto, T. Hair analysis for drugs of abuse XII. Determination of PCP and its major metabolites, PCHP and PPC, in rat hair after administration of PCP / T. Sakamoto, A. Tanaka, Y. Nakahara // J. Anal. Toxicol. – 1996. – Vol. 20, № 2. – P. 124-130.
143. An enzymic digestion and solid-phase extraction procedure for the screening for acidic, neutral, and basic drugs in liver using gas chromatography for analysis / Z. P. Huang [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1996. – Vol. 20, № 4. – P. 248-254.
144. Applicability of various brands of mixed-phase extraction columns for opiate extraction from blood and serum / M. J. Bogusz [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1996. – Vol. 683, № 2. – P. 177-188.

145. Phillips, D. L. Comparison of HPLC and GC-MS for measurement cocaine and metabolites in human urine / D. L. Phillips, I. R. Tebbett, R. L. Bertholf // J. Anal. Toxicol. – 1996. – Vol. 20, № 5. – P. 305-308.
146. Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS / H. J. Helmlin [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1996. – Vol. 20, № 6. – P. 432-440.
147. Degel, F. Comparison of new solid-phase extraction methods for chromatographic identification of drugs in clinical toxicological analysis / F. Degel // Clin. Biochem. – 1996. – Vol. 29, № 6. – P. 529-540.
148. Gas chromatographic quantitation of dextropropoxyphene and norpropoxyphene in urine after solid-phase extraction / G. Amalfitano [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1996. – Nov-Dec. – Vol. 20, № 7. – P. 547-554.
149. Lai, C. K. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection / C. K. Lai // Clin. Chem. – 1997. – Vol. 43, № 2. – P. 312-325.
150. Svensson, J. O. Determination of rapamycin in whole blood by HPLC / J. O. Svensson, C. Brattström, J. Säwe // Ther. Drug. Monit. – 1997. – Vol. 19, № 1. – P. 112-116.
151. Svensson, J. O. Determination of acyclovir and its metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine in serum and urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography / J. O. Svensson, L. Barkholt, J. Säwe // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1997. – Vol. 690. – № 1–2. – P. 363-366.
152. Plasma concentrations of heroin and morphine-related metabolites after intranasal and intramuscular administration / G. Skopp [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1997. – Vol. 21, № 2. – P. 105-111.
153. Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. J. Bogusz [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1997. – Vol. 703, № 1–2. – P. 115-127.

154. Hair analysis for drugs of abuse. XVII. Simultaneous detection of PCP, PCHP, and PCPdiol in human hair for confirmation of PCP use / Y. Nakahara [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1997. – Vol. 21, № 5. – P. 356-362.
155. Nakahara, Y. Hair analysis for drugs of abuse. XIX. Determination of ephedrine and its homologs in rat hair and human hair / Y. Nakahara, R. Kikura // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1997. – Vol. 700, № 1-2. – P. 83-91.
156. Evaluation of reduced solvent volume solid-phase extraction cartridges with analysis by gas chromatography-mass spectrometry for determination of 11-nor-9-carboxy-delta 9-THC in urine / L. O'Dell [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1997. – Vol. 21, № 6. – P. 433-437.
157. Postmortem distribution of dihydrocodeine and metabolites in a fatal case of dihydrocodeine intoxication / G. Skopp [et al.] // Forensic Sci Int. – 1998. – Vol. 95, № 2. – P. 99-107.
158. Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry / A. Poletti [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1998. – Vol. 713, № 1. – P. 265-279.
159. Slawson, M. H. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation / M. H. Slawson, D. G. Wilkins, D. E. Rollins // J. Anal. Toxicol. – 1998. – Vol. 22, № 6. – P. 406-413.
160. Determination of pilocarpic acid in human plasma by capillary gas chromatography with mass-selective detection / K. L. Birk [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1998. – Vol. 719, № 1-2. – P. 93-102.
161. Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry / M. J. Bogusz [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1998. – Vol. 22, № 7. – P. 549-558.
162. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. J. Bogusz [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1999. – Vol. 732, № 2. – P. 257-269.

163. Quantification of 3,4-methylenedioxymetamphetamine and its metabolites in plasma and urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection / J. Ortuño [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1999. – Vol. 723, № 1–2. – P. 221-232.
164. Koole, A. Multiresidue analysis of beta2-agonist in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / A. Koole [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 1999. – Vol. 726, № 1-2. – P. 149-156.
165. Galloway, F. R. Methadone conversion to EDDP during GC-MS analysis of urine samples / F. R. Galloway, N. F. Bellet // J. Anal. Toxicol. – 1999. – Vol. 23, № 7. – P. 615-619.
166. Simultaneous determination of prostaglandin E1, prostaglandin E0 and 15-keto-prostaglandin E0 in human plasma by gas chromatography/negative-ion chemical-ionization tandem mass spectrometry / W. Hammes [et al.] // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 847, № 1-2. – P. 187-202.
167. Quantitative determination of LSD and a major metabolite, 2-oxo-3-hydroxy-LSD, in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry / S. A. Reuschel [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1999. – Vol. 23, № 5. – P. 306-312.
168. van Hout, M. W. Coupling device for desorption of drugs from solid-phase extraction-pipette tips and on-line gas chromatographic analysis / M. W. van Hout, R. A. de Zeeuw, G. J. de Jong // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 858, № 1. – P. 117-122.
169. Gidal, B. E. Therapeutic monitoring of topiramate: evaluation of the saturable distribution between erythrocytes and plasma of whole blood using an optimized high-pressure liquid chromatography method / B. E. Gidal, G. L. Lensmeyer // Ther. Drug. Monit. – 1999. – Vol. 21, № 5. – P. 567-576.
170. Rapid extraction of clenbuterol from human and calf urine using empore C8 extraction disks / A. Koole [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1999. – Vol. 23, № 7. – P. 632-635.

171. Toennes, S. W. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) in human serum as evidence of recent smoking of crack / S. W. Toennes, A. S. Fandiño, G. Kauert // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl.* – 1999. – Vol. 735, № 1. – P. 127-132.
172. de Zeeuw, R. A. SPEC disc solid-phase extraction for rapid broad-spectrum drug screening in urine / R. A. de Zeeuw, J. Wijsbeek, J. P. Franke // *J. Anal. Toxicol.* – 2000. – Vol. 24, № 2. – P. 97-101.
173. Analysis of six anticonvulsant drugs using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry / D. J. Speed [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2000. – Vol. 24, № 8. – P. 685-690.
174. Quantitative determination of alpha-cyclodextrin in human plasma by liquid chromatography/positive ion electrospray mass spectrometry / W. Hammes // *J. Mass Spectrom.* – 2000. – Vol. 35, № 3. – P. 378-384.
175. Bogusz, M. J. Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. J. Bogusz, K. D. Krüger, R. D. Maier // *J. Anal. Toxicol.* – 2000. – Vol. 24, № 2. – P. 77-84.
176. Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry / H. Inoue [et al.] // *Forensic Sci Int.* – 2000. – Vol. 113, № 1–3. – P. 367-373.
177. Screening Method for Seventy Psychoactive Drugs or Drug Metabolites in Serum Based on High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry / M. Rittner [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2001. – Vol. 25, № 2. – P. 115-124.
178. Improved solid-phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids / T. Soriano [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2001. – Vol. 25, № 2. – P. 137-143.
179. Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas

chromatography-mass spectrometry / A. Takeda [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 2001. – Vol. 758, № 2. – P. 235-248.

180. Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection / E. Lacassie [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 2001. – Vol. 759, № 1. – P. 109-116.

181. Detection of non-prescription heroin markers in urine with liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / M. J. Bogusz [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2001. – Vol. 25, № 6. – P. 431-438.

182. Kauert, G. F. Routineanalytik basischer Suchstoffe aus Humanserum / G. F. Kauert // Laborpraxis. – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 32-34.

183. Analysis of paracetamol using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry / D. J. Speed [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2001. – Vol. 25, № 3. – P. 198-202.

184. Poletti, A. Simultaneous determination of buprenorphine, norbuprenorphine, and buprenorphine-glucuronide in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. Poletti, M. A. Huestis // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 2001. – Vol. 754, № 2. – P. 447-459.

185. Svensson, J. O. Determination of ketobemidone and its metabolites in plasma and urine using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry / J. O. Svensson, J. Säwe, A. AL-Shurbaji // Ther. Drug. Monit. – 2001. – Vol. 23, № 4. – P. 399-405.

186. Opiates: Use or Abuse? Quantification of Opiates in human urine [Электронный ресурс] / M. Wood [et al.] // Drugs of abuse analysis application notebook. – Waters Corporation, 2007. – P. 19–20. – Режим доступа: http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/lc_ms_toxicology_waters.pdf (дата обращения: 20.09.2018).

187. Hair analysis for pharmaceutical drugs. II. Effective extraction and determination of sildenafil (Viagra) and its N-desmethyl metabolite in rat and human hair by GC-MS / K. Saisho [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2001. – Vol. 24, № 12. – P. 1384-1388.

188. Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry / D. Borrey [et al.] // J. Chromatogr. B Biomed. Sci Appl. – 2001. – Vol. 765, № 2. – P. 187-197.
189. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites. Evaluation of a method by interlaboratory comparison / M. Montagna [et al.] // Forensic Sci Int. – 2002. – Vol. 128, № 1-2. – P. 79-83.
190. Salting out improves solid-phase extraction recoveries on Absolut-Tox columns for broad spectrum drug screening / J. Bosman [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2002. – Vol. 26, № 1. – P. 48-51.
191. Determination of MDMA and its metabolites in blood and urine by gas chromatography-mass spectrometry and analysis of enantiomers by capillary electrophoresis / N. Pizarro [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2002. – Vol. 26, № 3. – P. 157-165.
192. Scopp, G. Stability of 11-nor- Δ^9 -carboxy tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography- tandem mass spectrometry / G. Scopp, L. Potsch // Clin. Chem. – 2002. – Vol. 48, № 2. – P. 301-306.
193. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection applied to the analysis of 3,4-dihydroxymethamphetamine in human plasma and urine / M. Segura [et al.] // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2002. – Vol. 769, № 2. – P. 313-321.
194. A general screening method for acidic, neutral, and basic drugs in whole blood using the Oasis MCX column / J. Yawney [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2002. – Vol. 26, № 6. – P. 325-332.
195. Martínez, M. A. Simultaneous determination of viloxazine, venlafaxine, imipramine, desipramine, sertraline, and amoxapine in whole blood: comparison of two extraction/cleanup procedures for capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection / M. A. Martínez, Sánchez de la Torre, E. Almarza // J. Anal. Toxicol. – 2002. – Vol. 26, № 5. – P. 296-302.
196. Determination and quantification of clonidine in human blood serum / T. Wenzl [et al.] // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – Vol. 53, № 1-3. – P. 131-139.

197. Analysis of flecainide and two metabolites in biological specimens by HPLC: application to a fatal intoxication // T. Benijts [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 47-52.
198. Springer, D. Metabolism of the new designer drug α -pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry / D. Springer, G. Fritschi, H. H. Maurer // J. Chromatogr. B. – 2003. – Vol. 796. – P. 253-266.
199. Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric analysis of opiates and metabolites in rat urine after inhalation of opium / R. Kikura-Hanajiri [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2003. – Vol. 789. – P. 139-150.
200. Martínez, M. A. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluoxetine, amitriptyline, nortriptyline, trimipramine, maprotiline, clomipramine, and trazodone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection / M. A. Martínez, Sánchez de la Torre, E. Almarza // J. Anal. Toxicol. – 2003. – Vol. 27, № 6. – P. 353-358.
201. Martínez, M. A. A comparative solid-phase extraction study for the simultaneous determination of fluvoxamine, mianserin, doxepin, citalopram, paroxetine, and etoperidone in whole blood by capillary gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection / M. A. Martínez, Sánchez de la Torre, E. Almarza // J. Anal. Toxicol. – 2004. – Vol. 28, № 3. – P. 174-80.
202. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry / M. J. Bogusz [et al.] // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2004. – Vol. 807, № 2. – P. 343-356.
203. Fatal Datura poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry / P. A. Steenkamp [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2004. – Vol. 145. – P. 31-39.
204. Baniceru, M. Determination of some local anesthetics in human serum by gas chromatography with solidphase extraction / M. Baniceru, O. Croitoru, S. M. Popescu // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 35. – P. 593-598.

205. Determination of phenprocoumon, warfarin and their monohydroxylated metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction / M. Ufer [et al.] // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2004. – Vol. 809, № 2. – P. 217-226.
206. Sánchez de la Torre, C. Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures / Sánchez de la Torre, M. A. Martínez, E. Almarza // Forensic Sci Int. – 2005. – Vol. 155, № 2-3. – P. 193-204.
207. Poquette, M. A. Effective use of liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) in the routine clinical laboratory for monitoring sirolimus, tacrolimus, and cyclosporine / M. A. Poquette, G. L. Lensmeyer, T. C. Doran // Ther. Drug. Monit. – 2005. – Vol. 27, № 2. – P. 144-150.
208. Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE) / J. X. Shen [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 37, № 2. – P. 359.
209. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma / P. Fernandez [et al.] // Forensic Sci Int. – 2006. – Vol. 161. – P. 31-35.
210. Josefsson, M. Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood--a study on a number of beta-agonists and beta-antagonists / M. Josefsson, A. Sabanovic // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1120, № 1-2. – P. 1-12.
211. Cordero, R. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS / R. Cordero, S. Paterson // J. Chromatogr. B. – 2007. – Vol. 850. – P. 423-431.
212. Electrospray LC-MS method with solid-phase extraction for accurate determination of morphine-, codeine-, and ethylmorphine-glucuronides and 6-acetylmorphine in urine / J. O. Svensson [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2007. – Vol. 31, № 2. – P. 81-86.

213. Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography/fluorescence detection / N. Kato [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1145. – P. 229-233.
214. Simultaneous determination of thirteen plant alkaloids in a human specimen by SPE and HPLC / J. Pietsch [et al.] // J. Sep. Sci. – 2008. – Vol. 31. – P. 2410-2416.
215. Detection of ketamine and its metabolites in urine by ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. C. Parkin [et al.] // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2008. – Vol. 876, № 1. – P. 137-142.
216. Juhascik, M. P. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs / M. P. Juhascik, A. J. Jenkins // J. Chromatogr. Sci. – 2009. – Vol. 47, № 7. – P. 553-557.
217. Elia, A. A. Solid-phase extraction and analysis of THC and carboxy-THC from whole blood using a novel fluorinated solid-phase extraction sorbent and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry / A. A. Elia, J. Hackett // J. Anal. Toxicol. – 2009. – Vol. 33, № 8. – P. 461-468.
218. Onnerud, H. Chromatographic behavior of bupivacaine and five of its major metabolites in human plasma, utilizing solid-phase extraction and capillary gas chromatography / H. Onnerud, F. Bassiouny, M. Abdel-Rehim // J. Chromatogr. Sci. – 2010. – Vol. 48, № 4. – P. 294-298.
219. Карцова, Л. А. Использование сверхсшитого полистирола как сорбента для твердофазной экстракции при анализе лекарств в биологических объектах методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) / Л. А. Карцова [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10, вып. 1. – С. 5-14.
220. Cordero, R. Distribution of Concentrations of Cocaine and its metabolites in hair Collected Postmortem from Cases with Diverse Causes/Circumstances of Death / R. Cordero, S. Lee, S. Paterson // J. Anal. Toxicol. – 2010. – Vol. 34. – P. 543-548.
221. Simultaneous determination of phthalates and adipates in human serum using gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction / Z. Y. Guo [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2010. – Vol. 24, № 10. – P. 1094-1099.

222. Determination of nandrolone metabolites in human urine: comparison between liquid chromatography/tandem mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry / F. Buiarelli [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24, № 13. – P. 1881-1894.
223. Идентификация метилendioксипировалерона и его метаболитов в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев [и др.] // *Проблемы экспертизы в медицине.* – 2010. – Т. 10, № 3-4. – С. 32-35.
224. Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of phencyclidine in human serum and its application to human drug abuse cases / K. C. Chimalakonda [et al.] // *Anal. Methods.* – 2010. – Vol. 2, № 9. – P. 1249-1254.
225. Kataev, S. S. Quantitative determination of strychnine in blood and urine by gas chromatography with mass-selective detector / S. S. Kataev, E. A. Krylova // *Sud. Med. Ekspert.* – 2010. – Vol. 53, № 6. – P. 35-38.
226. Determination of eight selected organophosphorus insecticides in postmortem blood samples using solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry / R. Raposo [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24, № 21. – P. 3187-3194.
227. Chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures / A. Grigoryev [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 1126-1136.
228. Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures / A. Grigoryev [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 2519-2526.
229. Solid-Phase Extraction and Quantitative Measurement of Omega and Omega-1 Metabolites of JWH-018 and JWH-073 in Human Urine / K. C. Chimalakonda [et. al] // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83, № 16. – P. 6381-6388.
230. Extraction of Acidic Drugs from Plasma with Polymeric SP: application note [Электронный ресурс] / W. Hudson [et al.]; Agilent Technologies Inc. – Режим

доступа: <http://cn.agilent.com/cs/library/applications/5990-7684EN.pdf> (дата обращения: 20.09.2018).

231. Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography-mass spectrometry / T. Kumazawa // J. Chromatogr. A. – 2011. – Vol. 1218, № 18. – P. 2521-2527.

232. Магнитная сепарация как альтернативный способ экстракции допинговых препаратов новых классов из мочи человека / И. И. Суханова [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т. 12, вып. 2. – С. 283-294.

233. Simultaneous analysis of some club drugs in whole blood using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry / A. L. Castro [et al.] // J. Forensic Leg. Med. – 2012. – Vol. 19, № 2. – P. 77-82.

234. Azzouz, A. Gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmacologically active substances in urine and blood samples by use of a continuous solid-phase extraction system and microwave-assisted derivatization / A. Azzouz, E. Ballesteros // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2012. – Vol. 891–892. – P. 12-19.

235. Sobolevsky, T. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids / T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov // Drug Test. Anal. – 2012. – Vol. 4. – P. 745-753.

236. A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry / I. Kosarac [et al.] // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2012. – Vol. 898. – P. 90-94.

237. New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and their detectability in urine / M. R. Meyer [et al.] // J. Mass Spectrom. – 2012. – Vol. 47. – P. 253-262.

238. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях человека и крыс / А. М. Григорьев [и др.] // Наркология. – 2012. – Т. 11. – С. 75-86.
239. Targeted Metabolomic Approach for Assessing Human Synthetic Cannabinoid Exposure and Pharmacology / A. L. Patton [et. al] // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85. – P. 9390-9399.
240. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites) / M. Fernandez [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2014. – Vol. 965. – P. 7-18.
241. Specialty Carbon Adsorbents [Электронный ресурс]. – Режим доступа: sigmaaldrich.com/carbon.
242. Bond Elut Certify: instruction manual / Analytichem International. – Harbor City, CA, 1988.
243. G. Lubli, C. Neri, S. Chiminazzo, L. Bonizzato, M. Marigo // V. McLinden (Ed.), Proceedings 27th TIAFT meeting. – Perth, 1990. – P. 258-273.
244. Postmortem tissue samples: an alternative to urine and blood for drug analysis in racehorses / C. E. Uboh [et al.] // J. Anal Toxicol. – 1995. – Vol. 19, № 5. – P. 307-315.
245. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA – Europol 3013. Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA: implementation reports [Электронный ресурс] / Publications Office of the European Union. – Luxembourg, 2014. – Режим доступа: http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_229598_EN_TDAN14001ENN.pdf (дата обращения: 18.07.2016).
246. Meyer, M. R. Analytical toxicology of new psychoactive substances / M. R. Meyer // Современная химико-токсикологическая экспертиза : материалы 1 междунар. науч.-практ. конф. «ASTE 2013». – Москва, 2013. – С. 3.
247. Лабораторная диагностика острых отравлений синтетическими каннабимиметиками / М. А. Гофенберг [и др.] // Наркология. – 2014. – № 12. – С. 44-48.

248. Дизайнерские наркотики. Классификации, механизмы токсичности / А. И. Головкин [и др.] // Наркология. – 2015. – № 8. – С. 69-85.
249. Acetylfentanyl : critical review report. Agenda item 5.2. : Expert Committee on Drug Dependence 37th Meeting. Geneva 16–20, November 2015. – World Health Organization (WHO), 2015.
250. Ogilvie, L. Notes from the Field: Acetyl Fentanyl Overdose Fatalities – Rhode Island, March-May 2013 / L. Ogilvie [et al.] // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2013. – Vol. 62. – P. 70–704.
251. Pennsylvania Department of Drug and Alcohol Programs. Department of Drug and Alcohol Programs warns about acetyl fentanyl: drug caused at least 50 fatalities in 2013 in Pennsylvania [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.pa.gov/portal/server.pt/document/134588/departement of drug and alcohol programs warns about acetyl fentanyl](http://www.pa.gov/portal/server.pt/document/134588/departement%20of%20drug%20and%20alcohol%20programs%20warns%20about%20acetyl%20fentanyl) (дата обращения: 16.05.2016).
252. Acetyl fentanyl overdose fatalities-Rhode Island, March-May 2013. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2013. – Vol. 62, № 34. – P. 703-704.
253. Notes from the field: increase in fentanyl-related overdose deaths - Rhode Island, November 2013-March 2014 / M. C. Mercado-Crespo [et al.] ; EIS officer, CDC // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. – 2014. – Vol. 63, № 24. – P 531.
254. Stogner, J. M. The potential threat of acetyl fentanyl: legal issues, contaminated heroin, and acetyl fentanyl "disguised" as other opioids / J. M. Stogner // Ann Emerg Med. – 2014. – Vol. 64, № 6. – P. 637-639.
255. Expert Committee on Drug Dependence (ECDD) (2015) Report on WHO questionnaire for review of psychoactive substances for the 37th ECDD: evaluation of acetylfentanyl. Agenda item 5.2 acetylfentanyl. 37-th ECDD Meeting, 2015 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/ecdd/en/> (дата обращения: 25.04.2016).
256. Helander, A Intoxications involving the fentanyl analogs acetylfentanyl, 4-methoxybutyrfentanyl and furanylfentanyl: results from the Swedish STRIDA project

/ A. Helander, M. Bäckberg, O. Beck // Clin. Toxicol. (Phila). – 2016. – Vol. 54, № 4. – P. 324-332.

257. О внесении изменений в некоторые акты Правительства РФ в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств [Электронный ресурс] : постановление Правительства Рос. Федерации от 23.11.2012. № 1215. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_138288/, свободный.

258. Acetyl fentanyl: Reporting form on new psychoactive drug. Germany. 18.09.2013 / Europol, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) // European Database on New Drugs (EDND).

259. Old opioids, new concerns: the case of Acetylfentanyl / M. Katselou [et al.] // Forensic Toxicol. – 2016. – Vol. 34, № 2. – P. 201-212.

260. Zawilska, J. B. An expanding world of novel psychoactive substances: opioids / J. B. Zawilska // Front. Psych. – 2017. – Vol. 8, № 6. – P. 110.

261. Collier, R. Street versions of opioids more potent and dangerous / R. Collier // Can. Med. Assoc. J. – 2013. – Vol. 185. – P. 1027.

262. European Database on New Drugs (EDND) [Электронный ресурс] / European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). – Режим доступа: <https://ednd-cma.emcdda.europa.eu/>, ограничен.

263. Schedules of Controlled Substances: Temporary Placement of Acetyl Fentanyl Into Schedule I. Final order / Drug Enforcement Administration, Department of Justice // Fed. Regist. – 2015. – Vol. 80, № 137. – P. 42381-42385.

264. Higashikawa, Y. Studies on 1-(2-phenethyl)-4-(N-propionylanilino)piperidine (fentanyl) and its related compounds. VI. Structure–analgesic activity relationship for fentanyl, methyl-substituted fentanyls and other analogues / Y. Higashikawa, S. Suzuki // Forensic Toxicol. – 2008. – Vol. 26. – P. 1-5.

265. An autopsy case of acetyl fentanyl intoxication caused by insufflation of 'designer drugs' / I. Takase [et al.] // Leg. Med. (Tokyo). – 2016. – Vol. 21. – P. 38-44.

266. Exploring synthetic heroin: Accounts of acetyl fentanyl use from a sample of dually diagnosed drug offenders / J. M. Miller [et al.] // *Drug Alcohol Rev.* – 2018. – Vol. 37, № 1. – P. 121-127.
267. Rogers, J. S. Acetylfentanyl: An Emerging Drug of Abuse / J. S. Rogers, S. J. Rehrer, N. R. Hoot // *J. Emerg. Med.* – 2016. – Vol. 50, № 3. – P. 433-436.
268. Quantitative Measurement of Acetyl Fentanyl and Acetyl Norfentanyl in Human Urine by LC-MS/MS / A. L. Patton [et al.] // *Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 86. – P. 1760.
269. Isenschmid, D. Case findings in 18 acetylfentanyl related deaths / D. Isenschmid, S. Kacinko, B. Logan // *World Forensic Festival, IAFS.* – Seoul, 2014.
270. An acute acetyl fentanyl fatality: a case report with postmortem concentrations / I. M. McIntyre [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2015. – Vol. 39. – P. 490-494.
271. Postmortem distribution of acetyl fentanyl / X. Zhang [et al.] // *67th Annual Meeting of AAFS, Orlando, Florida, 2015.*
272. Cunningham, S. M. Fatal Intoxication with Acetyl Fentanyl / S. M. Cunningham, N. A. Haikal, J. C. Kraner // *J Forensic Sci.* – 2016. – Vol. 61, Suppl 1. – S. 276-280.
273. Acetyl Fentanyl Toxicity: Two Case Reports / C. Fort [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2016. – Vol. 40, № 9. – P. 754-757.
274. Jorge, R. Deaths in Europe associated with acetylphenyanyl [Электронный ресурс] / R. Jorge // *EU Early Warning System Alert, EMCDDA.* – 2015. – Режим доступа:
https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index7246EN.html?LayoutFormat=print&ALE_ID=133.
275. Evans-Brown, M. Subject: 2 deaths associated with acetylfentanyl in the United Kingdom / M. Evans-Brown // *EU Early Warning System Alert / EMCDDA.* – 2015.
276. A fatal poisoning case by intravenous injection of "bath salts" containing acetyl fentanyl and 4-methoxy PV8 / K. Yonemitsu [et. al] // *Forensic Sci Int.* – 2016. – Vol. 267. – P. e6–e9.
277. Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn / E. N. Shoff [et al.] // *J/ Anal. Toxicol.* – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 484-492.

278. Postmortem tissue distribution of acetyl fentanyl, fentanyl and their respective nor-metabolites analyzed by ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry / J. Poklis [et al.] // *Forensic Sci Int.* – 2015. – Vol. 257. – P. 435-441.
279. Postmortem Toxicology Findings of Acetyl Fentanyl, Fentanyl, and Morphine in Heroin Fatalities in Tampa, Florida / J. Pearson [et al.] // *Acad. Forensic Pathol.* – 2015. – Vol. 5, № 4. – P. 676-689.
280. An Acute Butyr-Fentanyl Fatality: A Case Report with Postmortem Concentrations / McIntyre I. // *J. Anal. Toxicol.* – 2016. – Vol. 40, № 2. – P. 162-166.
281. Two Fatal Intoxications Involving Butyryl Fentanyl / J. Poklis [et al.] // *J Anal. Toxicol.* – 2016. – Vol. 40, № 8. – P. 703-708.
282. Identification and quantification of mepirapim and acetyl fentanyl in authentic human whole blood and urine samples by GC-MS/MS and LC-MS/MS / A. Mochizuki [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2018. – Vol. 36, № 1. – P. 81-87.
283. Stogner, J. M. The potential threat of acetyl fentanyl: legal issues, contaminated heroin, and acetyl fentanyl “disguised” as other opioids / J. M. Stogner // *Ann. Emerg. Med.* – 2014. – Vol. 64, № 6. – P. 637-639.
284. Cross-reactivity of acetyl fentanyl and risperidone with a fentanyl immunoassay / B-T. Wang [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2014. – Vol. 38. – P. 672-675.
285. Detection of fentanyl and its analogues by enzyme-linked immunosorbent assay / W. Ruangyuttikarn [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 1990. – Vol. 14. – P. 160-164.
286. Determination of newly encountered designer drugs a-PHP and acetylfentanyl in an acute intoxication case by LC/Q-TOF MS / K. Hisatsune [et al.] // 53rd TIAFT Meeting. – Firenze 2015.
287. An LC-MS-MS Method for the Analysis of Carfentanil, 3-Methylfentanyl, 2-Furanyl Fentanyl, Acetyl Fentanyl, Fentanyl and Norfentanyl in Postmortem and Impaired-Driving Cases / S. Sofalvi [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 473-483.
288. Analysis of fentanyl analogs and novel synthetic opioids in blood, serum/plasma, and urine in forensic casework / M. T. Moody [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2018. – Vol.

10, № 9. – P. 1358-1367.

289. LC-MS/MS-Based Method for the Multiplex Detection of 24 Fentanyl Analogues and Metabolites in Whole Blood at Sub ng mL Concentrations / K. E. Strayer [et al.] // ACS Omega. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 514-523.

290. Qualitative Identification of Fentanyl Analogs and Other Opioids in Postmortem Cases by UHPLC-Ion Trap-MSn / E. N. Shoff [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2017. – Vol. 41, № 6. – P. 484-492.

291. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS / V. A. Boumba [et al.] // Forensic Sci Int. – 2017. – Vol. 279. – P. 192-202.

292. Николаева, Э. Г. Обнаружение ацетилфентанила в биологических образцах и идентификация его метаболитов методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии / Э. Г. Николаева, А. М. Григорьев, Н. А. Крупина // Судебная медицина. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 113-115.

293. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid / V. Shevyrin [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2013. – Vol. 232. – P. 1-10.

294. Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative α -PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products / N. Uchiyama [et al.] // Forensic Toxicol. – 2013. – Vol. 31. – P. 223-240.

295. Identification of two new-type designer drugs, piperazine derivative MT-45 (I-C6) and synthetic peptide noopept (GVS-111), with synthetic cannabinoid A-834735, cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP, and phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal products / N. Uchiyama [et al.] // Forensic Toxicol. – 2014. – Vol. 32. – P. 9-18.

296. О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств, прекурсоров наркотических средств и психотропных веществ [Электронный ресурс] : постановление Правительства Рос. Федерации от

- 10.07.2013 № 580. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_149241/, ограничен.
297. О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств [Электронный ресурс] : постановление Правительства Рос. Федерации от 09.09.2013 № 788. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_151639/, свободный.
298. О внесении изменений в некоторые акты Правительства Российской Федерации в связи с совершенствованием контроля за оборотом наркотических средств и психотропных веществ [Электронный ресурс] : постановление Правительства Рос. Федерации от 22.03.2014 № 224. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_160990/, свободный.
299. Schedules of controlled substances: temporary placement of four synthetic cannabinoids into Schedule I. Final order / Drug Enforcement Administration, Department of Justice // Fed Regist. – 2014. – Vol. 79, № 27. – P. 7577-7582.
300. Schedules of Controlled Substances: Extension of Temporary Placement of PB-22, 5F-PB-22, AB-FUBINACA and ADB-PINACA in Schedule I of the Controlled Substances Act. Final order / Drug Enforcement Administration, Department of Justice // Fed. Regist. – 2016. – Vol. 81, № 24. – P. 6175-6177.
301. Drugs-Forum. Experiences – 5F-AKB48, BB-22, 5F-PB22, STS-135 Last Gen Noids comparison from experience [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://drugs-forum.com/forum/showthread.php?t=226101>.
302. Delayed seizure-like activity following analytically confirmed use of previously unreported synthetic cannabinoid analogues / L. J. Schep [et al.] // Hum. Exp. Toxicol. – 2015. – Vol. 34. – P. 557-560.
303. ‘Crazy monkey’ poisons man and dog: human and canine seizures due to PB-22, a novel synthetic cannabinoid / H. Gugelmann [et al.] // Clin. Toxicol. (Phila). – 2014. – Vol. 52. – P. 635-638.

304. Acute Toxicity Associated with Use of 5F-Derivations of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists with Analytical Confirmation / R. Abouchdid [et al.] // J. Med. Toxicol. – 2016. – Vol. 12, № 4. – P. 396-401.
305. Kaneko, S. Motor vehicle collisions caused by the 'super-strength' synthetic cannabinoids, MAM-2201, 5F-PB-22, 5F-AB-PINACA, 5F-AMB and 5F-ADB in Japan experienced from 2012 to 2014 / S. Kaneko // Forensic Toxicol. – 2017. – Vol. 35, № 2. – P. 244-251.
306. Four postmortem case reports with quantitative detection of the synthetic cannabinoid, 5F-PB-22 // G. Behonick [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2014. – Vol. 38, № 8. – P. 559-562.
307. Functional effects of synthetic cannabinoids versus Δ_9 -THC in mice on body temperature, nociceptive threshold, anxiety, cognition, locomotor/exploratory parameters and depression / S. Schreiber [et al.] // Addict Biol. – 2018. – Feb. 8.
308. Gatch, M. B. Δ_9 -Tetrahydrocannabinol-like discriminative stimulus effects of five novel synthetic cannabinoids in rats // M. B. Gatch, M. J. Forster // Psychopharmacology (Berl). – 2018. – Vol. 235, № 3. – P. 673-680.
309. Effects of bioisosteric fluorine in synthetic cannabinoid designer drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135 / S. D. Banister [et al.] // ACS Chem Neurosci. – 2015. – Vol. 6, № 8. – P. 1445-1458.
310. Effect of synthetic cannabinoids on spontaneous neuronal activity: Evaluation using Ca^{2+} spiking and multi-electrode arrays / J. S. Tauskelana [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2016. – Vol. 786. – P. 148-160.
311. Göl, E. Assessment of types of synthetic cannabinoids in narcotic cases assessed by the Council of Forensic Medicine between 2011-2015, Ankara, Turkey / E. Göl, İ. Çok // Forensic Sci Int. – 2017. – Vol. 280. – P. 124-129.
312. Teens and Spice: A Review of Adolescent Fatalities Associated with Synthetic Cannabinoid Use / A. B. M. Paul [et al.] // J. Forensic Sci. – 2018. – Vol. 63, № 4. – P. 1321-1324.

313. Three fatalities associated with the synthetic cannabinoids 5F-ADB, 5F-PB-22, and AB-CHMINACA / V. Angerer [et al.] // *J. Forensic Sci Int.* – 2017. – Vol. 281. – P. e9-e15.
314. Analytical confirmation of synthetic cannabinoids in a cohort of 179 presentations with acute recreational drug toxicity to an Emergency Department in London, UK in the first half of 2015 / R. Abouchedid [et al.] // *Clin. Toxicol. (Phila).* – 2017. – Vol. 55, № 5. – P. 338-345.
315. Human Toxicity Caused by Indole and Indazole Carboxylate Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists: From Horizon Scanning to Notification / S. L. Hill [et al.] // *Clin. Chem.* – 2018. – Vol. 64, № 2. – P. 346-354.
316. Simultaneous detection of 93 synthetic cannabinoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and retrospective application to real forensic samples / C. Hess [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2017. – Vol. 9, № 5. – P. 721–733.
317. Metabolic Profile of Synthetic Cannabinoids 5F-PB-22, PB-22, XLR-11 and UR-144 by *Cunninghamella elegans* / S. Watanabe [et al.] // *AAPS J.* – 2017. – Vol. 19, № 4. – P. 1148-1162.
318. Metabolism of synthetic cannabinoids PB-22 and its 5-fluoro analog, 5F-PB-22, by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry / A. Wohlfarth [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – Vol. 406. – P. 1763-1780.
319. UPLC/ESI-MS/MS-based determination of metabolism of several new illicit drugs, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and α -PVT, by human liver microsome / T. Takayama [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2014 – Vol. 28, № 6. – P. 831-838.
320. Oral Fluid vs. Urine Analysis to Monitor Synthetic Cannabinoids and Classic Drugs Recent Exposure // V. Blandino [et al.] // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 18, № 10. – P. 796-805.
321. In vitro and in vivo human metabolism of a new synthetic cannabinoid NM-2201 (CBL-2201) / X. Diao [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2017. – Vol. 35, № 1. – P. 20-32.
322. In Vitro and In Vivo Human Metabolism of Synthetic Cannabinoids FDU-PB-22 and FUB-PB-22. / X. Diao [et al.] // *AAPS J.* – 2016. – Vol. 18, № 2. – P. 455-464.

323. Discrimination between closely related synthetic cannabinoids by GC-Cold-EI-MS / E. Smolianitski-Fabian [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 474-487.
324. Определение маркеров синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС / С. А. Савчук [и др.] // *Наркология.* – 2013. – Т. 12, № 11. – С. 66-73.
325. Хромато-масс-спектрометрическое определение нового наркотического средства метоксетамина и синтетических каннабимиметиков PB22, PB22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, FUB-PB-22 в биологических жидкостях и образцах волос в Набережночелнинском наркологическом диспансере / Л. А. Гизетдинова [и др.] // *Наркология.* – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 66-73.
326. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair-proof of consumption or false friends for interpretation? / F. Franz [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – Vol. 408, № 13. – P. 3445-3452.
327. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-ethyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products / N. Uchiyama [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 93-100.
328. Patent US, 20110028447 A1. Indazole derivatives / I. P. Buchler [et al.]. – date 2009-02-26.
329. Acute and residual effects in adolescent rats resulting from exposure to the novel synthetic cannabinoids AB-PINACA and AB-FUBINACA / R. C. Kevin [et al.] // *J. Psychopharmacol.* – 2017. – Vol. 31, № 6. – P. 757-769.
330. Pharmacotoxicological effects of the novel third-generation fluorinate synthetic cannabinoids, 5F-ADBINA, AB-FUBINACA, and STS-135 in mice. In vitro and in vivo studies / I. Canazza [et al.] // *Hum. Psychopharmacol.* 2017. – Vol. 32, № 3.
331. AB-CHMINACA, AB-PINACA, and FUBIMINA: Affinity and Potency of Novel Synthetic Cannabinoids in Producing Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Like Effects in

- Mice / J. L. Wiley [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2015. – Vol. 354, № 3. – P. 328-339.
332. Pharmacology of Indole and Indazole Synthetic Cannabinoid Designer Drugs AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, AB-PINACA, ADB-PINACA, 5F-AB-PINACA, 5F-ADB-PINACA, ADBICA, and 5F-ADBICA / S. D. Banister [et al.] // ACS Chem. Neurosci. – 2015. – Vol. 6, № 9. – P. 1546-1559.
333. The chemistry and pharmacology of synthetic cannabinoid SDB-006 and its regioisomeric fluorinated and methoxylated analogs / S. D. Banister [et al.] // Drug Test Anal. – 2018. – Jan 19.
334. Vaping Synthetic Cannabinoids: A Novel Preclinical Model of E-Cigarette Use in Mice / T. W. Lefever [et al.] // Subst Abuse. – 2017. – Apr 7; 11:1178221817701739.
335. Inhalation Exposure Method for Illegal Drugs / A. Inomata [et al.] // Yakugaku Zasshi. – 2017. – Vol. 137, № 8. – P. 1005-1015.
336. The 2-alkyl-2H-indazole regioisomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, and 5F-AB-PINACA are possible manufacturing impurities with cannabimimetic activities / M. Longworth [et al.] // Forensic Toxicol. – 2016. – Vol. 34. – P. 286-303.
337. Schedules of controlled substances: temporary placement of three synthetic cannabinoids into schedule I. Final order / Drug Enforcement Administration, Department of Justice // Fed. Regist. – 2015. – Vol. 80, № 20. – P. 5042-5047.
338. Schedules of Controlled Substances: Extension of Temporary Placement of THJ-2201, AB-PINACA and AB-CHMINACA in Schedule I of the Controlled Substances Act. Temporary order / Drug Enforcement Administration, Department of Justice // Fed. Regist. – 2017. – Vol. 82, № 17. – P. 8590-8592.
339. AB-CHMINACA-induced sudden death from non-cardiogenic pulmonary edema / H. Maeda [et al.] // Clin. Toxicol. (Phila). – 2018. – Vol. 56, № 2. – P. 143-145.
340. Supraventricular tachycardia and acute confusion following ingestion of e-cigarette fluid containing AB-FUBINACA and ADB-FUBINACA: a case report with quantitative analysis of serum drug concentrations / R. P. K. Lam [et al.] // Clin. Toxicol. (Phila). – 2017. – Vol. 55, № 7. – P. 662-667.

341. Clinical and analytical experience of the National Poison Control Centre with synthetic cannabinoids / S. Vučinić [et al.] // *Arh. Hig. Rada Toksikol.* – 2018. – Vol. 69, № 2. – P. 178-185.
342. Acute side effects after consumption of the new synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and MDMB-CHMICA / M. Hermanns-Clausen // *Clin Toxicol (Phila).* – 2018. – Vol. 56, № 6. – P. 404-411.
343. Peterson, B. L. Concentrations of AB-CHMINACA and AB-PINACA and Driving Behavior in Suspected Impaired Driving Cases / B. L. Peterson, F. J. Couper // *J. Anal. Toxicol.* – 2015. – Vol. 39, № 8. – P. 642-647.
344. Unintentional Pediatric Exposure to a Synthetic Cannabinoid (AB-PINACA) Resulting in Coma and Intubation / S. L. Thornton [et al.] // *Ann. Emerg. Med.* – 2015. – Vol. 66, № 3. – P. 343-344.
345. The role of illicit, licit, and designer drugs in the traffic in Hungary / L. Institóris [et al.] // *Forensic Sci Int.* – 2017. – Vol. 275. – P. 234-241.
346. Determination of AB-CHMINACA and its metabolites in human hair and their deposition in hair of abusers / J. Sim [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2017. – Vol. 140. – P. 162-168.
347. Ford, L. T. Analytical evidence to show letters impregnated with novel psychoactive substances are a means of getting drugs to inmates within the UK prison service / L. T. Ford, J. D. Berg // *Ann. Clin. Biochem.* – 2018. – Jan 1:4563218767462.
348. Death due to diabetic ketoacidosis: Induction by the consumption of synthetic cannabinoids? / C. Hess [et al.] // *Forensic Sci Int.* – 2015. – Vol. 257. – P. e6-e11.
349. Synthetic Cannabinoid and Mitragynine Exposure of Law Enforcement Agents During the Raid of an Illegal Laboratory – Nevada, 2014 // L. Tapp [et al.] // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* – 2017. – Vol. 66, № 47. – P. 1291-1294.
350. Synthetic cannabimimetic agents metabolized by carboxylesterases / R. Thomsen [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7, № 7. – P. 565-576.
351. Pentylindole/Pentylindazole Synthetic Cannabinoids and Their 5-Fluoro Analogs Produce Different Primary Metabolites: Metabolite Profiling for AB-PINACA and 5F-

AB-PINACA / A. Wohlfarth [et al.] // The AAPS J. – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 660-677.

352. In vitro and in vivo human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA / C. Erratico [et al.] // Drug Test Anal. – 2015. – Vol. 7, № 10. – P. 866-876.

353. Borg, D. A Fast and Comprehensive Analysis of 32 Synthetic Cannabinoids Using Agilent Triple Quadrupole LC-MS-MS / D. Borg, A. Tverdovsky, R. Stripp // J. Anal. Toxicol. – 2017. – Vol. 41, № 1. – P. 6-16.

354. Metabolic profiling of new synthetic cannabinoids AMB and 5F-AMB by human hepatocyte and liver microsome incubations and high-resolution mass spectrometry / M. Andersson [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2016. – Vol. 30, № 8. – P. 1067-1078.

355. Rapid and sensitive screening and confirmation of thirty-four aminocarbonyl/carboxamide (NACA) and arylindole synthetic cannabinoid drugs in human whole blood / M. Tynon [et al.] // Drug Test Anal. – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 924-934.

356. An outbreak of acute delirium from exposure to the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA / J. A. Tyndall [et al.] // Clin. Toxicol. (Phila). – 2015. – Vol. 53, № 10. – P. 950-956.

357. Detection and Characterization of the Effect of AB-FUBINACA and Its Metabolites in a Rat Model / M. Hsin-Hung Chen [et al.] // J. Cell Biochem. – 2016. – Vol. 117, № 4. – P. 1033-1043.

358. Identification of AB-FUBINACA metabolites in authentic urine samples suitable as urinary markers of drug intake using liquid chromatography quadrupole tandem time of flight mass spectrometry / S. Vikingsson [et al.] // Drug Test Anal. – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 950-956.

359. Freijo, T. D. Jr. A rapid quantitative method for the analysis of synthetic cannabinoids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / T. D. Jr. Freijo, S. E. Harris, S. V. Kala // J. Anal. Toxicol. – 2014. – Vol. 38, № 8. – P. 466-478.

360. A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases / F. Vaiano [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2016. – Vol. 129. – P. 441-449.
361. Gundersen, P. O. M. Screening, quantification and confirmation of synthetic cannabinoid metabolites in urine by UHPLC-QTOF-MS / P. O. M. Gundersen, O. Spigset, M. Josefsson // Drug Test Anal. – 2018. – Jul 11.
362. Государственная фармакопея РФ [Электронный ресурс]. – 13-е изд. – Москва, 2015. – Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/> (дата обращения: 16.11.2017).
363. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 10-е изд. – Москва, 1968. – 1081 с.: ил.
364. Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. – 12-е изд. – Москва : Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – 704 с. : ил.
365. Piñero, E. L. Quantitation of Cocaine by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Utilizing Isopropylcocaine as a Structurally Related Internal Standard / E. L. Piñero, J. F. Casale // Microgram Journal. – 2006. – Vol. 4, № 1-4. – P. 47.
366. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – Изд. 4-е, перераб. и доп. – Москва : Химия, 1971. – 456 с.
367. Методика количественного определения изониазида в крови и плазме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором / ОГУЗ ЧОБСМЭ. – Челябинск, 2011. – 11 с.
368. Математическая теория планирования эксперимента / под ред. С.М. Ермакова. – Москва : Наука, 1983. – 392 с.
369. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. В 2 т. Т. 2 / под. ред. Р. Кельнера [и др.] ; пер. с англ. А. Г. Борзенко [и др.]. – Москва : Мир : АСТ, 2004. – 728 с.
370. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2002. – 312 с.

371. Красовский, Г. И. Планирование эксперимента / Г. И. Красовский, Г. Ф. Филаретов. – Минск : Изд-во БГУ, 1982. – 302 с.
372. Дворская, О. Н. Сравнение эффективности жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции лекарственных веществ на дисках серии SPEC MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев // Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств : материалы Рос. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию ПГФА. – Пермь, 2007. – С. 172-177.
373. Дворская, О. Н. Эффективность экстракции лекарственных веществ на дисках для ТФЭ серии SPEC C18 и MP3 / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, Р. Р. Сунгатуллина // Вест. Перм. гос. фарм. акад. – 2007. – № 2. – С. 133-136.
374. Катаев, С. С. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. – Т. 55, № 4. – Р. 38-43.
375. Статистика : корреляционно-регрессионный анализ статистических связей на персональном компьютере : метод. указ. к практ. занятиям / сост. Н. Ю. Лукьянова ; Калинингр. ун-т. – Калининград, 1999. – 35 с.
376. Применение твердофазной экстракции для совместного извлечения золпидема и его метаболитов из мочи / Е. А. Крылова [et al.] // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 35, № 9. – Р. 61-70.
377. Дворская, О. Н. Определение ряда нестероидных противовоспалительных средств в крови в скрининге методами твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин // Бутлеровские сообщения. – 2015. – Т. 43, № 7. – Р. 149-153.
378. Катаев, С. С. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2017. – Т. 60, № 1. – Р. 29-35.
379. Катаев, С. С. Влияние уксусной кислоты на эффективность экстракции

лекарственных и наркотических веществ при скрининге крови / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, И. П. Крохин // Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами : материалы II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Пермь, 2016. – С.71-75.

380. Об утверждении правил отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе иммунобиологических лекарственных препаратов, аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность [Электронный ресурс] : приказ Минздрава России от 11.07.2017 № 403н // КонсультантПлюс. Правовые акты по здравоохранению.

381. Киреева, А. В. Химико-токсикологическое исследование лекарственных веществ, применяемых в практике купирования абстинентного синдрома : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 15.00.02 / А. В. Киреева А. В. – Санкт-Петербург, 2008. – 28 с.

382. Химико-токсикологическое исследование кеторолака / Л. Е. Кудрикова [и др.] // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – Барнаул-Новосибирск. – 2011. – Вып. 17.

383. Саркисян, М. С. Дифференциальная диагностика некоторых ненаркотических анальгетиков при химико-токсикологическом исследовании мочи : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Саркисян М. С. – Пятигорск, 2012. – 23 с.

384. Оценка концентрации некоторых нестероидных противовоспалительных средств в процедуре скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови / О. Н. Дворская [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – Т.59, №3. – С.24-30.

385. Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала [Электронный ресурс] / ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

- Москва, 2014. – 52 с. – Режим доступа: https://sudmed-ms.my1.ru/Articles/mr_rcsmeh_validacija-2014.pdf (дата обращения: 03.01.2019).
386. Bioanalytical Method Validation : guidance for Industry [Электронный ресурс] / U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (дата обращения 20.09.2018).
387. Катаев, С. С. Сравнение эффективности твердофазной экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для патронов со смешанной фазой некоторых брендов / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5, № 6. – С. 543-555.
388. Дворская О. Н. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / О. Н. Дворская, И. П. Крохин, С. С. Катаев // Хим.-фарм. журнал. – 2017. – Т. 51, № 3. – С. 36-40.
389. Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, И. П. Крохин. – 16 с.
390. Крохин, И. П. Совместное количественное определение амфетамина, метамфетамина, МДМА и МДПВ в крови / И. П. Крохин, С. С. Катаев // Актуальные вопросы судебно-химических и химико-токсикологических исследований : материалы межрегион. науч.-практ. конф. 6–7 октября 2011 г., Екатеринбург. – Екатеринбург, 2012. – С. 59-62.
391. Масс-спектрометрия в органической химии / А.Т. Лебедев. – Москва : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. - 493 с., ил.

392. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine / C. L. Moran [et al.] // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83, №. 11. – P. 4228-4236.
393. Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics JWH-203 and JWH-251, by GC-MS and LC-MS/MS / P. Kavanagh [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2013. – Vol. 934, №. 1. – P. 102-108.
394. Grigoryev, A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl) methanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography - mass spectrometry / A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik // *Drug Test. Anal.* – 2013. – Vol. 5, №. 2. – P. 110-115.
395. Савчук, С. А. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике / С. А. Савчук, А. М. Григорьев. – Москва : ЛЕНАНД, 2013. – 224 с.
396. Катаев, С. С. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т. 34, № 4. – С. 116-122.
397. Катаев, С. С. Определение в моче основных метаболитов каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // *Проблемы экспертизы в медицине.* – 2013. – Т. 13, № 2[50]. – С. 28-30.
398. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче / С. С. Катаев, А. Б. Мелентьев, О. Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т. 36, № 10. – С. 29-36.
399. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 21 с.
400. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22F в моче / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2014. – Т.37, № 2. – С. 114-121.

401. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика FUB-PB-22 в моче / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т.36, № 12. – С. 15-21.
402. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче / О. Н. Дворская [и др.] // Наркология. – 2014. – № 3. – С. 55-65.
403. Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев, А.Б. Мелентьев. – 34 с.
404. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская. – Москва : Перо, 2016. – 326 с.
405. Катаев С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, Н. Б. Зеленина, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 35, № 9. – С. 131-138.
406. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче : информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.) / О. Н. Дворская, С. С. Катаев. – 17 с.
407. Идентификация метаболитов каннабимиметика 5F-AB-PINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2014. – Т. 39, № 8. – С. 150-160.
408. Мелентьев, А. Б. Идентификация маркеров каннабимиметика АВ-FUBINACA в моче методом ГХ-МС / А. Б. Мелентьев [и др.] // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36, № 11. – С. 111-118.
409. Катаев, С. С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-CHMINACA в моче методом ГХ-МС / С. С. Катаев, О. Н. Дворская // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 36, № 12. – С. 27-33.
410. SWGDRUG MS Library Version 1.9. (2013) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.swgdrug.org/ms.htm>.

411. Обнаружение каннабиноидов в моче / С. С. Катаев [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2005. – № 2. – С. 35-38.
412. Катаев, С. С. Сравнение различных вариантов пробоподготовки для выявления маркеров синтетических и природных каннабиноидов в моче / С. С. Катаев, О. Н. Дворская, Ю. Н. Аникина // Организация судебно-медицинской службы России на современном этапе: задачи, пути решения, результаты : тр. Всерос. науч.-практ. конф. (20–22 апреля 2016 года). – Воронеж, 2016. – С. 432-437.
413. Мелентьев, А. Б. Образование артефактов при подготовке проб и в процессе анализа при скрининге мочи методом ГХ/МС / А. Б. Мелентьев // Проблемы экспертизы в медицине. – 2008. – Т. 8, № 1[29]. – С. 12-15.
414. Strano-Rossi, S. Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS / S. Strano-Rossi [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 649-654.
415. Ohta, H. Studies on Fentanyl and Related Compounds IV. Chromatographic and Spectrometric Discrimination of Fentanyl and its Derivatives / H. Ohta, S. Suzuki // J. Anal. Toxicol. – 1999. – Vol. 23, № 4. – P. 280-285.
416. Luire, I. S. Use of multiple-reaction monitoring ratios for identifying incompletely resolved fentanyl homologs and analogs via ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry / I. S. Luire, R. IiO // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216, № 9. – P. 1515-1519.
417. Wichitnithad W. Identification of isobaric product ions in electrospray ionization mass spectra of fentanyl using multistage mass spectrometry and deuterium labeling. Rapid Commun / W. Wichitnithad, T. J McManus, P. S. Callery // Mass Spectrom. – 2010. – Vol. 24, № 17. – P. 2547-2553.
418. Metabolism of Fentanyl and Acetylfentanyl in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes / T. Kanamori [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2018. – Vol. 41, № 1. – P. 106-114.

419. Use of hepatocytes isolated from a liver-humanized mouse for studies on the metabolism of drugs: application to the metabolism of fentanyl and acetylfentanyl / T. Kanamori [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2018. – Vol. 36, № 2. – P. 467-475.
420. Мелентьев, А. Б. Идентификация и аналитические характеристики метаболитов ацетилфентанила / А. Б. Мелентьев, С. С. Катаев, О. Н. Дворская // *Журнал аналитической химии.* – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 216-224.
421. Goromaru, T. Identification and Quantitative Determination of Fentanyl Metabolites in Patient by Gas Chromatography-Mass Spectrometry / T. Goromaru [et al.] // *Anesthesiology.* – 1984. – Vol. 61, № 1. – P. 73-77.
422. Moffat, A. C. Clarke's analysis of drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / A. C. Moffat, A. D. Osselton, B. Widdop. – London : Pharmaceutical Press, 2011. – 1401 p.
423. Studies on 1-(2-phenethyl)-4-(N-propionylanilino) piperidine (fentanyl) and related compounds VII. Quantification of a-methylfentanyl metabolites excreted in rat urine / S. Sato [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – Vol. 195, № 1-3. – P. 68-72.
424. Guitton, J. Gas chromatographic-mass spectrometry and gas chromatographic-Fourier transform infrared spectroscopy assay for the simultaneous identification of fentanyl metabolites / J. Guitton, M. Desage, S. Alamercery, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 1997. – Vol. 59, № 1. – P. 59-70.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица к литературному обзору

Таблица – Использование ТФЭ для анализа различных анализов в биоматериале при химико-токсикологических, судебно-химических, фармакокинетических исследованиях, допинг-контроле и пр.

N п.п.	Аналит(ы)	Объект	Патрон / картридж	Элюент/ метод	Ссылка на статью
1.	Лекарственные вещества кислотного и основного характера (с гидролизом и без)	моча, сыворотка, кровь	Extrelut®, Amberlite XAD-2	40 мл дихлорметан-ИПС (85:15) дихлорэтан-ЭА (4:6) или хлороформ-ИПС (6:1) / ТСХ	[59]
2.	лекарственные и наркотические вещества кислотного и основного характера	моча	Amberlite XAD-2	различные растворители / ТСХ	[60]
3.	стимуляторы ЦНС	моча лошади	XAD-2, XAD-4, XAD-7 XAD-8	хлороформ / ТСХ, ГХ	[61]
4.	28 лекарственных веществ (барбитураты, транквилизаторы, нейролептики, опиаты и др.)	посмертная кровь	Amberlite XAD-2	различные растворители / ГХ	[62]
5.	19 наиболее распространенных лекарственных веществ	аутопсийная кровь, ткани	Amberlite XAD-2 (нейлоновые мешки с 2 г смолы)	дифференциальное элюирование / ГХ СФ-УФ	[63]
6.	амитриптилин, доксепин, имипрамин, нортриптилин, нордоксепин, дезипрамин, протриптилин	сыворотка	Clin Elut TM	АСН-ФБ (рН 7,0)-MeOH / ВЭЖХ	[64]
7.	16 лекарственных веществ (для злоупотребления) кислотного, нейтрального, основного характера	моча	Amberlite XAD-2	различные растворители / ГХ	[65]
8.	пропранолол, хинидин, дизопирамид, N-ацетилпрокаинамид, моно-N-деалкилизопирамид	сыворотка	Clin Elut 1003	метилхлорид-гексан-изоамилол (49:49:2) / ВЭЖХ	[66]
9.	альфентанил, суфентанил	плазма, сыворотка	ЖЖЭ Clin Elut TM CE 1003	2 мл гептан-ИПС / 3 мл гептан-ИПС / ГХ	[67]
10.	нитроглицерин	плазма	Clin Elut 1003	гексан-хлороформ-MeOH (10:10:1) / ГХ-МС	[68]
11.	фенобарбитал	сыворотка	Carbopack B (кач.), Carbopack C (колич.)	MeOH / ГХ	[69]

12.	18 лекарственных веществ основного характера	сыворотка	XAD-2 (капсула Ø 2 см с ферромагнитным стержнем)	2 мл MeOH, содержащий 1 г / 100 мл винной кислоты / ГХ-АФД	[70]
13.	3-гидроксипутират, лактат	плазма	Carbopack B	вода, содержащая шавелевую кислоту (0,2 мл) / ГХ	[71]
14.	эстриол	сыворотка беременной	Clin-Elut	метилхлорид-ИПС / ЖХ-ФЛД	[72]
15.	амитриптилин, доксепин, имипрамин, нортриптилин, десметилдоксепин, дезипрамин, протриптилин	сыворотка	Bond Elut C18	10 mM ацетат аммония в MeOH / ВЭЖХ	[73]
16.	кодеин, этилморфин	кровь, моча, содержимое желудка	Clin Elut CE 1003	2* 6 мл хлороформ / ГХ-АФД	[74]
17.	лекарственные вещества кислотного характера (барбитураты, НПВС и др.)	гемолизованная кровь	ODS	MeOH / ГХ-МС	[37]
18.	амоксапин, 8-гидроксиамоксапин, доксепин, десметилдоксепин, имипрамин, дезипрамин, амитриптилин, нортриптилин	сыворотка	Bond Elut CN	УК (0,5 моль / л) - ACN - н-бутиламин (30:70:0,08) / ВЭЖХ	[75]
19.	8 лекарственных веществ основного и нейтрального характера	плазма, аутопсийная кровь, печень	XAD-2, Extrelut, Elut-X, Elut-C18, хлороформ-ЖЖЭ	1,5 мл ЭА дихлорметан (50мл, 20мл) дихлорметан-ИПС (95:5) 3 мл MeOH / ТСХ	[76]
20.	10 лекарственных веществ кислотного, основного и нейтрального характера	вода плазма	Sep-pak C 18, Bond-Elut C18, Bond-Elut CN, XAD-2, Sep-pak silica, Clin-Elut	1 мл MeOH метилхлорид (1мл, 3мл) / УФ-СФ	[77]
21.	кокаин, БЭ, метиловый эфир экгоина	моча, кровь	Extrelut	40 мл хлороформ-ИПС (9:1) / ГХ-МС	[78]
22.	катехоламины	биожидкости	Bond Elut SCX, ЖЖЭ и оксид алюминия H+	1 мл NaH ₂ PO ₄ (1 моль / л, pH 2,9) / ВЭЖХ	[79]
23.	атенолол, метопролол	плазма	Bond Elut CN, Bond Elut C18	0,5 мл 0,1M HCl-ACN (50:50) (метопролол), 0,25 мл 0,05 M ФБ-	[80]

					ACN (70:30) + 4 mM триэтиламина (атенолол) / ВЭЖХ	
24.	циметидин, циметидинсульфоксид	сыворотка	Bond Elut C18		0,2 мл MeOH / ВЭЖХ	[81]
25.	циклопорин	сыворотка, плазма, цельная кровь	CN		Вода-ACN (70:30) / ВЭЖХ	[82]
26.	радиоактивные метадон, фенитон, фенобарбитал, диазепам	моча	Sep-Pak C18 Bakerbond C18 ЖЖЭ, ХАД-2 целит 560		2 мл MeOH или 3*1 мл ацетон-дихлорметан (1:1) / ФЛД	[83]
27.	эстриол, его интактные конъюгаты	моча, сыворотка, амниотическая жидкость	Carbopack B		хлороформ-MeOH (60:40) с бромидом тетрапропиламмония / ЖХ	[84]
28.	мексилетин	плазма	Clin-Elut™		Диэтиловый эфир-ЭА (1:1) / ВЭЖХ	[85]
29.	трихотеценовые микотоксины	моча	Clin Elut Sep-Pak C18		ЭА-метанол (4 × 8 мл), 2 мл MeOH-вода (40:60) / ГХ-МС	[86]
30.	кофеин, теобромин, параксантин, теofilлин, β-гидроксизтил-теofilлин	плазма	Bond-Elut C18		400 мкл MeOH / ВЭЖХ	[87]
31.	метадон, морфин, кодеин, кокаин, дигидрокодеин, амфетамин	моча	Tox Elut		дихлорметан-ИПС (90:10) / ТСХ	[88]
32.	хлорметиазол	плазма	Sep-Pak C18 Bond Elut C1, C2, C4, C6, C8, C18.		0,5-1 мл MeOH / ВЭЖХ	[89]
33.	НПВС: фенпрофен, ибупрофен, индометацин, напроксен, парацетамол, салициловая кислота	цельная кровь	Bond-Elut C8		3 * 500 мкл MeOH: 1 % NH ₄ OH: ACN (50: 30:20) / ВЭЖХ	[41]
34.	кодеин, морфин, 6-Мам	цельная кровь	Bond Elut C18		3 * 500 мкл MeOH-1 % о-фосфорная кислота-ACN (50:30:20) / ВЭЖХ	[54]
35.	морфин, кодеин	сыворотка, моча, маковые	Chem Elut ЖЖЭ		4,5 мл хлороформ 5 мл хлороформ / ГХ-МС	[90]

		сечечки (колич.)			
36.	циклоспорин, 9 его метаболитов	цельная кровь	Bond Elut CN, C8	вода- ACN-тетрагидрофуран-УК-бутиламин (600:390:20:0, 16:0, 10) / ВЭЖХ-УФ	[91]
37.	лекарственные вещества кислотного и нейтрального характера	цельная кровь	Chem Elut TM	дихлорметан / ГХ-ПИД	[92]
38.	кокаин, БЭ (качественный и количественный анализ)	моча	Amberlite XAD-2	2 мл бутилхлорид-ACN-MeOH (40:50:10) / ВЭЖХ-МС	[93]
39.	антагонист H ₂ -рецептора SK&F 93574, вазодилатор с активностью антагониста β-адренорецептора SK&F 95018, антагонист рецептора H ₁ темеластина, его метаболиты	плазма, моча, желчь	Bond Elut C18 C2 кассетный картридж (автомат.)	250 мкл MeOH-вода (80:20) / ВЭЖХ	[94]
40.	кокаин, БЭ	моча	Bond Elut C8	0.5 мл * 3 хлороформ-ИПС (4:1) / ВЭЖХ	[95]
41.	лекарственные вещества основного характера	моча	XAD-2., Extrelut. ЖЖЭ	15 мл ЭА 25 мл дихлорметан 10 мл дихлорметан-ИПС (4:1) / ТСХ	[96]
42.	(1,2 (n) -3H) 1-дегидротестостерон его метаболиты	моча лошади	Amberlite XAD-2	3 мл * 30 дихлорэтан-этанол (98:2) / ГХ-МС	[97]
43.	30 лекарственных веществ основного характера: папаверин, практикол, метоклопрамид, имипрамин, прокаин, морфин, пропранолол, йохимбин и др.	вода, плазма	BakerbondCN	MeOH-ФБ (pH 3) (50:50) (полярные) MeOH с 0,1 % пропиламино (аполярные)	[98]
44.	β-блокаторы	моча	Extrelut-1, Extrelut-3 Sep-Pak C18	диэтилэфир-пропанол (9: 1) 3 мл, 9 мл / ГХ, ГХ-МС	[99]
45.	лоразепам	кровь	Amberlite XAD-2	4 мл дихлорметан / ГХ/МС	[100]
46.	простагландин E ₂	моча, плазма	XAD-2 Флорисил	10 % этанол в диэтиловом эфире 12 мл метилхлорид + 24 мл 10 % этанол-диэтиловый эфир / ГХ	[101]
47.	лекарственные вещества	посмертная	Extrelut ЖЖЭ	ГХ	[102]

48.	7 БДА, 6 ТАД	кровь сыворотка	С 18	вода-МеОН-АСН (2:3:3) (БДА); МеОН с 0,6 % диэтиламина (ТАД)	[103]
49.	2,3-динитрогробоксан В2 и 11- дегидрогробоксан В2	моча	С 18	20 мл АСН-МеОН (9:1)	[104]
50.	лекарственные и наркотические вещества кислотного, нейтрального и основного характера (метамфетамин, гексобарбитал, мепивакаин, тримипрамин, леваллорфан, нитразепам)	плазма	Bond Elut Certify	4 мл метилхлорид (кисл., нейтр.), 2 мл ЭА-33 % аммиак (98:2) (осн.) / ГХ	[105]
51.	Кокаин, БЭ, метиловый эфир экгонина	моча	Bond Elut Certify	2 мл хлороформ-ИПС (80:20) с 2 % аммония гидроксидом / ГХ- АФД	[106]
52.	скрининг 100 наркотиков и их метаболитов	моча	Bond Elut SCX	2 мл 3 % аммиачный МеОН / ВЭЖХ	[107]
53.	ТГК-СООН	моча	Bond Elut Certify II	2 мл гексан-ЭА (75:25) с 1 % УК / ГХ-МС	[108]
54.	ТАД	сыворотка	Carbopack B+ SCX	4 мл метилхлорид-МеОН (60:40), 0,8 мл АСН-МеОН-вода (72:18:10), насыщенный КСl / ВЭЖХ	[109]
55.	300 лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов (бупренорфин, каннабиноиды, кокаин, ЛСД, морфин, РСР и т.д.)	моча	Chem Elut	2*15 мл дихлорметан-ИПС (90:10) / ТСХ, ГХ-МС	[110]
56.	кленбутерол	моча теленка	Chem Elut	20*2 мл гексан / ВЭЖХ	[111]
57.	циматерол, кленбутерол	печень	Bakerbond C-18	2 мл МеОН / ВЭЖХ, ВЭТСХ	[112]
58.	амиодарон, дезэтиламинодарон	сыворотка	Empore C8 Bond Elut C8, C 18	400 мкл вода-АСН- тетрагидрофуран-УК-н- бутиламин (100:900:20:0,3:0,4) / ВЭЖХ	[113]
59.	эндогенные факторы с дигоксин-	моча	цеолит № 545 (3	400 мл этанол-дихлорметан (1:9)	[114]

	подобной активностью	беременных	колонки	(нейтр.), 100 мл УК-этанол-дихлорметан (1:10:89) / ВЭЖХ-УФ	
60.	ТАД; амитриптилин, кломипрамин, дезипрамин, дезметилкломипрамин, дезметилдоксепин доксепин имипрамин нортриптилин	сыворотка	Empore C8 (SPEM) Bond Elut C8 Polyorb MP-3	вода-ACN-УК-н-бутиламин (600:400:2,5:1,5) / ВЭЖХ	[115]
61.	морфин, морфина-3-глюкуронид, морфина-6- Glu, кодеин	плазма, моча, цереброспинальная жидкость	Bond Elut SCX	2 мл 3 % аммиачный MeOH / ВЭЖХ-УФ	[116]
62.	ТАД, нейролептики, другие препараты психиатрической практики	плазма, сыворотка	Bakerbond CN	5 мл ACN-вода (1:1) / ВЭЖХ	[117]
63.	6 классов лекарственных и наркотических веществ: опиаты, БЭ, THC-COON, амфетамины, барбитураты, БДА	моча	ЖЖЭ+Extrelut 20 (морфин) Extrelut 3 + Adsorbex-Diol (БЭ) ЖЖЭ+ Adsorbex RP8 (THC-COON) Extrelut 3 +ЖЖЭ (амфетамин) Extrelut 3 (барбитураты). Extrelut3 + ЖЖЭ (БДА)	2*40 мл 15 % ИПС в дихлорметане 15 мл 10 % ИПС в хлороформе 2*500мкл MeOH 1 мл *2 10 % ЭА в н-гексане. 15 мл н-гексан 15 мл 5 % ИПС в дихлорметане 15мл 10 %-ИПС в хлороформе /ГХ-МС ВЭЖХ-УФ	[118]
64.	кокаин, его метаболиты, в том числе кокаэтилен	плазма, моча	Bond Elut Certify II	2 мл дихлорметан-ИПС (80:20) в 2 % аммония гидроксида /ГХ-МС	[119]
65.	барбитураты, гипнотические средства, амфетамины, опиоиды, БДА, метаболиты кокаина	моча	Bond Elut Certify	мицеллярная электрокинетическая хроматография	[120]
66.	лекарственные и наркотические вещества кислотного, нейтрального, основного характера	кровь	Bond Elut Certify	4 мл ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. и нейтр.), 2 мл 2 % аммиачный ЭА (осн.) /ГХ-ЛПД	[121]
67.	скрининг 25 лекарственных и наркотических веществ кислотного,	моча, плазма	Bond Elut Certify	ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. и нейтр.), 2 % аммиачный ЭА (осн.)	[122]

	нейтрального и основного характера				
68.	кокаин	меконий первого дня недоношенных детей кокаиновой- зависимых матерей	Bond-Elut SCX	2 мл 3 % аммиачный MeOH / ВЭЖХ-МС ГХ-МС	[123]
69.	13 диуретиков (пяти различных фармакологических групп), пробенецид, кофеин, пемолин	моча	XAD-2	эфир-ЭА (1:1) / ВЭЖХ-УФ	[124]
70.	ловастатин, правастатин, симвастатин	плазма	Bakerbond C8 Bakerbond C18 Последовательная SPE для отделения лактонов и кислотных форм	2 * 1 мл MeOH (60:40) (кисл.), 2 * 1 мл ACN (лактоны). 2 * 400 мкл MeOH / ГХ-МС	[125]
71.	морфин, кодеин, нормофин, морфина 3- Glu, морфина 6- Glu	плазма	Clean Screen	3 мл 2 % аммиачный MeOH / ВЭЖХ-ДАД (с диольной колонкой) ГХ-МС	[126]
72.	метамфетамин, метадон, гексобарбитал, пентобарбитал, метилфенобарбитал, мепивакаин, амитриптилин, кодеин, кетазолам, дипипанон, празепам	плазма телянка	Clean Screen DAU ASPEC (Gilson)	3,5 мл ацетон-хлороформ (1:1) (кисл.), 2 мл 2 % аммиачный ЭА (осн.) / ГХ	[127]
73.	5 лекарственных веществ	цельная кровь	Bond Elut Certify Clean Screen DAU	4 мл ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. и нейтр.), 2 мл 2 % аммиачный ЭА (осн.) / ГХ-МС	[128]
74.	морфин	цельная кровь	Bond Elut Certify	2 мл 2 % аммиачный MeOH / ГХ	[129]
75.	пентобарбитал, гексобарбитал, мепивакаин, тримипрамин, клоназепам, празепам	плазма телянка	Bond Elut Certify Регенерация колонок MeOH, HCl (1%), вода, MeOH	4 мл ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. и нейтр.), 2 мл 2 % аммиачный ЭА (осн.) / ГХ	[130]
76.	алклофенак	моча, плазма лошади	Adsorbex C18	45 % ACN-55 % вода-УК (99:1) / ВЭЖХ	[131]

77.	скрининг 19 токсикологически значимых лекарственных и наркотических веществ	плазма, цельная кровь	Bond Elut Certify Автоматиз. SPE Gilson ASPEC	ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. нейтр.), аммиачный ЭА (осн.) / ГХ-МС	[132]
78.	18 лекарственных веществ основного характера	плазма телянка цельная кровь телянка моча человека	Bond Elut Certify	4 мл ацетон-хлороформ (1:1) (кисл.), 2 мл 2 % аммиак - ЭА (осн.) / ГХ-ПВД, ГХ-АФД	[133]
79.	13 лекарственных веществ кислотного и основного характера	цельная кровь	Bond-Elut Certify	2 мл*2 ацетон-хлороформ (1:1) (кисл.), 3 мл 2 % аммиак 25%- ЭА (осн.) / ГХ-АФД	[134]
80.	кокаин, БЭ	посмертная кровь	Amberlite XAD-2	ГХ / МС	[135]
81.	272 лекарственных и наркотических вещества	посмертная кровь	Amberlite XAD-2 смола (кисл.) + ЖЖЭ (осн.)	Дихлорметан / ВЭЖХ-ДАД (различные колонки)	[136]
82.	кокаин, ЕМЕ, БЭ, кокаэтилен, норкокаин, минорные метаболиты	моча	Bond Elut Certify	2 мл хлороформ-ИПС-2 % аммония гидроксид (80:20) / ГХ-МС	[137]
83.	β-блокаторы, стимуляторы, лекарственные вещества и их метаболиты (100 соединений в допинге)	моча	Bond Elut Certify	2 мл хлороформ-ИПС (80:20), с 2 % аммония гидроксидом / ГХ-МС	[138]
84.	пропранолол, нортриптилин, хинин, имипрамин	цельная кровь	Supelclean-ENVIcarb + Bondelut PRS (Авт.)	2 * 3 мл 0,15 % ТФА-МеОН, 2 * 1 мл ксилол-МеОН; 2 мл 2 % аммиак-МеОН-ЭА / ГХ-МС, ВЭЖХ-УФ	[139]
85.	тиарамид, N-уксусная кислота, N-оксид	моча, плазма лошади	Bond-Elut PH	5 мл МеОН / ВЭЖХ	[140]
86.	кодеин, норкодеин, кодеина-6-Glu, норкодеина-6-Glu, морфин, норморфин, морфина-3-Glu морфина-6-Glu	плазма, моча	Sep-Pak light C18 (Gilson Aspec)	600 мкл 15 % ACN в 30 mM ФБ (pH 2,1) / ВЭЖХ УФ, ВЭЖХ-ЭХД	[141]
87.	РСР, 4-фенил-4-пиперидиноциклогексанол, 1-(1-фенилциклогексил)-4-гидроксипиперидин	плазма, волосы крысы	Bond Elut Certify ЖЖЭ (2 мл метанола-5 н. HCl (20:1)), УЗ	2 мл МеОН-28 % аммиак (98:2) / ГХ-МС	[142]

88.	скрининг лекарственных веществ кислотного, нейтрального, основного характера	печень	Bond-Elut Certify	ацетон-хлороформ (кисл., нейтр., слабоосн.), аммиачный ЭА (осн.) / ГХ-ПВД	[143]
89.	морфин, 6-Мам, кодеин	кровь, сыворотка	Bond Elut Certify Isolute Confirm HСХ Chromabond Drug Bakerbond Narc-2.	ГХ-МС ВЭЖХ	[144]
90.	количественное определение кокаина, БЭ, норкокаина и кокаэтилена	моча	Bond Elut SCX	1,5 мл 3 % аммиака в MeOH / ВЭЖХ-УФ, ГХ-МС	[145]
91.	МДМА, ГМА, ГГА, 3,4-дигидроксиметамфетамин, 3,4-метилendioксиамфетамин, ГММА	моча, плазма	Bakerbond C-18 Adorbex SCX автомат. TOXI-LAB SPEC VC MP1 для мочи	1,5 мл MeOH-75mMKN2PO4 (95:5) 1 мл MeOH-HCl 7,3 % (97,5:2,5) (моча) 1,25 мл MeOH-HCl 7,3 % (97,5:2,5) (плазма) / ВЭЖХ-ДАД, ГХ-МС	[146]
92.	скрининг 11 лекарственных веществ кислотного и основного характера	моча	ЖЖЭ Bond-Elut Certify Isolute Confirm HСХ SPEC ®1 C18 SPEC ®1 Plus TM 6 mL C18 AR/MP3 Multi-Modal	1,3 мл ЭА-гексан (25:75); 2,3 мл аммиак:ЭА (2:98) / ГХ-МС	[147]
93.	Декстропропоксифен, норпропоксифен	моча	Bond Elut Certify	2 мл метилхлорид-ИПС (80:20) с 2 % аммиака / ГХ-ПВД	[148]
94.	БДА, ГАД, β-блокаторы, лекарственные вещества для злоупотребления	сыворотка, моча	Bond Elut Certify Toxi-Tube ТМА-ЖЖЭ	750 мкл MeOH-10% аммиак (5:1) / ВЭЖХ-ДАД	[149]
95.	сиропимус (рапамин)	цельная кровь	Очистка ЖЖЭ (бутилхлорид / диэтиловый эфир), Sep-Pak light C18	200 мкл 20 ммоль / л ФБ (рН 2,1) с 25 % ACN / ВЭЖХ-УФ	[150]
96.	ацикловир, 9-карбоксиметоксиметилуан	моча, сыворотка	Sep-Pak C 18	1 мл 3 % ACN в 38 mM фосфорной кислоте / ЖХ-ФЛД	[151]

97.	героин, 6-MAM, морфин	плазма	Bond Elut C8	MeOH / GX-MC, ВЭЖХ-УФ (колич.)	[152]
98.	морфина-3-Glu, морфина-6-Glu морфин, кодеин, кодеин-6-Glu, 6-MAM	сыворотка, аутопсийная кровь, стекловидное тело, периферическая плазма, моча	Bond Elut C18	0,5 мл УК MeOH-0,5 М (9:1) / ВЭЖХ-MC	[153]
99.	РСР, 1-(1-фенилциклогексил)-4-гидроксипиперидин, транс-1-(1-фенил-4-гидроксипиперидин)-4'-гидроксипиперидин	волосы человека	ЖЖЭ Bond Elut Certify	2 мл MeOH-28 % аммиак (98:2) / GX-MC	[154]
100.	эфедрин, фенилпропаноламин, метилэфедрин	плазма, моча, волосы крысы, волосы человека	Bond Elut Certify	3 мл MeOH-5 М HCl (20:1) / GX-MC	[155]
101.	ТГК-СООН	моча	CLEAN SCREEN RSV	2 x 750 мкл гексан-ЭА (75:25) / GX-MC	[156]
102.	количественное определение дигидрокодеина, дигидроморфина, N-нордигидрокодеина, дигидрокодеина-6-Glu, дигидроморфина-3- и 6-Glu	посмертная кровь, печень, почки, головной мозг, волосы	Bond Elut C8	200 мкл *2 1 М HCl / MeOH (1:50) / ВЭЖХ-УФ GX-MC	[157]
103.	16 лекарственных и наркотических веществ кислотного и основного характера (барбитураты, ТАД, опиаты, БЭ)	цельная кровь, плазма, моча	Bond-Elut Certify (ручн.) WWM-DAU (автом.)	2 мл хлороформ-ацетон (кисл., нейтр.), 1,2 мл MeOH-аммиак (осн.) / GX-MC	[158]
104.	РСР, меланин	волосы, плазма крыс и мышей	Bond Elut Certify	2 % аммиачный ЭА / GX-MC ВЭЖХ с ЭХД	[159]
105.	пилокарпин, изопилокарпин пилокарпиновая кислота	плазма	Bakerbond Silica Gel Bakerbond Phenyl Последовательная двухэтапная SPE	1 мл MeOH 2,5 мл 1 % аммиачного MeOH / GX-MC, ВЭЖХ-УФ	[160]
106.	морфин, морфина-3 и 6 Glu, 6-MAM,	желчь, моча,	Bond Elut C18	0,5 мл MeOH-0,5 М УК (9:1) /	[161]

	кодеин, кодеина-6- Glu, дигидрокодеин, дигидроморфин, бупренорфин, ЛСД, метадон, ЕМЕ, грамадол, БЭ, ибобаин, кокаин	кровь, сыворотка, спинно-мозговая жидкость, стекловидное тело		ВЭЖХ-МС	
107.	оланзапин	моча, сыворотка	C18	2* 0.5 мл MeOH - 0.5 МУК (9:1) / ЖХ-МС	[162]
108.	МДМА, МДА, ГМА, ГММА	плазма, моча	Bond Elut Certify	2 мл 2 % аммиачного хлороформа (плазма), 2 мл 2% гидроксида аммония в ЭА (моча) / ГХ	[163]
109.	сальбутамол	моча человека и телят	Extrelut LiChrolut TSC	трет-бутилметилловый эфир и гексан 2 мл этанол-гексан-аммиак (70:25:5) / ВЭЖХ	[1764]
110.	метадон, 2-этилидин-1,5-диметил-3,3 – дифенилпиридин (продукт пиролиза метадона в инжекторе ГХ)	моча	Bond Elut Certify	2 мл 2 % аммиачный ЭА / ГХ-МС	[165]
111.	простагландин E1, простагландин E0, 15-кето-простагландин E0	плазма	Bond Elut C18 Bond Elut Si	ГХ-МС	[166]
112.	ЛСД, 2-оксо-3-гидрокси-диэтиламид лизергиновой кислоты	моча	Bond Elut Certify	2 мл ЭА с 4 % гидроксида аммония / ГХ-МС	[167]
113.	лидокаин, диазепам	плазма	SPEC-PLUS-PT	100 мкл ЭА / ГХ-ПВД	[168]
114.	топирамат	плазма, цельная кровь	C18	ВЭЖХ	[169]
115.	кленбутерол	моча человека, телячья кожа	Empore C8 SPEM	200 мкл ACN / ВЭЖХ	[170]
116.	метилловый эфир ангидроэкгоина (метилэктогониин) - продукт пиролиза кокаина	сыворотка	Bond Elut Certify	3 мл дихлорметан-ИПС-аммиак (80:80:2) / ГХ-МС	[171]
117.	лекарственные и наркотические вещества кислотного, нейтрального, основного характера	моча	SPEC PLUS C18AR / MP3	1 мл ЭА-ацетон (1:1) (кисл. и нейтр.), 1 мл ЭА (осн.) / ГХ-МС	[172]

118.	карбамазепин, этосуксимид, фенобарбитал, фенитоин, примидон вальпроевая кислота	цельная кровь, печень	Bond Elut Certify	2 мл ацетона/ГХ-МС	[173]
119.	альфа-циклодекстрин	плазма	Bond Elut C18	2 мл *2 MeOH / ВЭЖХ-МС	[174]
120.	амфетамин, метамфетамин, дизайнерские и другие фенэтиламины (МДА, МДБА, МДМА, катинон, эфедрин, фенфлурамин, фентермин и др.)	сыворотка	Bond Elut C18	0,5 мл MeOH / 0,5 М УК (9:1) / ВЭЖХ-МС	[175]
121.	19 БДА, 2 тиенодиазепина	цельная кровь	Oasis HLB	5 мл метилентхлорид /ГХ-МС	[176]
122.	70 лекарственных и наркотических веществ, их метаболиты	сыворотка	Bakerbond C18 HCX Bakerbond SDB1	2 мл метилформиат 2 мл метилформиат-гексан (1:3) (кисл, нейтр) 2 мл метилформиат-аммиак(98:2)(осн) 2 мл метилформиат /ВЭЖХ-МС	[177]
123.	скрининг 25 лекарственных и наркотических веществ: опиаты, кокаин, амфетамины, ТАД, БДА, фенотиазины и др.	кровь, моча, желчь содержимое желудка	Bond-Elut Certify (1 патрон для веществ кислотного, 2- для веществ основного характера)	1 - 4 мл метилентхлорид (кислые), 2 - 2 мл ACN (БДА), 2 % аммиачный хлороформ-ИПС (80:20) /ГХ-АФД, ГХ-МС	[178]
124.	такролимус	кровь	SDB-XC (полуавт.)	ACN - вода (90:10) / ВЭЖХ-МС	[35]
125.	107 лекарственных веществ различной структуры (допинг)	плазма лошади	Bond Elut Certify (1 г / 6 мл)	ацетон-хлороформ (1:1) (кисл. и нейтр.), 2 % аммиачный ЭА (осн.) /ГХ-МС	[179]
126.	29 фосфорорганических пестицида	цельная кровь, сыворотка	ЖЖЭ, C18 Oasis HLB	3 мл ЭА / ГХ-МС	[180]
127.	ацетилкодеин; кодеин, кодеин 6- Glu, папаверин, носкапин, диаморфин, 6-МAM, морфин	моча	Bond Elut C-18, Chromabond Multi 96 C-18, Versaplate Bond Elut C-18, Versaplate Bond Elut HF	0,5 мл MeOH - 0,5 М УК (9:1) / ВЭЖХ-МС	[181]
128.	метилловый и этиловый эфиры экгоина, БЭ, МДА, метамфетамин,	сыворотка, моча	Bond Elut Certify	3 мл дихлорметан-ИПС-конц. аммиак (80:80:2), 2 мл MeOH-	[182]

	гидроксикокаин, гидрокси-кокаэтилен, 3- и 4-бензилэтонин			конц. аммиак-(98:2)/ГХ-МС	
129.	парацетамол (ацетаминифен)	цельная кровь, печень	Bond Elut Certify	2 мл ацетон /ГХ-МС	[183]
130.	бупренорфин, норбупренорфин, их глюкурониды	плазма	C 18	1 мл MeOH / ВЭЖХ-МС/МС	[184]
131.	кетобемидон, его основные метаболиты	плазма, моча	Oasis HLB	500 мкл 25 % ACN 25 ммол/л муравьиной кислоты /ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС	[185]
132.	морфин, кодеин, дигидрокодеин, 6-Мам, 6-ацетилкодеин	моча	Oasis HLB	1 мл MeOH / ВЭЖХ-МС/МС	[186]
133.	силденафил, нор-силденафил	волосы крыс	ЖЖЭ MeOH-5 M HCl (20:1), очистка Bond Elut Certify	3 мл метиленхлорид-ИПС-28% аммиак (49: 49: 2) / ГХ-МС	[187]
134.	15 БДА и их метаболитов	моча	Bond Elut PH	1 мл MeOH / ГХ-МС	[188]
135.	морфин, кодеин, 6-Мам, кокаин, БЭ, метилэтонин (межлабораторные испытания)	волосы	Bond Elut Certify	ИПС-2 % аммония гидроксид (8:2) (1мл + 1 мл) / ГХ-МС	[189]
136.	лекарственные вещества кислотного полярного характера	плазма теленка	Absolut-Tox (SDVB)	1мл ЭА-ацетон (80:20)/ ВЭЖХ-ДМД	[190]
137.	МДМА, МДА, ГММА, 4-гидрокси-3-метоксикамфетамин	моча, плазма	Bond Elut Certify	2 мл ЭА- 2 % аммония гидроксид /ГХ-МС Капиллярный электрофорез	[191]
138.	ТГК-СООН, ТГК-СООН - Glu	моча, плазма	Bond Elut Certify	MeOH / ВЭЖХ-МС-МС	[192]
139.	3, 4-дигидроксиметамфетамин (метаболит «экстази»)	плазма моча	Bond Elut SCX	2 мл MeOH -HCl (99:1) с 3 % 250 мMEDTA и 3 % 250 мМ натрия бисульфит /ВЭЖХ-ЭХД	[193]
140.	68 лекарственных и наркотических веществ кислотного, нейтрального, основного характера	цельная кровь	Oasis MCX	ацетон - хлороформ (1:1) (кисл), ЭА- аммиак (98: 2) (осн.) / ГХ-АФД	[194]
141.	вилосказин, венлафаксин, имипрамин, дезипрамин, сертралина, амоксапин	цельная кровь	Chem Elut Bond Elut Certify	20 мл дихлорметан-ИПС (85:15) 3,5 мл ацетон/дихлорметан (1: 1)	[195]

						и 3 мл дихлорметан-ИПС-аммиак (78:14:8) / ГХ-АФД	
142.	клонидин		сыворотка		OASIS HLB	1,5 мл MeOH / ГХ-МС	[196]
143.	флекаинид, два его основных метаболита		гемолизованная кровь, моча, стекловидное тело, желчь,		LiChrolut RP-C18	1 мл MeOH / ГХ-АФД ГХ-МС ВЭЖХ-ДАД	[197]
144.	R, S- α пирролидинопропиофенон (PPP); его метаболиты		моча крыс		Isolute Confirm HСХ	1, 1,5 мл MeOH, 2, 1 мл метанол-аммиак (98:2) / ГХ-МС	[198]
145.	алкалоиды опиума: морфин, кодеин, тебаин, носкапин, папаверин, меконовая кислота и меконин, их метаболиты		моча крыс		Oasis HLB	3 мл метанол / ВЭЖХ-МС	[199]
146.	флуоксетин, амитриптилин, нортриптилин, тримипрамин, мапротилин, кломипрамин, гразодон		цельная кровь		Chem Elut Bond Elut Certify	20 мл дихлорметан/ИПС (85:15) 3,5 мл ацетон-дихлорметан (1:1) и 3 мл дихлорметан - ИПС- аммиак (78:14:8) / ГХ-АФД	[200]
147.	флувоксамин, миансерин, доксерпин, циталопрам, пароксетин этаперидон		цельная кровь		Chem Elut CE 1010 Bond Elut Certify	10 мл*2 дихлорметан-ИПС (85:15) / 3,5 мл ацетон-дихлорметан (1:1) + 3 мл дихлорметан-ИПС-аммиак (78:14:8) / ГХ-АФД	[201]
148.	хлорамфеникол глюкуронид хлорамфеникола		куриное мясо, мёд, морепродукты, моча крыс		ЖЖЭ Bond Elut C18	3 мл MeOH / ВЭЖХ-МС/МС	[202]
149.	атропин, скополамин		семена Datura, желудок, печень		Oasis HLB	5 мл MeOH / ВЭЖХ-ДМД, ВЭЖХ-МС	[203]
150.	мепивакаин, лидокаин, бупивакаин, ропивакаин		сыворотка		Chromosorb 103, Tenax-Chromosorb T, Chromosorb®	4 мл ACN / ГХ-ПИД	[204]
151.	фенпрокумон, варфарин, их моногидроксиглированные метаболиты		плазма моча		Sep Pak C18	1 мл ACN - вода (40:60) в 25 mM аммиаке (pH 10,0) / ВЭЖХ-МС	[205]
152.	миртазапин, клорпромазин,		цельная кровь		Chem Elut	10 мл*2 дихлорметан-ИПС	[206]

	левомепромазин, клогипазин, оланзапин, клозапин, галоперидол тиоридазин		Bond Elut Certify	(85:15) 3,5 мл ацетон-дихлорметан (1:1)+ 3 мл дихлорметан-ИПС-аммиак (78:14:8)/ГХ-АФД	
153.	сиролимус, такролимус, циклоспорин	цельная кровь	Strata SDB-L автом. Gilson ASPEC XL4	ACN: вода (90:10) / ВЭЖХ-МС	[207]
154.	дезлоратадин, 3-гидроксидезлоратадин	плазма	96-луночный Oasis® HLB MCX, SPEC® SCX, SPEC® MP1	MeOH: ACN: вода: аммиак (45:45:10:4%) / ЖХ-МС/МС	[208]
155.	одновременное определение морфина, кодеина, 6-МAM, кокаин, кокаэтилен, БЭ, метадон, 2-этилен-1,5-диметил-дифенилпропионидин	плазма	Bond Elut Certify	3 мл хлороформ-ИПС (4:1) / ВЭЖХ-ДАД	[209]
156.	β-агонисты (фенотерол, салбутамол, соталол тербуталин), β-антагонисты (карведиол, бетаксолол, бисопролол пропранолол)	моча	сульфат цинка + этанол, Oasis HLB, MCX, MAX Waters	2 мл 2% аммиачный MeOH 2 мл 2% муравьиная кислота в метаноле / ВЭЖХ-УФ ВЭЖХ- МС/МС	[210]
157.	одновременная идентификация и количественное определение опиатов, амфетаминов, кокаина, диазепам и нордизапама	волосы	Bakerbond Nare-2	1. 2 мл хлороформ-ИПС (80:20), 2. 2 мл хлороформ-ИПС-аммиак (80:20:3) (осн.) / ГХ-МС	[211]
158.	барбитал, амобарбитал, фенобарбитал	свинина	MWCNT (углеродные нанотрубки), СВЧ	ацетон-ЭА (3:7) / ГХ-МС-МС	[52]
159.	морфина-3- Glu, кодеина-6- Glu, этилморфина-6- Glu, 6-МAM	моча	Oasis HLB	500 мкл 20 % ACN в 25 ммол/л муравьиной кислоты / ВЭЖХ- МС, ГХ-МС	[212]
160.	триптофан, серотонин, психоактивные триптамины	моча	Sep-Pak C18	2 мл метанол / ТСХ в УФ 365 нм, ГХ-МС	[213]
161.	аконитин, анабазин, атропин, бруцин, колхицин, котинин, цитизин, ибобаин, никотин, скополамин, стрихнин, йохимбин	моча, сыворотка	CHROMABOND C18ec	1,5 мл дихлорметан и 1 мл дихлорметан-ИПС-25 % аммиак (8:2:0.2) / ВЭЖХ-УФ	[214]
162.	кетамин, норкетамин,	моча	Bond Elut Certify I	4 мл дихлорметан-ИПС-аммиак	[215]

	дегидроноркетамин				(78:20:2) / ВЭЖХ-МС/МС	
163.	122 лекарственных и наркотических веществ и метаболитов	цельная кровь	Clean Screen DAU		3 мл гексан-ЭА (50:50) (кисл., нейтр.); 3 мл метилхлорид-ИПС-аммиак (78:20:2) (осн.) / ГХ-МС	[216]
164.	ТГК и ТГК-СООН	цельная кровь	C10H4F17		ЭА-гексан (50:50) с 2 % УК / ВЭЖХ-МС/МС	[217]
165.	бупивакаин, 5 его метаболитов	плазма	Bond Elut C2, C8, C18, ENV (ASPEC Gilson)		1 мл MeOH / ГХ-МС ГХ-АФД	[218]
166.	ЛП стероидного строения: кортизон, дексаметазон, преднизолон, кортизол, кортинеф, кортизол, кортикостерон, 11-дзокси кортикостерон, 11-дзокси кортизол	моча, сыворотка	Sepatron C18, силикагель «КСК», Purosep-270		MeOH – дихлорметан (1:2) / ВЭТСХ, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДАД	[219]
167.	кокаин, ВЕ, метиловый эфир экгонина	волосы головы, лобковые волосы	Bakerbond Nare-2		1. 2 мл хлороформ-ИПС (80:20), 2. 2 мл хлороформ-ИПС-аммиак (80:20:3) (осн.) / ГХ-МС	[220]
168.	фталаты (диметил-, диэтил-, дибутилфталат и др.), адипаты (диэтил-, дибутил-, диизобутиладипат и др.)	сыворотка	Oasis MAX		2 мл 100 % ACN / ГХ-МС	[221]
169.	нандролон (19-норгестостерон), его метаболиты фазы I и фазы II	моча	Strata NH2 + Strata X ЖЖЭ + Strata X + C18		3 мл формиат аммония / NH ₃ (30 mM) / MeOH / NH ₃ (30 mM) (1:1) + 3 мл MeOH / ВЭЖХ-МС-МС 3,0 мл MeOH / ГХ - МС	[222]
170.	МДПВ, его метаболиты	моча	AccuBond (II) EVIDEX		1. 2* 2мл гексан-ЭА (3:1), 2. 2* 2мл дихлорметан-ИПС-25 % аммиак (4:1:01,1) / ГХ-МС	[223]
171.	РСР	сыворотка, кровь, посмертная кровь	Strata X-C		5 мл MeOH-10 % аммония гидроксид / ЖХ-МС-МС ГХ-ПИД	[224]
172.	стрихнин (количественное определение)	моча, кровь	AccuBond (II) EVIDEX		1 мл *2 гексан-ЭА (3:1)) (кисл.), 1 мл *2 дихлорметан-ИПС-25%	[225]

			SPEC MP3		аммиак (4:1:0,1) (осн.) 0,5 мл *2 дихлорметан-ИПС-25% аммиак (4:1:0,1) / GX-MS	
173.	ометоат, диметоат, хлорпирифос, паратион-этил, хлорфенвинфос, хинальфос, азинфос-этил, диазинон	цельная кровь	Oasis HLB		2 мл MeOH - ИПС (1:1) / GX-MS	[226]
174.	JWH-018, JWH-073, их метаболиты	моча людей, крыс	AccuBond SPE ODS-C18		3 мл ацетон / GX-MS, ВЭЖХ-Q-TOF-MS	[227]
175.	JWH-250, его метаболиты	моча, сыворотка людей, моча крыс	AccuBond SPE ODS-C18		3 мл ацетон / GX-MS, ВЭЖХ-MS/MS	[228]
176.	JWH-018, JWH-073, их метаболиты	моча	Strata X-B		1 мл *5 ЭА-ИПС (85:15) / ЖХ-MS/MS	[229]
177.	аторвастатин, диклофенак, фуросемид, правастатин	плазма	Bond Elut Plexa		500 мкл MeOH / ВЭЖХ - MS/MS	[230]
178.	хлорпромазин, левомепромазин, промазин, прометазин, тримепразин	плазма	Mono Tip C (18)		MeOH / GX-MS	[231]
179.	селективные модуляторы андрогенных рецепторов (СМАР) и агонисты Δ-рецепторов активации пролиферации пероксисом (δ-РАПП)	моча	ЖЖЭ AccuBond II ODS-C-18, Adsorbex RP-18, Bond Elut-Certify, Oasis MCX, WAX, MAX, Strata-UBJ, TAK, Resprep C-18 (200 и 500 мг), C-8 (200 и 500мг), C-2, SAX, SCX, BenzSCX, NH ₂ , COOH +магнитная сепарация		3 мл метил-трет-бутиловый эфир / ВЭЖХ-MS/MS	[232]
180.	7-аминофлуниразепам, РСР, бупренорфин, флуниразепам, кетамин, метадон	цельная кровь	OASIS MCX (авт.)		2 мл ACN - MeOH (70:30) (кисл, нейтр.); 2 мл ЭА - аммиак (95: 5) / GX-MS	[233]
181.	22 лекарственных вещества: анальгетики, антиэпилептики, β-блокаторы,	кровь, моча	Oasis HLB МВИ		ЭА / GX-MS	[234]

	антибактериальные средства, антисептики, гормоны, липидные регуляторы и НПВС				
182.	AM-2201, 1 - [(5-фторпентил)-1Н-индол-3-ил] - (нафталин-1-ил)метанола UR-144 (KM-X1), (1-пентилиндо-3-ил) - (2,2,3,3-тетраметилпиклопропил) метанола	микросомы печени, моча человека	Bond Elute Certify	3 мл MeOH / ВЭЖХ-МС/МС, ЖХ-МСВР	[235]
183.	бисфенол А	сыворотка крови матери, пуповинная кровь ребенка	ЖЖЭ, Envi-Florisil + Oasis HLB	25 мл дихлорметан 6 мл MeOH + 5 мл ацетон / ГХ-МС/МС	[236]
184.	3-бромметкатинон, 3-фторметкатинон, их метаболиты	моча крысы, микросомы печени человека	Isolute HСХ	1. 1 мл MeOH, 2. 1 мл MeOH - аммиак 32 % (98:2) / ГХ-МС, ЖХ-МСВР	[237]
185.	JWH-250, его метаболиты	моча крысы	ЖЖЭ (НС) гидролиз)	3 мл ацетона ГХ-МС, ЖХ-МС/МС, ВЭЖХ-МС/МС	[238]
186.	JWH-018 и AM-2201, их гидроксиметаболиты, энантиомеры	моча, сыворотка человека	AccuBond C-18	1,0 мл *5 ЭА-ИПС (85:15) / Хиральная ВЭЖХ-МС/МС	[239]
187.	33 опиоида, опиаты, кокаин, БЕ, трамадол, амфетамины, эфедрин, меперидин, пентазоцин, 6-МAM пропоксифен, метадон, бупренорфин, норфентанил, метилэксгонин, и др.	волосы	96-луночный планшет Gilson Nebula 215 Oasis MCX	1 мл MeOH -аммиак (95:5) / УЭЖХ-МС/МС	[240]

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблицы к Главе 3 (п.3.2)

Таблица 1 – Матрица исследования для 7-факторного плана Бокса-Бенкена с кодированными величинами

Проба	Уровни факторов						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	0	0	0	-1	-1	-1	0
2	0	0	0	1	1	1	0
3	0	0	0	-1	1	-1	0
4	0	0	0	1	1	-1	0
5	0	0	0	-1	-1	1	0
6	0	0	0	1	-1	1	0
7	0	0	0	-1	1	1	0
8	0	0	0	1	1	1	0
9	-1	0	0	0	0	-1	-1
10	1	0	0	0	0	-1	-1
11	-1	0	0	0	0	1	-1
12	1	0	0	0	0	1	-1
13	-1	0	0	0	0	-1	1
14	1	0	0	0	0	-1	1
15	-1	0	0	0	0	1	1
16	1	0	0	0	0	1	1
17	0	-1	0	0	-1	0	-1
18	0	1	0	0	-1	0	-1
19	0	-1	0	0	1	0	-1
20	0	1	0	0	1	0	-1
21	0	-1	0	0	-1	0	1
22	0	1	0	0	-1	0	1
23	0	-1	0	0	1	0	1
24	0	1	0	0	1	0	1
25	-1	-1	0	-1	0	0	0
26	1	-1	0	-1	0	0	0
27	-1	-1	0	-1	0	0	0
28	1	1	0	-1	0	0	0
29	-1	-1	0	1	0	0	0
30	1	-1	0	1	0	0	0
31	-1	1	0	1	0	0	0
32	1	1	0	1	0	0	0
33	0	0	-1	-1	0	0	-1
34	0	0	1	-1	0	0	-1
35	0	0	-1	1	0	0	-1
36	0	0	1	1	0	0	-1
37	0	0	-1	-1	0	0	1

38	0	0	1	-1	0	0	1
39	0	0	-1	1	0	0	1
40	0	0	1	1	0	0	1
41	-1	0	-1	0	-1	0	0
42	1	0	-1	0	-1	0	0
43	-1	0	1	0	-1	0	0
44	1	0	1	0	-1	0	0
45	-1	0	-1	0	1	0	0
46	1	0	-1	0	1	0	0
47	-1	0	1	0	1	0	0
48	1	0	1	0	1	0	0
49	0	-1	-1	0	0	-1	0
50	0	1	-1	0	0	-1	0
51	0	-1	1	0	0	-1	0
52	0	1	1	0	0	-1	0
53	0	-1	-1	0	0	1	0
54	0	1	-1	0	0	1	0
55	0	-1	1	0	0	1	0
56	0	1	1	0	0	1	0
57	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 2 – Матрица исследования для 7-факторного плана Бокса-Бенкена с реальными величинами

№ опыта	pH _{ФБ}	V _{ФБ} , мл	C _{УК} , моль/л	Cэ, %	1 элюент	C _М , %	2 элюент
Факторы	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
32	6	3	0,01	20	3:1	50	3:1:0,1
35	5,4	2	0	20	3:1	50	2:1:0,1
2	5,4	2	0,01	20	2:1	-	3:1:0,1
41	4,8	2	0	10	2:1	50	3:1:0,1
48	6	2	0,1	10	4:1	50	3:1:0,1
44	6	2	0,1	10	2:1	50	3:1:0,1
10	6	2	0,01	10	3:1	-	2:1:0,1
5	5,4	2	0,01	-	2:1	100	3:1:0,1
26	6	1	0,01	-	3:1	50	3:1:0,1
47	4,8	2	0,1	10	4:1	50	3:1:0,1
61	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
15	4,8	2	0,01	10	3:1	100	4:1:0,1
45	4,8	2	0	10	4:1	50	3:1:0,1
49	5,4	1	0	10	3:1	-	3:1:0,1
6	5,4	2	0,01	20	2:1	100	3:1:0,1
25	4,8	1	0,01	-	3:1	50	3:1:0,1
8	5,4	2	0,01	20	4:1	100	3:1:0,1
21	5,4	1	0,01	10	2:1	50	4:1:0,1
50	5,4	3	0	10	3:1	-	3:1:0,1
54	5,4	3	0	10	3:1	100	3:1:0,1
12	6	2	0,01	10	3:1	100	2:1:0,1
13	4,8	2	0,01	10	3:1	-	4:1:0,1
33	5,4	2	0	-	3:1	50	2:1:0,1
58	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
20	5,4	3	0,01	10	4:1	50	2:1:0,1
9	4,8	2	0,01	10	3:1	-	2:1:0,1
52	5,4	3	0,1	10	3:1	-	3:1:0,1
36	5,4	2	0,1	20	3:1	50	2:1:0,1
30	6	1	0,01	20	3:1	50	3:1:0,1
59	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
17	5,4	1	0,01	10	2:1	50	2:1:0,1
19	5,4	1	0,01	10	4:1	50	2:1:0,1
53	5,4	1	0	10	3:1	100	3:1:0,1
55	5,4	1	0,1	10	3:1	100	3:1:0,1
28	6	3	0,01	-	3:1	50	3:1:0,1
4	5,4	2	0,01	20	4:1	-	3:1:0,1
56	5,4	3	0,1	10	3:1	100	3:1:0,1

39	5,4	2	0	20	3:1	50	4:1:0,1
34	5,4	2	0,1	-	3:1	50	2:1:0,1
42	6	2	0	10	2:1	50	3:1:0,1
31	4,8	3	0,01	20	3:1	50	3:1:0,1
7	5,4	2	0,01	-	4:1	100	3:1:0,1
62	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
16	6	2	0,01	10	3:1	100	4:1:0,1
57	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
1	5,4	2	0,01	-	2:1	-	3:1:0,1
37	5,4	2	0	-	3:1	50	4:1:0,1
18	5,4	3	0,01	10	2:1	50	2:1:0,1
40	5,4	2	0,1	20	3:1	50	4:1:0,1
51	5,4	1	0,1	10	3:1	-	3:1:0,1
3	5,4	2	0,01	-	4:1	-	3:1:0,1
46	6	2	0	10	4:1	50	3:1:0,1
22	5,4	3	0,01	10	2:1	50	4:1:0,1
24	5,4	3	0,01	10	4:1	50	4:1:0,1
29	4,8	1	0,01	20	3:1	50	3:1:0,1
38	5,4	2	0,1	-	3:1	50	4:1:0,1
43	4,8	2	0,1	10	2:1	50	3:1:0,1
60	5,4	2	0,01	10	3:1	50	3:1:0,1
27	4,8	1	0,01	-	3:1	50	3:1:0,1
23	5,4	1	0,01	10	4:1	50	4:1:0,1
14	6	2	0,01	10	3:1	-	4:1:0,1
11	4,8	2	0,01	10	3:1	100	2:1:0,1

Таблица 3 – Результаты эффективности экстракции кеторолака

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	40,57	43,44	42,01
2	25,32	21,44	23,38
3	32,51	31,64	32,08
4	35,4	31,9	33,65
5	28,48	24,03	26,26
6	29,07	28,39	28,73
7	36,38	32,22	34,30
8	26,41	24,17	25,29
9	27,12	31,33	29,23
10	13,35	12,86	13,11
11	26,62	31,23	28,93
12	20,04	18,02	19,03
13	19,9	17,78	18,84
14	35,32	32,47	33,90
15	24,92	23,59	24,26
16	41,93	44,78	43,36
17	42,07	41,59	41,83
18	39,94	41,84	40,89
19	40,54	44,56	42,55
20	23,44	26,84	25,14
21	33,26	31,95	32,61
22	39,17	40,31	39,74
23	44,65	43,6	44,13
24	43,28	35,46	39,37
25	20,37	22,73	21,55
26	12,24	11,98	12,11
27	43,65	50,83	47,24
28	28,77	27,49	28,13
29	47,35	42,72	45,04
30	28,57	31,82	30,20
31	35,34	38,59	36,97
32	7,43	8,14	7,79
33	30,98	26,86	28,92
34	44,68	42,38	43,53
35	5,24	2,15	3,70
36	46,49	42,81	44,65
37	46,28	44,86	45,57
38	53,44	50,32	51,88
39	5,96	4,7	5,33
40	43,11	46,84	44,98

41	2,59	2,19	2,39
42	6,74	8,93	7,84
43	48,6	51,43	50,02
44	15,72	16,08	15,90
45	6,58	6,68	6,63
46	6,65	6,4	6,53
47	25,99	25,53	25,76
48	9,96	12,78	11,37
49	9,66	5	7,33
50	6,75	3,94	5,35
51	44,03	39,08	41,56
52	44,35	42,6	43,48
53	5	5,27	5,14
54	6,17	8,79	7,48
55	37,69	36,54	37,12
56	50,72	44,74	47,73
57	42,89	52,17	47,53
58	23,51	21,65	22,58
59	46,9	46,35	46,63
60	47,18	45,88	46,53
61	35,79	34,47	35,13
62	46,74	46,4	46,57

Таблица 4 – Результаты эффективности экстракции амитриптилина

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	79,28	80,75	80,02
2	80,29	79,93	80,11
3	76,84	72,38	74,61
4	87,45	89,76	88,61
5	74,02	78,7	76,36
6	85,71	76,89	81,30
7	63,25	64,07	63,66
8	80,74	79,83	80,29
9	71,86	78,01	74,94
10	68,66	70,73	69,70
11	77,2	75	76,10
12	58,27	66,12	62,20
13	66,62	72,27	69,45
14	76,48	79,8	78,14
15	70,91	75,59	73,25
16	64,73	71,21	67,97
17	76,27	77,6	76,94
18	84,56	86,55	85,56
19	72,86	83,44	78,15
20	77,23	78,15	77,69
21	71,79	72,97	72,38
22	74,23	76,64	75,44
23	63,5	69,61	66,56
24	81,44	79,8	80,62
25	65,8	67,56	66,68
26	70,62	74,67	72,65
27	68,78	69,6	69,19
28	65,44	69,8	67,62
29	64,5	69,81	67,16
30	78,54	77,67	78,11
31	72,1	75	73,55
32	75,98	69,72	72,85
33	76,06	71,83	73,95
34	72,87	80,93	76,90
35	75,31	77,5	76,41
36	80,2	72,21	76,21
37	77,53	81,98	79,76
38	80,52	61,27	70,90
39	72,79	74,14	73,47
40	82,41	75,01	78,71

41	87,96	72,44	80,20
42	81,41	83,87	82,64
43	68,73	61,24	64,99
44	84,69	69,78	77,24
45	77,42	81,04	79,23
46	85,54	77,46	81,50
47	81,82	86,15	83,99
48	88,61	57,95	73,28
49	83,55	84,87	84,21
50	71,39	72,43	71,91
51	72,78	76,84	74,81
52	82,97	82,33	82,65
53	77,4	83,45	80,43
54	69,54	65,54	67,54
55	87,96	79,82	83,89
56	73,22	74,02	73,62
57	66,51	74,49	70,50
58	83,12	69,56	76,34
59	74,49	76,06	75,28
60	71,07	70,73	70,90
61	86,18	88,71	87,45
62	73,02	73,73	73,38

Таблица 5 – Результаты эффективности экстракции кокаина

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	71,99	70,17	71,08
2	79,81	77,45	78,63
3	63,97	61,66	62,82
4	82,15	82,36	82,26
5	76,87	75,05	75,96
6	74,68	68,32	71,50
7	56,18	59,1	57,64
8	76,51	83,83	80,17
9	75,95	80,89	78,42
10	67,23	63,28	65,26
11	85,04	7,69	46,37
12	49,35	66,19	57,77
13	74,19	76,36	75,28
14	86,03	88,52	87,28
15	53,99	64,18	59,09
16	54,21	55,68	54,95
17	73,01	74,87	73,94
18	72,91	73,27	73,09
19	73,12	76,79	74,96
20	79,49	79,61	79,55
21	68,59	72,41	70,50
22	61,43	61,4	61,42
23	56,88	57,52	57,20
24	65,16	63,75	64,46
25	71,94	77,92	74,93
26	68,02	73,07	70,55
27	58,97	57,88	58,43
28	73,04	73,23	73,14
29	51,6	55,6	53,60
30	80,18	84,02	82,10
31	65,21	65,99	65,60
32	72,93	67,13	70,03
33	73,96	71,57	72,77
34	65,87	67,06	66,47
35	75,42	77,52	76,47
36	76,14	73,06	74,60
37	66,03	65,23	65,63
38	59,86	53,14	56,50
39	61,65	66,57	64,11
40	61,16	60,15	60,66

41	81,26	64,04	72,65
42	64	67,77	65,89
43	54,87	55,73	55,30
44	68,06	67,14	67,60
45	71,62	70,07	70,85
46	67,12	58,1	62,61
47	73,59	78,01	75,80
48	82,81	69	75,91
49	92,79	89,89	91,34
50	68,01	70,74	69,38
51	61,49	62,58	62,04
52	67,96	81,54	74,75
53	60,25	71,33	65,79
54	61,78	51,13	56,46
55	72,62	72,57	72,60
56	61,6	62,62	62,11
57	55,53	61,28	58,41
58	78,43	73,48	75,96
59	73,57	72,48	73,03
60	61,22	58,68	59,95
61	76,97	79,54	78,26
62	61,14	57,27	59,21

Таблица 6 – Результаты эффективности экстракции диазепама

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	57,53	60,35	58,94
2	104,94	94,71	99,83
3	33,1	31,2	32,15
4	40,78	43,95	42,37
5	36,31	37,83	37,07
6	55,61	96,62	76,12
7	28,36	21,45	24,91
8	108,68	51,14	79,91
9	32,23	92,34	62,29
10	45,87	86,81	66,34
11	64,41	48,1	56,26
12	26,28	88,94	57,61
13	26,18	82,31	54,25
14	56,79	45,64	51,22
15	46,91	21,55	34,23
16	74,3	69,07	71,69
17	88,02	106,77	97,40
18	46,84	49,05	47,95
19	34,71	41,83	38,27
20	99	119,09	109,05
21	45,4	39,83	42,62
22	118,28	85,28	101,78
23	130,86	104,68	117,77
24	52,29	132,23	92,26
25	25,7	34,56	30,13
26	20,62	25,46	23,04
27	57,28	42,62	49,95
28	34,19	20,21	27,20
29	62,33	123,78	93,06
30	52,2	37,05	44,63
31	86,08	40,3	63,19
32	68,48	61,98	65,23
33	0	0	0,00
34	126,49	115,48	120,99
35	0,42	0,43	0,43
36	101,35	122,03	111,69
37	0	0	0,00
38	92,3	85,52	88,91
39	0,98	1,87	1,43
40	112,03	131,83	121,93

41	1,75	0,89	1,32
42	0,41	0,81	0,61
43	122,03	82,24	102,14
44	93,22	74,29	83,76
45	1,41	0,83	1,12
46	0,32	1,11	0,72
47	98,5	88,79	93,65
48	87,3	67,18	77,24
49	1,37	0	0,69
50	0	0	0,00
51	89,32	101,03	95,18
52	125,01	69,97	97,49
53	0	0	0,00
54	0	0	0,00
55	75,19	126,58	100,89
56	76,81	130,54	103,68
57	73,7	73,02	73,36
58	115,42	73,72	94,57
59	56,04	88,91	72,48
60	82,56	119,63	101,10
61	26,11	32,43	29,27
62	126,6	61,53	94,07

Таблица 7 – Результаты эффективности экстракции фенобарбитала

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	65,19	72,82	69,01
2	33,46	27,75	30,61
3	68,22	62,26	65,24
4	43,56	46,59	45,08
5	52,71	49,4	51,06
6	38,17	39,69	38,93
7	60,06	63,83	61,95
8	28,78	27,27	28,03
9	33,24	41,4	37,32
10	16,02	14,71	15,37
11	57,53	57,15	57,34
12	22,74	20,87	21,81
13	22,66	21,07	21,87
14	69,97	58,38	64,18
15	33,18	31,88	32,53
16	57,99	60,6	59,30
17	65,42	71,89	68,66
18	50,91	51,76	51,34
19	63,42	70,16	66,79
20	28,88	29,24	29,06
21	41,4	43,49	42,45
22	55,72	61,11	58,42
23	70,6	71,17	70,89
24	62,13	54,37	58,25
25	28,28	35,53	31,91
26	23,55	22,85	23,20
27	90,82	94,45	92,64
28	48,98	47,8	48,39
29	45,47	47,91	46,69
30	35,13	35,94	35,54
31	33,56	36,15	34,86
32	7,33	7,25	7,29
33	54,62	51,01	52,82
34	90,54	86,56	88,55
35	27,25	28,51	27,88
36	44,49	45,59	45,04
37	73,43	76,32	74,88
38	87,93	81,53	84,73
39	44,15	44	44,08
40	38,71	48,05	43,38

41	9,67	10,19	9,93
42	29,23	32,07	30,65
43	67,74	76,86	72,30
44	14,64	15,71	15,18
45	33,49	28,9	31,20
46	36,89	34,76	35,83
47	27,37	28,38	27,88
48	11,58	11,99	11,79
49	42,66	47,58	45,12
50	32,12	32,82	32,47
51	58,74	61,63	60,19
52	57,65	51,33	54,49
53	43,89	53,02	48,46
54	48,25	52,69	50,47
55	57	57,72	57,36
56	54,16	56,84	55,50
57	58,72	70,6	64,66
58	31,15	31,4	31,28
59	64,92	74,6	69,76
60	55,8	67,28	61,54
61	52,03	56,12	54,08
62	65,93	61,43	63,68

Таблица 8 – Результаты эффективности экстракции амфетамина

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	95,57	105,43	100,50
2	106,35	104,1	105,23
3	110,64	102,44	106,54
4	119,88	116,75	118,32
5	104,19	103,56	103,88
6	104,41	105,03	104,72
7	95,46	97,72	96,59
8	102,89	110,13	106,51
9	98,96	109,64	104,30
10	99,08	101,19	100,14
11	93,28	87,93	90,61
12	87,37	91,54	89,46
13	98,48	102,63	100,56
14	99,65	98,22	98,94
15	101,4	102,79	102,10
16	95,01	96,2	95,61
17	97,98	96,83	97,41
18	112,24	114,72	113,48
19	98,25	105,92	102,09
20	107,48	106,27	106,88
21	95,51	98,43	96,97
22	102,29	101,87	102,08
23	97,13	104,82	100,98
24	115,53	107,26	111,40
25	94,25	97,56	95,91
26	100,68	103,24	101,96
27	95,28	94,8	95,04
28	107,25	111	109,13
29	89,09	96,07	92,58
30	106,97	109,41	108,19
31	97,98	98,13	98,06
32	101,56	93,3	97,43
33	99,09	99,06	99,08
34	98,7	105,59	102,15
35	94,03	93,74	93,89
36	91,77	95,55	93,66
37	108,92	109,39	109,16
38	97,29	92,52	94,91
39	100,94	100,99	100,97
40	105,66	105,91	105,79

41	116,5	87,59	102,05
42	98,68	98,75	98,72
43	97,17	93,72	95,45
44	102,66	94,89	98,78
45	101,39	99,43	100,41
46	115,69	104,7	110,20
47	110,68	112,92	111,80
48	111,03	94,77	102,90
49	107,1	102,48	104,79
50	99,54	100,08	99,81
51	100,82	105,19	103,01
52	108,1	109,17	108,64
53	102,88	101,91	102,40
54	90,01	83,69	86,85
55	113,03	107,36	110,20
56	94,32	92,51	93,42
57	88,11	107,68	97,90
58	99,13	101,41	100,27
59	99,66	100,68	100,17
60	101,32	99,06	100,19
61	100,46	99,81	100,14
62	101,72	102,94	102,33

Таблица 9 – Результаты эффективности экстракции индометацина

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	73,63	77,03	75,33
2	69,74	72,93	71,34
3	62,57	60,27	61,42
4	79,68	78,19	78,94
5	68,62	67,78	68,20
6	77,74	79,61	78,68
7	68,73	64,79	66,76
8	77,02	71,87	74,45
9	79,97	76,64	78,31
10	82,28	82,17	82,23
11	64,76	70,54	67,65
12	75,78	71,42	73,60
13	74,83	74,47	74,65
14	68,72	65,06	66,89
15	89,50	88,88	89,19
16	74,01	75,24	74,63
17	67,92	71,01	69,47
18	73,50	75,23	74,37
19	64,31	68,38	66,35
20	71,36	71,86	71,61
21	75,32	74,48	74,90
22	74,79	78,92	76,86
23	70,57	72,91	71,74
24	75,61	71,63	73,62
25	73,51	72,05	72,78
26	72,79	69,71	71,25
27	69,30	75,90	72,60
28	73,37	75,56	74,47
29	77,06	75,29	76,18
30	83,02	84,00	83,51
31	72,83	77,71	75,27
32	70,33	77,55	73,94
33	71,42	72,39	71,91
34	74,96	74,81	74,89
35	74,43	58,08	66,26
36	72,62	70,41	71,52
37	75,21	73,26	74,24
38	76,44	69,92	73,18
39	70,10	70,95	70,53
40	72,36	75,63	74,00

41	63,89	64,60	64,25
42	57,30	57,81	57,56
43	68,78	71,07	69,93
44	91,74	86,94	89,34
45	83,51	77,16	80,34
46	54,97	61,84	58,41
47	74,91	77,76	76,34
48	69,13	76,93	73,03
49	61,40	56,92	59,16
50	71,45	72,99	72,22
51	74,15	74,86	74,51
52	78,11	70,30	74,21
53	74,47	71,57	73,02
54	75,67	76,10	75,89
55	78,97	75,34	77,16
56	76,54	77,63	77,09
57	69,15	78,48	73,82
58	73,82	71,42	72,62
59	69,61	73,43	71,52
60	71,02	79,13	75,08
61	81,06	78,22	79,64
62	75,17	71,00	73,09

Таблица 10 – Результаты эффективности экстракции изониазида

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	0,00	0,00	0,00
2	1,96	0,00	0,98
3	1,31	0,00	0,66
4	0,00	0,00	0,00
5	2,40	0,00	1,20
6	1,04	0,66	0,85
7	0,00	1,25	0,63
8	0,00	0,00	0,00
9	0,70	1,01	0,86
10	0,00	0,74	0,37
11	1,09	1,12	1,11
12	0,00	0,69	0,35
13	0,00	0,89	0,45
14	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
16	2,77	0,00	1,39
17	0,00	0,94	0,47
18	0,00	1,84	0,92
19	0,00	0,00	0,00
20	0,70	0,00	0,35
21	1,66	1,79	1,73
22	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00
24	1,17	0,00	0,59
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00
27	1,01	0,00	0,51
28	1,90	2,46	2,18
29	1,75	1,89	1,82
30	2,72	1,79	2,26
31	1,10	1,15	1,13
32	101,56	93,3	97,43
33	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,00	0,00
35	0,00	0,00	0,00
36	0,00	0,00	0,00
37	0,00	0,50	0,25
38	0,00	0,00	0,00
39	0,00	0,00	0,00
40	0,00	0,99	0,50

41	0,00	0,00	0,00
42	0,57	0,00	0,29
43	2,35	1,83	2,09
44	0,00	0,00	0,00
45	0,00	0,00	0,00
46	0,00	0,00	0,00
47	0,00	1,12	0,56
48	0,00	0,00	0,00
49	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,90	0,45
51	0,00	0,97	0,49
52	0,00	0,00	0,00
53	0,00	0,00	0,00
54	0,00	0,00	0,00
55	1,21	0,00	0,61
56	0,00	0,00	0,00
57	1,66	1,60	1,63
58	0,00	0,00	0,00
59	0,00	0,00	0,00
60	0,00	1,20	0,60
61	0,00	0,00	0,00
62	1,39	1,16	1,28

Таблица 11 – Результаты эффективности экстракции салициловой кислоты

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	0,40	1,32	0,86
2	0,33	0,35	0,34
3	0,17	0,00	0,09
4	0,87	0,61	0,74
5	0,43	0,36	0,40
6	0,21	0,20	0,21
7	0,78	2,88	1,83
8	1,26	0,28	0,77
9	0,00	0,00	0,00
10	0,26	0,22	0,24
11	0,00	0,00	0,00
12	0,34	0,34	0,34
13	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
16	0,72	0,00	0,36
17	0,12	0,62	0,37
18	0,25	0,49	0,37
19	0,48	0,33	0,41
20	0,21	0,13	0,17
21	1,18	0,53	0,86
22	0,25	0,68	0,47
23	0,32	0,75	0,54
24	1,79	0,22	1,01
25	0,23	0,89	0,56
26	0,29	0,53	0,41
27	0,43	0,15	0,29
28	0,28	0,88	0,58
29	0,33	0,44	0,39
30	0,40	0,67	0,54
31	31	0,35	0,18
32	0,44	0,93	0,69
33	0,61	0,98	0,80
34	3,21	0,18	1,70
35	0,76	0,41	0,59
36	0,82	0,38	0,60
37	0,54	0,13	0,34
38	0,43	0,29	0,36
39	0,40	0,75	0,58
40	0,90	0,16	0,53

41	0,36	0,60	0,48
42	0,20	0,00	0,10
43	4,21	0,59	2,40
44	0,41	0,56	0,49
45	0,69	0,48	0,59
46	0,43	0,22	0,33
47	0,52	1,50	1,01
48	0,78	1,37	1,08
49	6,22	0,00	3,11
50	0,53	0,78	0,66
51	6,87	0,80	3,84
52	0,79	0,24	0,52
53	0,24	0,17	0,21
54	0,14	0,00	0,07
55	1,07	0,73	0,90
56	0,20	0,47	0,34
57	0,29	0,28	0,29
58	0,00	0,79	0,40
59	0,21	0,16	0,19
60	1,34	0,41	0,88
61	0,67	0,00	0,34
62	0,91	0,36	0,64

Таблица 12 – Результаты эффективности экстракции бензоилэкгонины

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	25,81	26,25	26,03
2	20,90	17,92	19,41
3	30,75	27,64	29,20
4	24,21	24,72	24,47
5	22,34	18,43	20,39
6	20,80	19,29	20,05
7	23,02	22,97	23,00
8	18,89	20,40	19,65
9	17,00	21,31	19,16
10	12,24	10,81	11,53
11	22,42	21,35	21,89
12	11,04	12,69	11,87
13	13,49	12,49	12,99
14	27,28	24,85	26,07
15	16,95	17,28	17,12
16	27,01	28,56	27,79
17	25,84	27,68	26,76
18	21,35	20,71	21,03
19	26,77	27,65	27,21
20	14,35	14,14	14,25
21	17,04	17,71	17,38
22	21,87	20,12	21,00
23	25,34	13,50	19,42
24	22,37	21,29	21,83
25	10,52	13,61	12,07
26	9,11	8,66	8,89
27	27,37	24,19	25,78
28	17,25	15,35	16,30
29	25,49	27,67	26,58
30	16,04	16,31	16,18
31	18,17	18,92	18,55
32	5,75	5,36	5,56
33	2,60	2,25	2,43
34	29,05	26,78	27,92
35	1,31	1,80	1,56
36	27,89	25,47	26,68
37	4,84	4,80	4,82
38	30,99	29,15	30,07
39	3,25	5,75	4,50
40	25,85	25,84	25,85

41	2,34	2,65	2,50
42	4,51	5,24	4,88
43	28,49	29,80	29,15
44	10,94	10,69	10,82
45	3,39	4,88	4,14
46	2,45	2,02	2,24
47	19,59	19,52	19,56
48	8,13	8,20	8,17
49	12,49	12,88	12,69
50	10,06	10,42	10,24
51	26,88	28,63	27,76
52	27,10	27,60	27,35
53	4,21	4,69	4,45
54	4,80	4,05	4,43
55	25,30	25,56	25,43
56	27,11	26,64	26,88
57	22,78	26,14	24,46
58	14,14	14,67	14,41
59	26,33	27,37	26,85
60	27,02	26,82	26,92
61	19,94	30,85	25,40
62	24,89	25,32	25,11

Таблица 13 – Результаты эффективности экстракции морфина

№ п.п.	проба 1	проба 2	среднее
1	28,24	30,23	29,24
2	85,84	61,83	73,84
3	39,46	59,80	49,63
4	98,83	82,15	90,49
5	55,19	34,75	44,97
6	50,38	32,24	41,31
7	42,39	67,05	54,72
8	55,05	34,93	41,99
9	44,54	76,82	60,68
10	78,06	77,43	77,75
11	56,11	40,59	48,35
12	47,45	52,07	49,76
13	18,36	23,3	20,83
14	10,25	10,36	10,31
15	5,86	8,07	6,97
16	110,62	130,62	120,62
17	84,95	91,28	88,12
18	110,48	117,61	114,05
19	81,16	67,78	74,47
20	94,02	97,93	95,98
21	116,56	113,76	115,16
22	21,13	24,34	22,74
23	9,29	10,86	10,08
24	30,64	18,18	24,41
25	67,29	77,81	72,55
26	67,46	42,18	54,82
27	28,39	26,23	27,31
28	90,86	97,80	94,33
29	82,83	105,27	94,05
30	96,43	94,40	95,42
31	110,48	115,04	112,76
32	10,21	9,79	10,00
33	99,19	100,81	100,00
34	85,00	102,47	93,74
35	91,42	88,82	90,12
36	93,38	75,60	84,49
37	20,10	30,56	25,33
38	8,16	9,17	8,67
39	28,91	20,76	24,84
40	32,81	39,96	36,39

41	12,38	8,67	10,53
42	59,95		59,95
43	91,46	73,43	82,45
44	28,82	30,40	29,61
45	78,28	65,44	71,86
46	109,94	89,36	99,65
47	20,46	43,45	31,96
48	29,59	23,73	26,66
49	56,27	30,85	43,56
50	105,13	113,27	109,20
51	32,68	41,69	37,19
52	37,57	26,58	32,08
53	10,35	12,25	11,30
54	10,43	14,60	12,52
55	56,70	34,41	45,06
56	25,31	20,52	22,92
57	102,26	117,33	109,80
58	19,70	26,55	23,63
59	20,97	22,44	21,71
60	45,32	58,64	51,98
61	24,94	25,85	25,40
62	119,31	112,21	115,76

Таблица 14 – Времена удерживания производных модельных соединений, метилированных НПВС, внутренних стандартов и их характеристические ионы

№ п/п	Соединение	Время удерживания	Величина m/z иона для количественной оценки
1	Амфетамин, N-ацетил-	8,13	86
2	Изониазид, диацетил-	9,77	106
3	Амитриптилин	11,92	58
4	Диазепам	13,09	256
5	Диацетилморфин	14,20	327
6	Ацетилэкгонин, 3,3,3,2,2- пропиловый эфир	8,37	300
7	Бензоилэкгонин, 3,3,3,2,2- пропиловый эфир	11,35	300
8	Кокаин	11,95	182
9	Салициловая кислота, диметиловый эфир	6,93	135
10	Фенобарбитал, диметил-	10,18	232
11	Кеторолак, метил-	12,62	210
12	Индометацин, метил-	16,05	139
14	Динонилфталат (ISTD)	15,74	149
15	Ибупрофен, метил-	8,28	161
16	Напроксен, метил-	10,89	185
17	Диклофенак, метил-	11,91	214
18	Кетопрофен, метил-	11,51	209
19	Гексенал, метил- (IS)	10,02	235

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Акты внедрения

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России)

Юридический адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Екатерининская, д.101
Почтовый адрес: Россия, 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д.2
Тел/факс (342) 233-55-01; 236-90-50; E-mail: perm@pfa.ru
ИНН 5902291011; КПП 590201001; ОГРН 1025900536760

21.04.2017 № 005/354
На № _____ от _____

Заместителю Председателя
Государственного комитета судебных
экспертиз Республики Беларусь
Ю.А. Овсиоку

Глубокоуважаемый Юрий Александрович!

Ректорат ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России просит Вас дать ответ о результатах апробирования методики скрининга лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции (Информационное письмо, рекомендованное к изданию Ученым Советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России, г. Москва, 2015 г.), разработанной доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА Дворской О.Н. с соавторами.

С уважением,

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России



Турышев А.Ю.

Исп. Дворская О.Н.
8(342)282-58-64



**ДЗЯРЖАЎНЫ КАМІТЭТ
СУДОВЫХ ЭКСПЕРТЫЗ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ**

вул. Кальварыйская, 43, 220073, г. Мінск-73
тэл./факс 8 (017) 3086203, 2562013

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

ул. Кальварийская, 43, 220073, г. Минск-73
тел./факс 8 (017) 3086203, 2562013

25.05.2017 № 5.5-9/40

На № _____ ад _____

Ректору федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения
высшего образования «Пермская
государственная фармацевтическая
академия» Министерства
здравоохранения
Российской Федерации
Турышеву А.Ю.

Уважаемый Алексей Юрьевич!

Ваше письмо от 21.04.2017 №009/334 рассмотрено в центральном аппарате Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь (далее – Государственный комитет).

По существу обозначенного вопроса рады сообщить Вам, что методика скрининга лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции (Информационное письмо, рекомендованное к изданию Ученым Советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России, г. Москва, 2015 г), разработанная доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА Дворской О.Н. с соавторами (далее – методика), прошла успешное апробирование в центральном аппарате Государственного комитета, а также в управлениях Государственного комитета по Брестской и Могилевской областям. Отмечена актуальность методики и ее применение позволяет надежно идентифицировать широкий круг лекарственных, наркотических и психотропных веществ, а также их метаболитов, в том числе синтетических каннабимиметиков, имеющих важное значение в медицинской экспертной практике.

Кроме того, приказом Председателя Государственного комитета от 06.05.2017 № 70 «О включении методических материалов в реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» методика включена в указанный реестр.

Государственный комитет готов к дальнейшему совместному сотрудничеству в научно-методическом и практическом плане.

С уважением,

Заместитель Председателя
Государственного комитета



УТВЕРЖДАЮ

И. о. главного врача

УЗ ЖКНД г. Минска

Алишев А.С.

« 16 » ноября 2016 г.

Акт

о практическом использовании результатов исследования

Химико-токсикологический анализ

(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования)

Комиссия в составе: заместителя главного врача по амбулаторной работе Солодухо В.В., заведующего централизованной химико-токсикологической лабораторией Чубукова А.М., врача лабораторной диагностики Юхнель О.М.

настоящим подтверждает, что в централизованной химико-токсикологической лаборатории учреждения здравоохранения «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

(название структурного подразделения организации)

(осуществлено внедрение в технологический процесс, учебный процесс и др.) методика скрининга крови на лекарственные и наркотические вещества с использованием методов твердофазной экстракции и ГХ-МС

(указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ России, к.ф.н. Дворской О.Н., заведующим судебно-химическим отделением ГКУЗОТ ПКБСМЭ, к.х.н. Катаевым С.С., врачом судебно-химического отделения ГКУЗОТ ПКБСМЭ Крохиным И.П.

(фамилия, имя, отчество автора, авторов исследования)

при выполнении научно-исследовательской работы

(название программы, проекта, темы НИР)

для оптимизации процесса проведения подготовки проб при исследовании крови методом газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием с целью обнаружения наркотических средств и психотропных веществ в крови

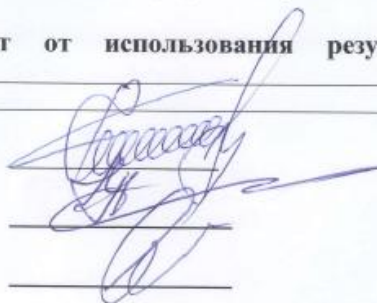
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего при химико-токсикологическом исследовании малых объемов биологического образца (крови) достоверно идентифицируется широкий круг лекарственных и наркотических средств

(приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил _____

Члены комиссии:



Солодухо В.В.

Чубуков А.М.

Юхнель О.М.

08.11.2016 г.

УТВЕРЖДАЮ
И. о. главного врача
УЗ ГКНД г. Минска
Алишевич А.С.

« 16 » ноября 2016 г.

Акт

о практическом использовании результатов исследования

Химико-токсикологический анализ

(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования)

Комиссия в составе: заместителя главного врача по амбулаторной работе Солодухо В.В., заведующего централизованной химико-токсикологической лабораторией Чубукова А.М., врача лабораторной диагностики Юхнель О.М.

настоящим подтверждает, что в централизованной химико-токсикологической лаборатории учреждения здравоохранения «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

(название структурного подразделения организации)

(осуществлено внедрение в технологический процесс, учебный процесс и др.) методика подготовки проб мочи для скрининга с использованием ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции на смешанных фазах твердофазной экстракции и ГХ-МС

(указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМА МЗ России, к.ф.н. Дворской О.Н., заведующим судебно-химическим отделением ГКУЗОТ ПКБСМЭ, к.х.н. Катаевым С.С.

(фамилия, имя, отчество автора, авторов исследования)

при выполнении научно-исследовательской работы

(название программы, проекта, темы НИР)

для оптимизации процесса проведения подготовки проб при исследовании мочи методом газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием с целью обнаружения «дизайнерских» наркотиков

(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего при химико-токсикологическом исследовании мочи достоверно идентифицируются нативные наркотические средства, относящиеся к группе «дизайнерских» наркотиков, и продукты их метаболизма

(приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил _____

Члены комиссии:

Солодухо В.В.

Чубуков А.М.

Юхнель О.М.

09.11.2016 г.

«Утверждаю»

Заместитель директора
Института судебных экспертиз по г.Астана
РГКП «Центр судебных экспертиз» МЮ РК
Жакенова Г.
2018 г.



АКТ

внедрения в практику

результатов научных исследований в рамках диссертационной работы
доцента кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ
Дворской О.Н.

Комиссия в составе:

председатель _главный судебный эксперт по судебному химико-токсикологическому виду исследования Жуматаева Г.С. _____,

члены комиссии Судебно-медицинские эксперты Крыкбаев Ж.С., Шинтина А.К.

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы
Дворской Оксаны Николаевны, изложенные в Информационных письмах:

1. «Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции» / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, И.П. Крохин // Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.). Москва, 2016. - 16с.
2. «Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев // Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.). Москва, 2017. - 34с.

использованы в работе ХТО ИСЭ по г.Астана РГКП ЦСЭ МЮ РК

при пробоподготовке и идентификации токсикологически значимых веществ и их метаболитов в биологических жидкостях: крови и моче с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

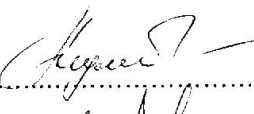
Комиссия заключает:

1. использование представленной скрининговой методики позволяет достоверно обнаруживать широкий спектр лекарственных веществ, наркотических средств и их

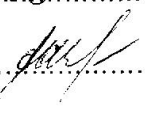
метаболитов и определять некоторые из них количественно (нестероидные противовоспалительные средств;

2. разработанные методики позволяют достоверно определять популярные на настоящий момент во всем мире синтетические каннабимиметики и их маркеры при анализе биожидкостей;

3. предложенные методики воспроизводимы и актуальны, позволяют повысить качество подготовки проб, сократить время исследования, трудозатраты и расход реактивов и растворителей.

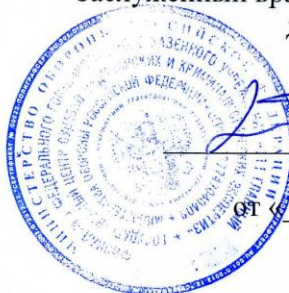
Председатель комиссии..........Жуматаева Г.С.

Члены комиссии:..........Крыкбаев Ж.С.

..........Шинтина А.К..

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник филиала № 1
ФГКУ «111 Главный государственный центр
судебно-медицинских и криминалистических экспертиз»
Министерства обороны Российской Федерации
Заслуженный врач Российской Федерации
доктор медицинских наук



А.Болдарян

от «12» января 2018 г.

Акт внедрения

результатов научной деятельности в экспертную практику

Настоящий документ подтверждает, что разработанная методика исследования крови и мочи с применением методов твердофазной экстракции и ГХ-МС, подготовленная доцентом ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава Дворской О.Н. с соавторами, внедрена в работу Филиала № 1 ФГКУ «111 ГИИЦСМФ» МО РФ.

Применение изложенной методики твердофазной экстракции с использованием сорбентов смешанного типа (сочетание гидрофобной фазы С8 с катионитом) и метода ГХ-МС позволяет определять маркеры синтетических каннабимиметиков непосредственно при скрининге крови и мочи на наркотические и лекарственные вещества, что весьма актуально с точки зрения экономии времени, растворителей и трудозатрат.

Методика представлена в виде Информационного письма РЦСМЭ «Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев // Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.). Москва, 2017. - 34с.

Врач судебно-медицинский эксперт, к.ф.н.

Гуляева Т.Н.

Врач судебно-медицинский эксперт

Соколова О.И.

Врач судебно-медицинский эксперт

Лютюк С.Н.

«УТВЕРЖДАЮ»

Начальник филиала № 1
ФГКУ «111 Главный государственный центр
судебно-медицинских и криминалистических экспертиз»
Министерства обороны Российской Федерации
Заслуженный врач Российской Федерации
доктор медицинских наук



А.Болдарян

от «26» января 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научной деятельности в экспертную практику

Настоящий документ подтверждает, что методика исследования крови с применением методов твердофазной экстракции на патронах «SampliQ Evidex» и ГХ-МС, подготовленная доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ Дворской О.Н. с соавторами, опробована и внедрена в работу Филиала № 1 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО РФ.

Опыт применения предложенной методики показал, что данная схема исследования позволяет надежно идентифицировать широкий круг наркотических средств и токсикологически значимых лекарственных веществ, а также их метаболитов в крови, и позволяет оценивать количественно некоторые из них.

Методика представлена в виде Информационного письма РЦСМЭ «Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции» / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, И.П. Крохин // Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.), Москва, 2016. - 16с.

Врач судебно-медицинский эксперт, к.ф.н

Гуляева Т.Н.

Врач судебно-медицинский эксперт

Соколова О.И.

Врач судебно-медицинский эксперт

Лютюк С.Н.



Утверждаю
Начальник ГБУЗ
"Самарское областное бюро
судебно-медицинской экспертизы",
д.м.н., Ардашкин А.П.

«12» ноября 2013 г.

АКТ

внедрения в практику ГБУЗ "Самарское областное бюро судебно-медицинской экспертизы" результатов научной деятельности доцента кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Дворской О.Н на тему
«Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методами ТФЭ и ГХ-МС»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя - заведующей СХО Куриленко М.И. и членов - врачей судебно-медицинских экспертов Нагорной Л.Н. и Ефремовой О.А. удостоверяем, что разработанный доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА, к.ф.н. Дворской О.Н. и сотрудниками СХО ПКБСМЭ: зав. СХО, к.х.н. Катаевым С.С., Зелениной Н.Б. метод идентификации метаболитов синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в моче с применением твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием внедрен в практику судебно химического отделения Самарского бюро СМЭ с 9. 09.2013 г.

1. Применение данной методики позволяет достоверно идентифицировать метаболиты синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в моче потребителей курительных смесей;

2. Комиссия отмечает актуальность представленных разработок, целесообразность и своевременность их использования в экспертной деятельности СХО Самарского бюро судебно-медицинской экспертизы.

Председатель:
Заведующий СХО

Куриленко М.И.

Члены комиссии:

Врач судебно-медицинский эксперт

Нагорная Л.Н.

Врач судебно-медицинский эксперт

Ефремова О.А.

Подписи Куриленко М.И., Нагорной Л.Н., Ефремовой О.А. удостоверяю.
Заместитель начальника Бюро по кадрам С.М. Сунгуров



«11» ноября 2013 г.



Утверждаю
Начальник ГБУЗ
"Самарское областное бюро
судебно-медицинской экспертизы",
д.м.н., Ардашкин А.П.
«12» ноября 2013 г.

АКТ

внедрения в практику ГБУЗ "Самарское областное бюро судебно-медицинской экспертизы" результатов научной деятельности доцента кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Дворской О.Н на тему «Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче с использованием ТФЭ, ЖЖЭ и ГХ-МС»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя - заведующей СХО Куриленко М.И. и членов - врачей судебно-медицинских экспертов Нагорной Л.Н. и Ефремовой О.А. удостоверяем, что разработанный доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА, к.ф.н. Дворской О.Н. и сотрудниками СХО ПКБСМЭ: зав. СХО, к.х.н. Катаевым С.С., Зелениной Н.Б. метод идентификации маркеров (основных метаболитов) синтетических каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче потребителей курительных смесей с применением твердофазной, жидкость-жидкостной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием внедрен в практику судебно - химического отделения Самарского бюро СМЭ с 11.09.2013 г.

1. Авторами предложены методы выявления основных метаболитов РВ-22 и РВ-22F в моче с применением рутинных методов, включающих ЖЖЭ и ГХ-МС, а также метод ТФЭ, показывающий более высокую селективность выделения исследованных веществ по фракциям и высокую эффективность их экстракции.

2. Использование данных методов позволяет достоверно идентифицировать основные метаболиты (маркеры) синтетических каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче.

3. Комиссия отмечает актуальность представленных разработок, целесообразность и своевременность их использования в экспертной деятельности СХО Самарского бюро судебно-медицинской экспертизы.

Председатель:
Заведующий СХО
Члены комиссии:

Врач судебно-медицинский эксперт
Врач судебно-медицинский эксперт

Куриленко М.И.

Нагорная Л.Н.

Ефремова О.А.

Подписи Куриленко М.И., Нагорной Л.Н., Ефремовой О.А. удостоверяю.
Заместитель начальника Бюро по кадрам С.М. Сунгуров



«11» ноября 2013 г.

«Утверждаю»

Главный врач

ГБУЗ ЯО "Ярославская областная
клиническая наркологическая больница",
главный нарколог Ярославской области

Волков А.В.



2013 г.

АКТ

внедрения в практику ГБУЗ ЯО "Ярославская областная клиническая наркологическая больница" результатов научной деятельности доцента кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Дворской О.Н.

на тему «Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методами ТФЭ и ГХ-МС»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя – зав. химико-токсикологической лабораторией - Ершов М.Б. и членов - врачи клинической лабораторной диагностики Шитов Л.Н. и Джурко Ю.А. удостоверяем, что разработанный доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА, к.ф.н. Дворской О.Н. и сотрудниками СХО ПКБСМЭ: зав. СХО, к.х.н. Катаевым С.С., Зелениной Н.Б. метод идентификации метаболитов синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в моче с применением твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием внедрен в практику химико-токсикологической лаборатории Ярославской областной клинической наркологической больницы с 12. 09.2013 г.

1. Комиссия отмечает актуальность представленных разработок, целесообразность и своевременность их использования в экспертной деятельности химико-токсикологической лаборатории Ярославской областной клинической наркологической больницы .

2. Применение данной методики позволяет достоверно идентифицировать метаболиты синтетического каннабимиметика АВ-PINACA в моче потребителей курительных смесей.

Председатель:
Заведующий ХТЛ

Ершов М.Б.

Члены комиссии:
Врач КЛД

Шитов Л.Н.

Врач КЛД

Джурко Ю.А.



Ершов М.Б., Шитов Л.Н., Джурко Ю.А.
Начальник ОК
А.А. Тарасова

«Утверждаю»

Главный врач

ГБУЗ ЯО "Ярославская областная
клиническая наркологическая больница",
главный нарколог Ярославской области

Волков А.В.



24 октября 2013 г.

АКТ

внедрения в практику ГБУЗ ЯО "Ярославская областная клиническая наркологическая больница" результатов научной деятельности доцента кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России Дворской О.Н.

на тему ««Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче с использованием ТФЭ, ЖЖЭ и ГХ-МС»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе председателя – зав. химико-токсикологической лабораторией Ершов М.Б. и членов - врачи клинической лабораторной диагностики Шитов Л.Н. и Ионова Е.Б. удостоверяем, что разработанный доцентом кафедры токсикологической химии ПГФА, к.ф.н. Дворской О.Н. и сотрудниками СХО ПКБСМЭ: зав. СХО, к.х.н. Катаевым С.С., Зелениной Н.Б. метод идентификации маркеров (основных метаболитов) синтетических каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче потребителей курительных смесей с применением твердофазной, жидкость-жидкостной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрией внедрен в практику химико-токсикологической лаборатории Ярославской областной клинической наркологической больницы с 10.09.2013 г.

1. Использование данных методов позволяет достоверно идентифицировать основные метаболиты (маркеры) синтетических каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче.

2. Комиссия отмечает актуальность представленных разработок, целесообразность и своевременность их использования в экспертной деятельности химико-токсикологической лаборатории Ярославской областной клинической наркологической больницы.

Председатель:
Заведующий ХТЛ

Ершов М.Б.

Члены комиссии:
Врач КЛД

Шитов Л.Н.

Врач КЛД

Ионова Е.Б.



Дворской О.Н.
Ершова М.Б.
Шитова Л.Н.
Ионова Е.Б.
Начальник ОК
А.А. Тарасова



**КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГА**

**Санкт-Петербургское государственное
бюджетное учреждение здравоохранения
«БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЫ»**

(СПб ГБУЗ «БСМЭ»)

Екатерининский пр., 10 литер А

Санкт-Петербург, 195067

тел. (812) 544-17-17; факс (812) 545-03-40

ОКПО 01932390 ОККОГУ 23340

E-mail: sudmed@zdrav.spb.ru

www.spbbsme.ru

16.05.18 № _____
на № _____ от _____

АКТ

**внедрения результатов диссертационного исследования доцента кафедры
токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ**

Дворской Оксаны Николаевны

в экспертную практику

Комиссия в составе:

Председатель: зам. начальника по экспертной работе, д.м.н. В.Д. Исаков

Члены комиссии: зав. судебно-химическим отделением, к. фарм. н. Т.В. Горбачева
судебный эксперт (химик) С.В. Кораблева

составили настоящий акт о том, что разработанные скрининговые методики исследования крови и мочи с применением методов ТФЭ и ГХ-МС, подготовленная доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава Дворской О.Н. с соавторами прошли апробацию в судебно-химическом отделении СПб ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» на основании предоставленного Информационного письма. «Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических объектах / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев // Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 г.). Москва, 2017. - 34с.

Комиссия отмечает, что разработанные методики позволяют достоверно определять популярные на настоящий момент синтетические каннабимиметики и их метаболиты при анализе биожидкостей, воспроизводимы и актуальны.

Председатель комиссии

В.Д. Исаков

Члены комиссии:

Т.В. Горбачева

С.В. Кораблева

Начальник СПб ГБУЗ «БСМЭ», д.м.н.

И.Е. Лобан

АКГ

Заключение результатов диссертационного исследования по кафедре
токсикологической химии СПб ГБУЗ ВО ЦГФА МЗ РФ
Дворской Оксаны Николаовны
в экспертную практику

Комитет в составе:

Председатель: д.м.н., кандидат по экспертной работе, д.м.н. В.Д. Исаков

Члены комиссии: д.м.н., судбно-химический эксперт, к. фарм. н. Т.В. Горбачева;
судбный эксперт (химия) С.В. Кораблева

Заседание комиссии вел о том, что разработанные скрининговые методики исследования пробы и мочи с применением методов ТСХ и ГХ-МС, разработанные доктором кафедры токсикологической химии СПб ГБУЗ ВО ЦГФА Минздрава Дворской О.Н. с коллегами прошли апробацию в судебно-химическом отделении СПб ГБУЗ «Центр судебно-медицинской экспертизы» на основании протокола заседания Информационного совета. «Идентификация маркеров некоторых синтетических каннабиноидов в биологических образцах» (О.Н. Дворская, С.С. Киселев, А.В. Мельников) // Информационное письмо рекомендацию в издание Ученых Записок СПб ГБУЗ «БСМЭ Минздрава России» (приложение № 1 от 17 марта 2017 года).

Ученые Записки 2017 - №4.



**КОМИТЕТ ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГА**

**Санкт-Петербургское государственное
бюджетное учреждение здравоохранения
«БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЫ»**

(СПб ГБУЗ «БСМЭ»)

Екатерининский пр., 10 литер А
Санкт-Петербург, 195067

тел. (812) 544-17-17; факс (812) 545-03-40

ОКПО 01932390 ОКОГУ 23340

E-mail: sudmed@zdrav.spb.ru

www.spbbsme.ru

16.05.18 № _____
на № _____ от _____

АКТ

**внедрения результатов диссертационного исследования доцента кафедры
токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ**

**Дворской Оксаны Николаевны
в экспертную практику**

Комиссия в составе:

Председатель: зам. начальника по экспертной работе, д.м.н. В.Д. Исаков

Члены комиссии: зав. судебно-химическим отделением, к. фарм. н. Т.В. Горбачева
судебный эксперт (химик) С.В. Кораблева

Комиссия рассмотрела результаты практического использования предлагаемой скрининговой методики исследования крови с применением методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (авторы: доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ, к.ф.н., Дворская О.Н., заведующий судебно-химическим отделением ГКУЗОТ ПКБСМЭ, к.х.н., Катаев С.С., врач судебно-медицинский эксперт СХО ГКУЗОТ ПКБСМЭ Крохин И.П.).

Закключение:

1. Применение данной методики позволяет достоверно обнаруживать широкий спектр лекарственных веществ, наркотических средств и их метаболитов и определять некоторые из них количественно (нестероидные противовоспалительные средства).
2. Методика представлена в виде Информационного письма «Скрининг лекарственных и наркотических веществ, их метаболитов в крови с использованием твердофазной экстракции» / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, И.П. Крохин // Информационное

2

письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря 2015 г.). Москва, 2016. - 16с.

3. Комиссия отмечает актуальность подобных разработок и целесообразность их использования в практике судебно-химических отделений.

Председатель комиссии

Члены комиссии:

Начальник СПб ГБУЗ «БСМЭ», д.м.н.

В.Д. Исаков

Т.В. Горбачева

С.В. Кораблева

И.Е. Лобан

АКТ

экспертиза результатов лабораторного исследования доната кафедры
токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГФА МЗ РФ
Дворцова Оксаны Николаевны
в экспертную практику

Краткое содержание:

Комиссия, так, как, приняла по экспертной работе, д.м.н. В.Д. Исаков

Члены комиссии: так, судебно-химическим отделением, к. фарм. н. Т.В. Горбачева
судебный эксперт (химик) С.В. Кораблева

Комиссия рассмотрела результаты практического применения предложенной
методики методом исследования крови с применением метода твердофазной
хроматографии и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим
детектированием кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГФА МЗ РФ, к.ф.н.,
Дворцова О.Н., так, судебно-химическим отделением ГБУЗ РЦСМЭ, к.х.н.,
Корова С.С., так, судебно-химическим отделением СХО ГБУЗ РЦСМЭ Кривош И.П.).

Заключение:

1. Применению данной методики необходимо рассмотреть возможность широкого
использования методики, внедрения методики в их практику и определить
необходимость и возможность (необходимость практического применения).

2. Методика, предложенная в виде Информационного письма «Структура
методики исследования в судебно-химическом отделении, их методика в крови с использованием
метода твердофазной хроматографии / О.Н. Дворцова, С.С. Корова, И.П. Кривош // Информационное

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ»,
заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор
Новоселов В.П.

«18» мая 2018 г.



АКТ
о практическом использовании
результатов научных исследований

Комиссия в составе:

Зам.начальника ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ» по экспертной работе, заслуженный работник здравоохранения РФ, к.м.н., доцент, Шалдяева Е.Г., председатель комиссии

Заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ», к.фарм.н., Кокорина Н.О., член комиссии

Заведующий танатологическим отделением ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ», Тихонов В.В., член комиссии

настоящим подтверждает, что в судебно-химическом отделении ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ»

осуществлено внедрение в экспертную практику методики скрининга крови на наркотические средства и лекарственные вещества с использованием методов твердофазной экстракции на патронах со смешанной фазой и ГХ-МС,

полученных доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ, к.ф.н., Дворской О.Н. с соавторами

представленных в виде Информационного письма, утвержденного ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России, г. Москва

при выполнении научно-исследовательской работы в рамках докторской диссертации

для оптимизации процесса проведения подготовки проб при исследовании крови методом газовой-хроматографии с масс-спектральным детектированием с целью обнаружения лекарственных и наркотических веществ

на основании чего при судебно-химическом исследовании малых объемов крови методами ТФЭ и ГХ-МС достоверно идентифицируется широкий круг лекарственных и наркотических веществ.

Председатель комиссии.....Шалдяева Е.Г.

Член комиссии.....Кокорина Н.О.

Член комиссии.....Тихонов В.В.

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ»,
заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор
Новоселов В.П.



«18» мая 2018 г.

АКТ
внедрения в практику
результатов научных исследований

Комиссия в составе:

Зам.начальника ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ» по экспертной работе, заслуженный работник здравоохранения РФ, к.м.н., доцент, Шалдяева Е.Г., председатель комиссии

Заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ», к.фарм.н., Кокорина Н.О., член комиссии

Заведующий танатологическим отделением ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ», Тихонов В.В., член комиссии

настоящим подтверждает, что в судебно-химическом отделении ГБУЗ НСО «НОКБСМЭ»

осуществлено внедрение в экспертную практику методики подготовки проб мочи для скрининга с использованием ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции на смешанной фазе и ГХ-МС,

представленных в виде Информационного письма, утвержденного ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России, г. Москва

полученных доцентом кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ, к.ф.н., Дворской О.Н. с соавторами.

при выполнении научно-исследовательской работы в рамках докторской диссертации

для оптимизации процесса проведения подготовки проб при исследовании мочи методом газовой-хроматографии с масс-спектральным детектированием с целью обнаружения «дизайнерских наркотиков» и их маркеров

на основании чего при судебно-химическом исследовании мочи достоверно идентифицируются продукты метаболизма синтетических каннабимиметиков.

Председатель комиссии.....Шалдяева Е.Г.

Член комиссии.....Кокорина Н.О.

Член комиссии.....Тихонов В.В.

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА

Минздрава России

А.Ю. Турышев

«15» декабря 2017 года

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов научных достижений
в учебный процесс

Материалы диссертационной работы Дворской Оксаны Николаевны, доцента кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, посвященной разработке методологии скрининга биообъектов на лекарственные и наркотические вещества и их метаболиты с применением методов ТФЭ и ГХ/МС, внедрены в учебный процесс при обучении специалистов, работающих в сфере судебно-химического и химико-токсикологического анализа по дополнительной профессиональной программе повышения квалификации «Химико-токсикологический и судебно-химический анализ биологических объектов и вещественных доказательств».

Представленные в диссертационном исследовании результаты включены в лекционный курс и практические занятия слушателей при прохождении ими цикла повышения квалификации.

Декан ФДПО

ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, к.ф.н., доцент

Н.Ю. Порсева

Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава

Турышев А.Ю.

2018 г.

Материалы диссертационной работы Дворской Оксаны Николаевны «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия внедрены в учебный процесс Пермской государственной фармацевтической академии при чтении лекций и проведении практических занятий;

- на дисциплине по выбору «Экспертиза алкогольного и наркотического опьянения» для студентов очного факультета;
- на цикле повышения квалификации для преподавателей фармацевтических ВУЗов и училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники под общим названием «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» на базе кафедры токсикологической химии и Регионального испытательного центра «Фарматест».

Руководитель РИЦ «Фарматест»
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,
заведующий кафедрой токсикологической
химии, д. фарм. н., профессор

Т.Л. Малкова

11.12.2018 г.



МИНЗДРАВ РОССИИ
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Омский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России)

ул. Ленина, д. 12, г. Омск, 644099
т. (3812) 957-001, т/ф (3812) 957-002
E-mail: rector@omsk-osma.ru

ОКПО 01963321 ОГРН 1035504001500
ИНН/КПП 5503018420/550301001

17.04.2018 № 1421
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ФГБОУ ВО ОмГМУ

Минздрава России



М.А. Ливзан

20/8 г.

АКТ

о внедрении результатов
диссертационной работы на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук
доцента кафедры токсикологической химии
ГБОУ ВО ПГФА Минздрава России
Дворской Оксаны Николаевны

Комиссия в составе:

Председатель: зав. кафедрой фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, к.фарм.н., доцент Лукша Е. А.

Члены комиссии: доцент кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, к.фарм.н., Савченко И. А., доцент кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, к.х.н., Корнеева И. Н.

составили настоящий акт о том, что материалы диссертационной работы **Дворской Оксаны Николаевны** «Научно-методологические подходы к скринингу лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции», представленной на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, использованы в учебном процессе при реализации программ специалитета по специальности 33.05.01 «Фармация», а также при реализации программ дополнительного профессионального образования по направлению подготовки «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» на кафедре фармацевтической, аналитической и

токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (644099, Сибирский Федеральный округ, Омская область, г. Омск, ул. Ленина, 12).

Материалы диссертационного исследования используются в лекционном материале и на практических занятиях на тему «Группа веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией. Наркотические и психотропные вещества», «Современные подходы к методам изолирования токсических веществ из различных объектов».

Председатель:

 Е. А. Лукша

Члены комиссии:

 И. А. Савченко
 И. Н. Корнеева



ПРИЛОЖЕНИЕ 4
Информационные письма
РЦСМЭ, г. Москва

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(614990, г. Пермь, ул. Екатерининская, 101)

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России,
доктор медицинских наук
 А.В. Ковалев
12 декабря 2013 г

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМЕТИКА
PB-22 В МОЧЕ

Информационное письмо

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Объект анализа	5
Материалы и методы	5
Методы исследования	6
Реактивы	7
Посуда	8
Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором	8
ИССЛЕДОВАНИЕ	9
Подготовка проб с использованием кислотного гидролиза и ЖЖЭ	10
Подготовка проб с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ	10
Получение дериватов	11
Газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов РВ-22	12
Выводы	19
ЛИТЕРАТУРА	20

УДК 340.67:543.51/.544.43:615.074.
ББК 58: 28.072: 24.46
и 252

Авторы:

О.Н. ДВОРСКАЯ – доцент кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО
ПГФА Минздрава России, кандидат фармацевтических наук

С.С. КАТАЕВ – заведующий судебно-химическим отделением ГКУЗОТ
«Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат
химических наук

А.Б. МЕЛЕНТЬЕВ – заведующий судебно-химическим отделением ГБУЗ
«Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат
химических наук

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМЕТИКА РВ-22 В МОЧЕ

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских
экспертов, врачей клинической лабораторной диагностики, студентов
медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих
в области анализа наркотических средств, токсических и сильнодействующих
веществ.

Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ
«РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г)

Рецензенты:

В.Л. Гейн – профессор кафедры общей и органической химии Пермской
государственной фармацевтической академии, д.х.н.

Т.В. Горбачева – заведующий судебно-химическим отделением Санкт-
Петербургского бюро судебно-медицинской экспертизы, к.ф.н.

© О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев, 2014
© ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2)

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


А.В. Ковалев
12 декабря 2013 г.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИТИКА
АВ-PINACA В МОЧЕ

Информационное письмо

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Объект анализа	5
Материалы и методы	5
Методы исследования	6
Реактивы	6
Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором	7
ИССЛЕДОВАНИЕ	8
Подготовка проб с использованием ферментативного гидролиза и ТФЭ	8
Получение дериватов	9
Газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов AB-PINACA	10
Выводы	16
ЛИТЕРАТУРА	17

УДК 340.67:543.51/.544.43:615.074.
ББК 58: 28.072: 24.46
и 252

Авторы:

О.Н. ДВОРСКАЯ – доцент кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО
ПГФА Минздрава России, кандидат фармацевтических наук

С.С. КАТАЕВ – заведующий судебно-химическим отделением, ГКУЗОТ
«Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат
химических наук

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИТОВ КАННАБИМИМЕТИКА
AB-PINACA В МОЧЕ**

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских
экспертов, врачей клинической лабораторной диагностики, студентов
медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих
в области анализа наркотических средств, токсических и сильнодействующих
веществ.

Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ
«РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 6 от 12 декабря 2013 г.)

Рецензенты:

В.Л. Гейн – профессор кафедры общей и органической химии Пермской
государственной фармацевтической академии, д.х.н.

Т.В. Горбачева – заведующий судебно-химическим отделением Санкт-
Петербургского бюро судебно-медицинской экспертизы, к.ф.н.

© О.Н. Дворская, С.С. Катаев, 2014
© ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России

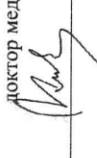
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13)

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(614990, г. Пермь, ул. Екатеринбургская, 101)

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ»

Минздрава России,
Главный внештатный специалист
по судебно-медицинской экспертизе

Минздрава России
доктор медицинских наук

 А.В. Ковалев
«15 » декабря 2015 г.

**«СКРИНИНГ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ,
ИХ МЕТАБОЛИТОВ В КРОВИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ»**

(Информационное письмо)

Москва
2015

УДК 340.67:543.51/.544.43:615.074.
ББК 58: 28.072: 24.46
и 252

Авторы:

О.Н. ДВОРСКАЯ – доцент кафедры токсикологической химии ГБОУ ВПО
ПГФА Минздрава России, кандидат фармацевтических наук

С.С. КАТАЕВ – заведующий судебно-химическим отделением. ГКУЗот
«Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат
химических наук

И.П. КРОХИН – судебно-медицинский эксперт судебно-химического
отделения ГКУЗот «Пермское краевое бюро судебно-медицинской
экспертизы»

СКРИНИНГ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ИХ МЕТАБОЛИТОВ В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских
экспертов судебно-химических отделений, врачей клинической лабораторной
диагностики химико-токсикологических лабораторий, студентов медицинских
и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих в области
анализа наркотических средств, токсических и сильнодействующих веществ.

Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ
РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 6 от 15 декабря. 2015 г)

Рецензенты:

А.В. Михайловский – профессор кафедры общей и органической химии
Пермской государственной фармацевтической академии, д.ф.н.

Т.В. Горбачева – заведующий судебно-химическим отделением Санкт-
Петербургского бюро судебно-медицинской экспертизы, к.ф.н.

Р.А. Калёкин – главный научный сотрудник отдела специальных лабораторных
исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, д.ф.н.

© О.Н. Дворская, С.С. Катаев, И.П. Крохин, 2015
© ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России

2

ОГЛАВЛЕНИЕ

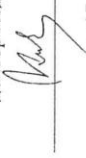
Введение	4
Объект анализа	5
Оборудование и материалы.....	5
Методы исследования	6
Реактивы	6
Посуда	7
Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором.....	7
ИССЛЕДОВАНИЕ	8
Подготовка проб.....	8
Получение дериватов	9
Результаты исследования	10
ЛИТЕРАТУРА	15

3

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д.12/13)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2)

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России,
Главный внештатный специалист
по судебно-медицинской экспертизе
Минздрава России
доктор медицинских наук

 А.В. Ковалев
« 17 » марта 2017 г.

«ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАРКЕРОВ НЕКОТОРЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ
КАННАБИНОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ»

Информационное письмо

2017
Москва

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Объект анализа	5
Оборудование и материалы	5
Методы исследования	6
Реактивы	6
Посуда	7
Программное обеспечение исследований	7
ИССЛЕДОВАНИЕ	8
Предварительная подготовка образцов	8
Получение дериватов	9
Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором (сканирование по полному ионному току)	10
Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором для идентификации метильных производных маркеров СК (селективный ионный мониторинг)	10
Газохроматографические и масс-спектрометрические характеристики некоторых производных основных метаболитов СК	16
Выводы	32
ЛИТЕРАТУРА	33

УДК 340.67:543.51/544.43:615.074.
ББК 58: 28.072: 24.46
И 252

Авторы:

О.Н. ДВОРСКАЯ – доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, кандидат фармацевтических наук;

С.С. КАТАЕВ – заведующий судебно-химическим отделением ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат химических наук;

А.Б. МЕЛЕНТЬЕВ – заведующий судебно-химическим отделением ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат химических наук.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МАРКЕРОВ НЕКОТОРЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИНОИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских экспертов, врачей клинической лабораторной диагностики, студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих в области анализа наркотических средств, токсических и сильнодействующих веществ.

Информационное письмо рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 1 от 17 марта 2017 года).

Рецензенты:

А.Г. Михайловский – профессор кафедры общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии, д.ф.н.

Т.В. Горбачева – заведующий судебно-химическим отделением Санкт-Петербургского бюро судебно-медицинской экспертизы, к.ф.н.

Р.А. Калёкин – главный научный сотрудник отдела специальных лабораторных исследований ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, д. ф. н.

ISBN 978-5-9631-0634-1

© О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б.Мелентьев, 2017

© ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России, ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

Монография

Дизайнерские наркотики.

Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах

Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н.

М.: Издательство «Перо», 2016. – 326 с.

УДК 615.212.7
ББК 52.81
М 47

Мелентьев Алексей Борисович,
Катаев Сергей Сергеевич,
Дворская Оксана Николаевна
М 47 Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы
к анализу в биологических средах. – М.: Издатель-
ство «Перо», 2016. – 326 с.

ISBN 978-5-906900-37-1

УДК 615.212.7
ББК 52.81

ISBN 978-5-906900-37-1
© Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н., 2016

Мелентьев А.Б., Катаев С.С., Дворская О.Н.

Оглавление

Список сокращений	5
1. Введение.....	7
2. Классификация дизайнерских наркотиков	15
2.1. Наркотические анальгетики	18
2.2. Галлюциногены.....	19
2.3. Стимуляторы	20
2.4. Каннабимиметики	21
3. Некоторые методики анализа, используемые для скрининга мочи на наличие потенциальных токсикантов, в том числе дизайнерских наркотиков	25
3.1. Классическая методика подготовки проб к СТА.....	27
3.2. Методика подготовки проб мочи для скрининга на наличие наркотических и психотропных веществ	28
3.3. Методика подготовки проб мочи для скрининга с использованием ферментативного гидролиза и твердофазной экстракции на смешанных фазах.....	30
3.4. Методика подготовки проб мочи для скрининга ряда маркеров синтетических каннабимиметиков совместно с каннабиноидами.....	32
4. Метаболизм некоторых наркотических анальгетиков и обнаружение фактов их употребления	38
4.1. Производные фентанила.....	38
4.2. Некоторые другие агонисты опиоидных рецепторов	48
5. Биотрансформация некоторых галлюциногенов и методы их обнаружения	78
5.1. Метаболизм психоделиков серии 2С	78
5.2. Диссоциативы, аналоги кетамин	98
6. Новые дизайнерские стимуляторы, метаболизм и методы идентификации.....	110

6.1 Аналоги амфетамина с модифицированным фенильным фрагментом	110
6.2. Синтетические катионы (бета-кето-амфетамины). 129	
6.3 Производные пирролидинофена	140
6.4 Производные пиперазина	162
7. Метаболизм синтетических каннабиноидов	193
7.1. Метаболизм каннабимиметиков группы нафтоилиндолы	193
7.2. Метаболизм каннабимиметиков группы бутаноилиндолы	204
7.3. Метаболизм каннабимиметиков группы нафтолиндола	211
7.4. Метаболизм каннабимиметиков группы эфиров алкилиндол-3-карбоксилатов	215
7.5. Метаболизм каннабимиметиков группы алкилиндол-3-карбоксамидов, производных амида валина	229
7.6. Подходы к пробоподготовке, используемые для ГХ-МС скрининга мочи на наличие СК	245
Приложение	260

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BSTFA – Бис(триметилсилил)трифторацетамид-N,O
ВЭЖХ-МС – высокоэффективная хроматография/масс-спектрометрия
ВЭЖХ-МС-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография / тандемная масс-спектрометрия
ГХ – газовая хроматография
ГХ-МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия
Δ^9 -ТГК – Δ^9 -тетрагидроканнабинол
ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
ИЮПАК – Международный союз теоретической и прикладной химии
ECDD – комитет экспертов по наркотической зависимости
ED ₅₀ – средняя эффективная доза
EMCDDA – Европейский центр мониторинга наркотиков
LD ₅₀ – средняя летальная доза
LogP – коэффициент липофильности
LSD (ЛСД) – диэтиламид d-лизергиновой кислоты
МДА – 3,4-метилendioксиамфетамин
МДМА (MDMA) – 3,4 метилendioксиметамфетамин
MDPV (МДПВ) – метилendioксипировалерон
ПАВ – психоактивные вещества
pK _a - отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты
PVP – а-пирролидиновалерофенон
RIA – радиоиммунный анализ

Мелентьев Алексей Борисович,
Катаев Сергей Сергеевич,
Дворская Оксана Николаевна

**ДИЗАЙНЕРСКИЕ НАРКОТИКИ.
МЕТАБОЛИЗМ И ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ**

Издательство «Перо»

- 109052, Москва, Нижегородская ул., д. 29-33, стр. 15, ком. 536
Тел.: (495) 973-72-28, 665-34-36

Подписано в печать 25.08.2015. Формат 60×90/16.

Бумага офсетная. Усл. печ. л. 20,375. Тираж 500 экз. Заказ 651.

Отпечатано в ООО «Издательство «Перо»