

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 066 - 0618

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

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК:**

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,

Учреждение здравоохранения «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

**АВТОРЫ:**

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

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

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

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

Минск, 2018

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

## **НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

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

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

## **МЕДИЦИНСКИЕ ИЗДЕЛИЯ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И ДР.**

*Лабораторное оборудование, средства измерения и вспомогательные устройства.*

- баня водяная электрическая;
- баня водяная с терморегулированием от +20 °С до +90°С;

- вакуумный насос KNF 022AN/18 или аналогичный;
- весы лабораторные аналитические с погрешностью взвешивания  $\pm 0,0001$ г;
- весы лабораторные с погрешностью взвешивания  $\pm 0,01$ г;
- виалы №24 с резьбой, 30 мл, прозрачного стекла с плоским дном;
- виалы с завинчивающимся колпачком на 2 мл;
- виалы с завинчивающимся колпачком на 1,1 мл с коническим дном;
- воронки конические, диаметром 5 см;
- вортекс;
- газовый хроматограф с детектором ионизации в пламени;
- газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 2 - 20 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 5 - 50 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 20-200 мкл;
- дозатор пипеточный с переменным объемом 100-1000 мкл;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 0-2 мл;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 1-5 мл;
- жидкостный хроматограф с диодно-матричным детектором;
- жидкостный хроматограф с МС/МС детектором;
- дозатор-диспенсер набутылочный объемом 5-50 мл;
- крышки для виал №24 с резьбой и силиконовой септой;
- колба коническая из термостойкого стекла объемом 1000 мл;
- колба мерная 2а-1000-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-100-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-50-2 по ГОСТ 1770-74;
- колба мерная 2а-25-2 по ГОСТ 1770-74;

- морозильник с возможностью создания температуры – 18° С и ниже;
- пипетка градуированная 1-2-5-10 по ГОСТ 29227-91;
- пипетка пастеровская;
- пробирка мерная объемом 10 мл со шлифом и притертой пробкой;
- пробирка полипропиленовая с крышкой объёмом 1,5 мл;
- пробирка 50 мл полипропиленовая коническая с делениями, с винтовой крышкой, с юбкой устойчивости;
- рН-метр лабораторный;
- секундомер по ГОСТ 5072-79;
- стаканы по ГОСТ 23932-90;
- установка для твердофазной экстракции;
- флаконы экстракционные БСС 25 или объемом 30 мл ;
- флаконы экстракционные объемом 12 мл;
- холодильник-морозильник по ГОСТ 16317-95;
- центрифуга лабораторная с бакет-ротором;
- центрифуга лабораторная высокоскоростная;
- цилиндр 1-100-2 по ГОСТ 1770-74;
- цилиндр 1-50-2 по ГОСТ 1770-74;
- цилиндр 1-10-2 по ГОСТ 1770-74;
- чашка выпарительная, фарфоровая №3;
- чашка концентрационная, стеклянная, объемом 10 мл;
- шейкер планетарный;
- шейкер-ротатор;
- шпатель по ГОСТ 9147-80;

### ***Реактивы и материалы***

- аммоний двууглекислый, х.ч;

- аммиак водный, 25%;
- аммоний сернокислый х.ч.;
- ацетонитрил, х.ч.;
- бутанол-1, х.ч.;
- гексан, х.ч.;
- гептан, х.ч.;
- диметилсульфоксид безводный, х.ч.;
- диэтиловый эфир, х.ч.;
- изо-октан, х.ч.;
- калий двухромовокислый, х. ч.;
- калий углекислый, х.ч.;
- калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч.;
- картриджи для ТФЭ на основе комбинированного состава-стирол/дивинилбензол, модифицированные группами C<sub>8</sub>;
- колонки экстракционные Extrelute NT 3;
- кислота серная концентрированная, х. ч.;
- кислота соляная концентрированная, х.ч.;
- кислота трифторуксусная концентрированная, х. ч.;
- кислота уксусная, х.ч.;
- метил иодистый стабилизированный;
- метанол, х.ч.;
- 17-метилтестостерон 97,0-100%;
- N-Метил –бис-трифторацетамид, 98%;
- N-Метил- N-(триметилсилил)-трифторацетамид, 97%;
- метилен хлористый, х.ч.;
- натрия гидроокись, х.ч.;
- натрий двууглекислый, х.ч.;

- натрий серноокислый безводный, х.ч.;
- натрий углекислый, х.ч.;
- натрий уксуснокислый, х.ч.;
- натрий фосфорнокислый двухзамещенный, 2-водный, х.ч.;
- натрия хлорид, х.ч.;
- нафтохинон-4сульфат, х.ч.;
- пентафторпропионовый ангидрид, 99+%;
- 2,2,3,3,3-пентафлюоро-пропанол (PFPOH);
- пиридин, х. ч.;
- пропанол-2, х.ч.;
- спирт этиловый ректифицированный зерновой для медицинских целей, 95 – 96 %;
- N-tert-Бутилдиметилсилил- N-трифторацетамид,98%;
- тест-полоски на основе моноклональных антител;
- тетраметиламмония гидроокись, 25%-ный раствор в метаноле, х. ч.;
- толуол, х. ч.;
- триметилхлорсилан, 98+%
- трифторуксусный ангидрид, 99+%;
- тетраметиламмония гидроксид 25% раствор в метаноле
- уксусный ангидрид безводный;
- углерод четыреххлористый;
- универсальная индикаторная бумажка рН 1-14;
- фермент β-глюкуронидаза 25 KU;
- фермент химотрипсин кристаллический
- фильтры беззольные d = 9 см «синяя лента»;
- хлороформ, х.ч.;
- этиловый эфир уксусной кислоты, х. ч.

## **Стандартные вещества**

- барбитал (5,5 диэтилбарбитуровая кислота) > 99 % CAS 57-44-3
- диазепам > 99 % CAS 439-14-5
- диазепам D-5 > 99 % CAS 65854-76-4
- дифениламин > 99 % CAS 122-39-4
- 17 $\alpha$ -метилтестостерон > 99 % CAS 58-18-4
- этилморфин гидрохлорид > 99 % CAS 76-58-4

## **ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ и СТАНДАРТНЫХ РАСТВОРОВ**

### **Приготовление 2% (20 г/л) раствора аммиака.**

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

### **Приготовление 10% (100 г/л) раствора аммиака.**

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

### **Приготовление 10%(100 г/л) раствора аммония серноокислого.**

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

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

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

### **Приготовление раствора фермента $\beta$ -глюкуронидаза.**

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

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

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

### **Приготовление карбонатного буфера рН 10.**

Взвешивают 8,4 грамма натрия двууглекислого, растворяют в небольшом объеме воды в мерной колбе объемом 500 мл, взвешивают 10,6 грамма натрия углекислого, растворяют в той же колбе,

перемешивают и объем доводят водой до метки. Перемешивают. Проверяют рН готового буферного раствора.

**Приготовление 5% (50 г/л) раствора натрия двууглекислого.**  
Взвешивают 5,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

**Приготовление 8% (80 г/л) раствора натрия двууглекислого.**  
Взвешивают 8,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл.

**Приготовление 10% (100 г/л) раствора натрия двууглекислого.**  
Взвешивают 10,0 г натрия двууглекислого, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, объем доводят водой до 100 мл.

**Приготовление 2М (моль/л) раствора натрия гидроокиси.**  
Взвешивают 8,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

**Приготовление 5М (моль/л) раствора натрия гидроокиси.**  
Взвешивают 20,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

**Приготовление 10М (моль/л) раствора натрия гидроокиси.**  
Взвешивают 40,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

**Приготовление 25% (250 г/л) раствора натрия гидроокиси.**  
Взвешивают 25,0 г натрия гидроокиси, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе объемом 100 мл, доводят водой до 100 мл. Приготовленному раствору дают отстояться и прозрачную жидкость сливают с осадка. Сохраняют в склянках с притертыми пробками.

**Приготовление насыщенного раствора натрия углекислого.**  
Взвешивают 20,0 г натрия углекислого и переносят в коническую колбу объемом 100 мл, прибавляют 50 мл горячей дистиллированной воды. Раствор переносят во флакон с притертой пробкой и оставляют

при комнатной температуре до полного остывания. Избыток карбоната натрия выпадает в осадок.

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

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

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

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

**Приготовление 2 М (моль/л) раствора серной кислоты.**

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

**Приготовление 0,2% (2 г/л) раствора смеси ферментов  $\beta$ -глюкуронидазы и химотрипсина.**

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

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

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

**Приготовление 0,1 н раствора соляной кислоты.**

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

**Приготовление 0,2 н раствора соляной кислоты.**

Мерную колбу объемом 100 мл на 1/3 заполняют дистиллированной водой. Пипеткой градуированной на 2 мл отмеривают 1,7 мл

концентрированной соляной кислоты и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят дистиллированной водой до метки.

**Приготовление 1 н раствора соляной кислоты.**

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

**Приготовление 2 н раствора соляной кислоты.**

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

**Приготовление 3 н раствора соляной кислоты.**

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

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

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

**Приготовление 2 М (моль/л) раствора соляной кислоты.**

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

**Приготовление раствора соляной кислоты в метаноле (9:1).**

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

**Приготовление смесей:**

- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (3:2)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (2:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (3:1)
- гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1)
- изооктан – этиловый эфир уксусной кислоты (7:1)
- метанол - аммиак (98:2)

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

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

#### **Приготовление стандартных растворов:**

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

Мерную колбу объемом 100 мл на 1/3 заполняют 96 % этиловым спиртом. На аналитических весах отвешивают 0,02 г барбитала и переносят в мерную колбу, перемешивают до полного растворения, объем доводят этиловым спиртом до 100 мл.

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

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

- *Приготовление стандартного раствора диазенама в метаноле (2,0 г/л).*

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

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

Мерную колбу объемом 25 мл на 1/3 заполняют метиловым спиртом. Из ампулы, содержащей стандартный раствор 1 мг/мл диазепама D-5 в метаноле дозатором пипеточным с переменным объемом на 1000 мкл отмеривают 250 мкл раствора и переносят в мерную колбу, перемешивают, объем доводят метиловым спиртом до 25 мл.

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

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

- ***Приготовление стандартного раствора 17 $\alpha$ -метилтестостерона в этаноле (0,15 г/л).***

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

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

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

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

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

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

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

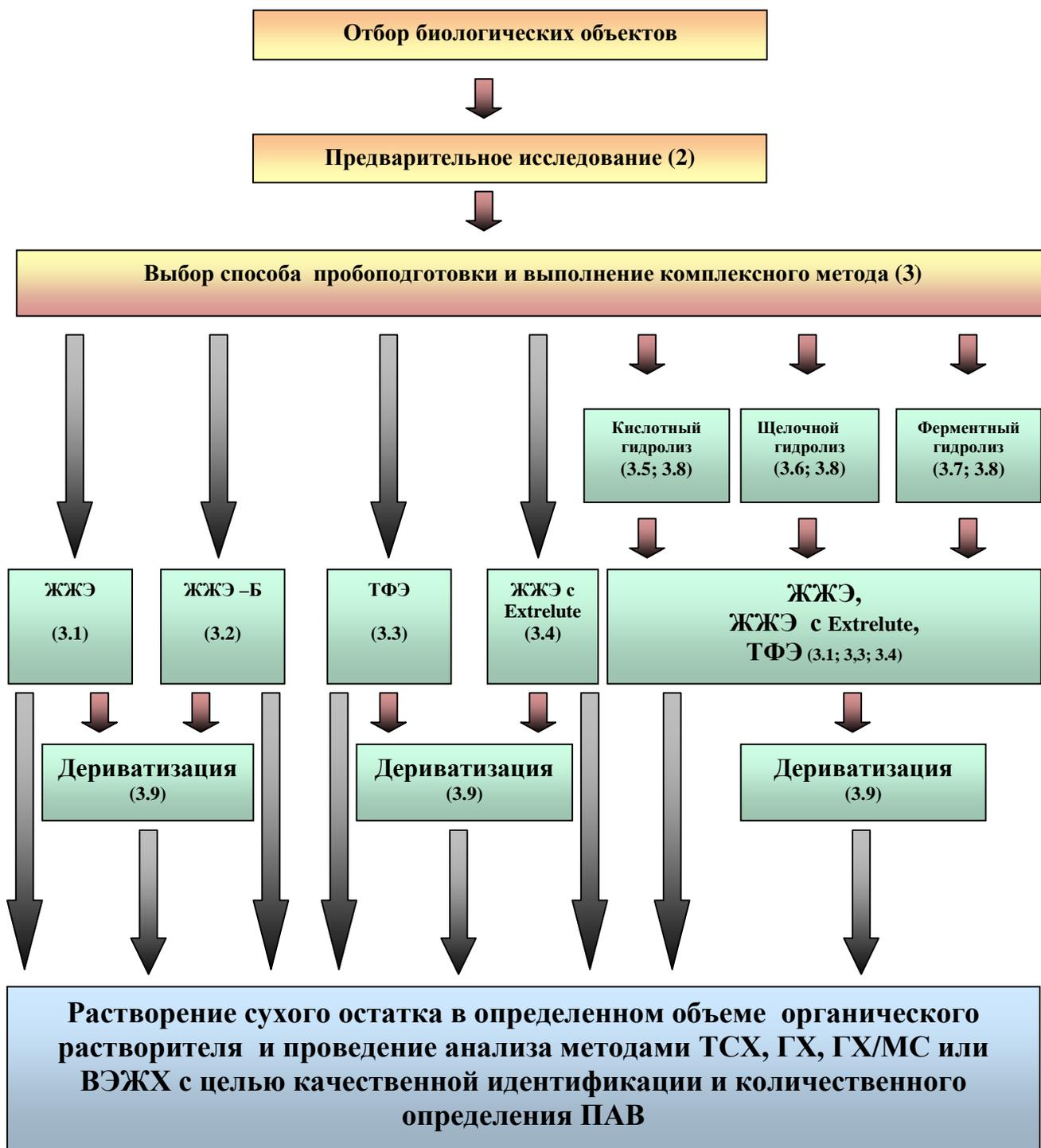
**Приготовление раствора трифторуксусной кислоты в метаноле (9:1).**

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

**Приготовление «хромовой смеси».**

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

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



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

## **1. ОТБОР БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ**

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

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

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

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

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

## **2. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

Методом предварительного анализа, позволяющим произвести скрининговый поиск ПАВ, является иммунохроматографический – с применением экспресс-тестов при их наличии для обнаружения

конкретного вещества или группы веществ. При использовании экспресс-тестов присутствует вероятность получения ложноположительного результата из-за наличия кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры, поэтому *для исключения ошибок при положительном или сомнительном результате в обязательном порядке необходимо проведение подтверждающего химико-токсикологического исследования другим, более специфичным методом.*

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

При положительном результате в качестве дополнительных методов исследования используются:

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

При отсутствии экспресс-тестов, зарегистрированных Министерством здравоохранения РБ и разрешенных для применения, выбор способа пробоподготовки зависит от физико-химических свойств веществ, с учетом вероятности нахождения аналитов в образцах биологического материала в связанном состоянии с белками, глюкуроновой кислотой, сульфатами, а также в зависимости от необходимости обнаружения метаболитов. Пробоподготовка проводится по одной или нескольким описанным

ниже технологиям с учетом указанного перечня веществ, которые могут быть выделены из биоматериала при их использовании.

### **3. ВЫПОЛНЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО МЕТОДА**

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

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

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

Вариант № 1 (выделение ПАВ из мочи и крови для скринингового исследования с целью выявления опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных; циклодола,

кетамина, трициклических антидепрессантов; производных барбитуровой и троповой кислот, бензодиазепина, дибензодиазепина, фенотиазина, тиоксантена, бутирофенона; клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенацаламина, синтетических каннабиноидов производных 1H-индол-3-карбальдегида).

В экстракционную тубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы и добавляют 0,2 мл (для плазмы 0,1 мл) 2 н раствора соляной кислоты, перемешивают, затем добавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метиловом спирте (0,04 г/л), 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 $\alpha$ -метилтестостерон в этиловом спирте (0,15 г/л), перемешивают и проверяют рН с помощью универсальной индикаторной бумаги. При необходимости доводят рН до значений 2,0 раствором соляной кислоты. Экстракцию проводят дважды: первый раз диэтиловым эфиром; второй раз хлороформом (в объемном отношении «экстрагент» – биологическая жидкость – 1:1). Время экстракции – 10 минут на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин или шейкере-ротаторе. Содержимое тубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой эфира и нижний слой хлороформа отделяют с помощью пластиковой пипетки и переносят в выпарительную чашку при исследовании мочи или концентрационную чашку при исследовании плазмы. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40<sup>0</sup> С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40<sup>0</sup> С. Сухой остаток содержит вещества кислого характера.

К оставшемуся в тубе биологическому объекту (моче) добавляют 0,2 мл 25% раствора аммиака (для плазмы – 0,1 мл), перемешивают и

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

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

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

В экстракционную тубу (флакон БСС 25 или флакон объемом 30 мл) помещают 10 мл мочи или 5 мл плазмы, прибавляют 3,0 г натрия хлорида и 1,5 мл насыщенного раствора натрия углекислого, 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метиловом спирте (0,04 г/л), затем перемешивают, проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 9-10). Экстракцию проводят 10 мл смеси растворителей: хлористый метилен - гептан –

пропанол-2 (7:2:1). Время экстракции – 10 минут на планетарном шейкере типа S-3 при 120 об/мин. Центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Верхний слой органического растворителя отбирают одноразовой пластиковой пастеровской пипеткой и переносят в концентрационную чашку, избегая попадания водного слоя. В конечный экстракт добавляют 2-3 капли раствора соляной кислоты в метаноле в соотношении 9:1, для предотвращения потерь ПАВ при выпаривании. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха или азота при температуре не выше 40<sup>0</sup>С. Полученное извлечение исследуют методами ТСХ, ГХ и ГХ/МС без дериватизации или с дериватизацией для исследования методами ГХ и ГХ/МС.

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

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

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

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

Органическое извлечение упаривают в токе теплого воздуха или азота при температуре не выше 30-40<sup>0</sup>С до объема около 500мкл. Упаренное извлечение переносят в виалу, при необходимости доводят объем до 500 мкл метиленом хлористым и исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС или ГХ/МС.

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

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

Метод разрушения связей с белками с последующей экстракцией органическими растворителями позволяет выделять из биологических объектов (плазмы) лекарственные средства, наркотические средства и

психотропные вещества, которые транспортируются в виде комплексов с белками крови.

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

Отбирают 1 мл исследуемого образца (сыворотки или плазмы) и проверяют рН, при необходимости доводят до рН 7- 9 добавлением по каплям 2% раствора аммиака, перемешивают. Отбирают 500 мкл подготовленного анализируемого образца, переносят в пробирку объемом 1,5 мл. При необходимости добавляют внутренний стандарт [IS] (например, 10 мкл D5-Диазепам с концентрацией 0,01 г/л). Затем добавляют 500 мкл холодного ( $-18^{\circ}\text{C}$  и ниже) ацетонитрила. Смесь тщательно перемешивают в течение 10-15 секунд, используя вортекс. Исследуемый образец помещают на 10 минут в морозильник ( $-18^{\circ}\text{C}$  и ниже, затем центрифугируют пробирку с образцом при  $10\,000 \times g$  ( $20^{\circ}\text{C}$ ) в течение 5 минут. Отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в виалу. Полученное извлечение исследуют методами ГХ и ГХ/МС, ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации или с дериватизацией для исследования методами ГХ и ГХ/МС.

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

В экстракционную трубу объемом 12 мл помещают 1 мл плазмы или сыворотки. При необходимости добавляют внутренний стандарт

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

### **3.3 Технология пробоподготовки для выделения ПАВ методом ТФЭ.**

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

- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- фенциклидин (РСР);
- кокаин и его метаболиты;
- синтетические дизайн-амфетамины,
- производные фенацаламина (в т. ч. РVP, МDPV и др.) и их метаболиты;

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

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

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

#### Вариант № 2 (выделение фенциклидина (РСР))

В мерную пробирку отбирают 5 мл мочи, прибавляют 3 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, перемешивают и проверяют рН по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение 6,0), затем прибавляют 50 мкл раствора

внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л) и перемешивают.

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

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

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

Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200мг/3мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж

6 мл метилового спирта и 6 мл 0,1 М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного с рН 6,0. Затем загружают 6 мл подготовленного образца мочи со скоростью 2-3 мл/мин. Картридж промывают последовательно 3 мл воды, 3 мл 0,1 н раствора соляной кислоты и 3 мл метилового спирта. Сушку картриджа производят под вакуумом в течение 10 минут. Элюирование аналитов производят пропусканием через картридж 3 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25% раствор аммиака (78:20:2) со скоростью 2-3 мл/мин. Элюат собирают, переносят в концентрационную чашку и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40° С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40° С. Полученное извлечение исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации, либо с дериватизацией при использовании метода ГХ/МС.

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

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

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- производные салициловой кислоты;
- нестероидные противовоспалительные средства;

- псилоцин, псилоцибин;
- бензоилэргонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- трициклические антидепрессанты;
- синтетические дизайн-амфетамины производные фенацетаминина (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды производные 1*H*-индол-3-карбальдегида (AB-PINACA, AB-FUBINACA и др.).

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

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

Для проведения исследования методом ВЭЖХ к сухому остатку в концентрационной чашке прибавляют 1,5 мл 8% водного раствора натрия двууглекислого и 1мл 0,5% водного раствора нафтохинон-4сульфата, перемешивают, переносят в экстракционную трубу

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

#### Вариант № 2 (выделение производных барбитуровой кислоты)

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

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

чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева.

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

Вариант № 3 (выделение ПАВ и лекарственных средств кислого характера – производных салициловой, фенилпропионовой, барбитуровой кислоты и бензодиазепина)

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

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

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

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

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

вакуумом в течение 10 минут. Затем элюируют метиловым спиртом дважды порциями по 500 мкл. Скорость пропускания метилового спирта – 1 мл/мин. Элюат выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 60° С. Исследуют методом ВЭЖХ-МС/МС.

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

В мерную пробирку объемом 20 мл отмеривают 10 мл мочи, прибавляют 0,5 мл 10% раствора аммония сернокислого, затем 50 мкл раствора внутреннего стандарта дифениламина в метаноле (0,04 г/л), перемешивают, прибавляют по каплям 25% раствор натрия гидроокиси до рН 9,0 по универсальной индикаторной бумажке. Объем доводят дистиллированной водой до 20 мл. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 20, экспозиция 10 минут. Колонку промывают 40мл смеси хлороформ – пропанол-2 (85:15). Скорость пропускания раствора 2-2,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение переносят в экстракционную трубу объемом 50 мл и дважды экстрагируют 3 мл 0,2 N раствора соляной кислоты.

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

### **3.5 Технология кислотного гидролиза с последующей экстракцией органическими растворителями**

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

- опиоидные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);
- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;

- псилоцин, псилоцибин;
- производные салициловой кислоты;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- синтетические дизайн-амфетамины (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды группы JWH, их структурные аналоги и кислые метаболиты.

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

#### *Жидкостно-жидкостная экстракция*

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

В экстракционную трубу объемом 12 мл вносят 0,6 грамма натрия углекислого, затем по каплям 3 мл гидролизата, рН доводят до 9-10 по универсальной индикаторной бумажке добавлением 10% раствора натрия углекислого. Добавляют 3 мл этилового эфира уксусной кислоты и перемешивают в течение 10 минут на шейкере при 120 об/мин. Содержимое тубы переносят в пластиковую пробирку и центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин на центрифуге типа СМ-6М. Слой органического растворителя отделяют с помощью

пластиковой пипетки и переносят в концентрационную чашку. Выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40° С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40° С. Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС без дериватизации, либо с дериватизацией при использовании метода ГХ/МС.

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

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

#### *Твердофазная экстракция*

Гидролизат охлаждают до комнатной температуры, затем добавляют 500 мкл 25% водного раствора аммиака, при необходимости рН доводят до 6,5 - 7 по универсальному индикатору добавлением 10% раствора аммиака. Затем к образцу прибавляют 2

мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 4,8. Содержимое флакона центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяют от осадка. Для экстракции используют патроны для ТФЭ (картриджи) со смешанными фазами (200мг/3мл). Кондиционирование сорбента осуществляют путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этилового спирта и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8). Затем загружают 3 мл подготовленного гидролизата со скоростью 2-3 мл/мин. Картридж промывают последовательно 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 4,8) и 1 мл 10% раствора этилового спирта. Сушку картриджа производят под вакуумом в течение 20 минут. Элюат I, содержащий вещества кислого характера, получают пропусканием через картридж смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (2:1) дважды по 2 мл со скоростью 2-3 мл/мин. Элюат II – двукратным пропусканием через картридж смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25% раствор аммиака (2:1:0,1) по 2 мл со скоростью 2-3 мл/мин. Органические извлечения (элюаты) собирают отдельно, переносят в концентрационные чашки и выпаривают досуха в токе теплого воздуха при температуре не выше 40<sup>0</sup> С или в вакуумном сушильном шкафу при температуре 40<sup>0</sup> С. Полученные извлечения исследуют методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ/МС без дериватизации, либо с дериватизацией при использовании метода ГХ/МС.

### **3.6 Технология щелочного гидролиза с последующей экстракцией органическими растворителями.**

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

- синтетические каннабиноиды производные 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида;
- кислые метаболиты синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов;
- метаболит тетрагидроканнабинола – 11-нор-дельта-9-карбокситетрагидроканнабиноловая кислота.

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

Необходимую для проведения исследования предварительно обработанную лабораторную посуду промывают метиловым спиртом, высушивают в токе теплого воздуха, затем промывают 5% раствором ТМС в толуоле. Флаконы закрывают навинчивающимися крышками, концентрационные и выпарительные чашки переворачивают вверх дном и помещают в сухожаровой шкаф на 30 минут при  $t$  80°C.

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

В подготовленный флакон БСС 25 или экстракционный флакон объемом 30 мл помещают 2 мл метилового спирта, добавляют 4 мл

исследуемой мочи, 20 мкл раствора внутреннего стандарта 17 $\alpha$ -метилтестостерона (0,15 г/л) в этаноле и перемешивают. Затем добавляют 0,4 мл 5М раствора натрия гидроксида и перемешивают. Флакон закрывают навинчивающейся крышкой. Закрытый флакон помещают в термостатируемую водяную баню при  $t$  60°C на 10 минут. После проведения гидролиза флакон охлаждают до комнатной температуры (не открывая). К жидкости во флаконе прибавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты до рН 2,0 по универсальной индикаторной бумажке (необходимое значение не выше 2,0). Выделение веществ из полученного гидролизата производят методами ЖЖЭ, ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelute NT 3.

*Жидкостно-жидкостная экстракция.*

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

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

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

*Жидкостно-жидкостная экстракция с использованием сорбента Extrelut NT 3.*

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

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

### **3.7 Технология ферментативного гидролиза $\beta$ глюкуронидазой с последующей экстракцией органическими растворителями**

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

- опийные алкалоиды, их метаболиты и производные;
- синтетические опиоиды (метадон, фентанил и его производные и др.);
- производные фенилалкиламина и их метаболиты (амфетамин и др.);

- производные барбитуровой кислоты и их метаболиты;
- производные бензодиазепина и продукты их гидролиза;
- псилоцин, псилоцибин;
- производные салициловой кислоты;
- бензоилэкгонин, кокаин, клофелин, димедрол, трамадол;
- синтетические дизайн-амфетамины (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболиты;
- синтетические каннабиноиды производные 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида;
- кислые метаболиты синтетических каннабиноидов группы JWH, их структурные аналоги и кислые метаболиты.

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

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

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

После охлаждения к образцу во флаконе прибавляют 2 мл 1/15 М фосфатного буфера рН 4,8, перемешивают, затем прибавляют 0,5

грамма безводного натрия сернокислого, смесь встряхивают. Во флакон прибавляют 5 мл смеси гексан - этиловый эфир уксусной кислоты (3:1). Проводят экстракцию на шейкере в течение 10 минут при 120 об/мин, затем центрифугируют при 3000об/мин в течение 3 минут. Слой органических растворителей отбирают пластиковой пипеткой, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, смоченного гексаном, затем переносят в концентрационную чашку, выпаривают в токе теплого воздуха при  $t$  не выше  $60^{\circ}\text{C}$ . Экстракцию проводят дважды, органические извлечения объединяют (Извлечение №1).

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

Слой органических растворителей отбирают пластиковой пипеткой, фильтруют через слой безводного сульфата натрия, смоченного метиленом хлористым, затем переносят в концентрационную чашку, выпаривают в токе теплого воздуха при  $t$  не выше  $60^{\circ}\text{C}$ . Экстракцию проводят дважды, органические извлечения объединяют (Извлечение №2).

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

*Жидкостно-жидкостная экстракция с использованием сорбента Extrelute NT 3.*

Вариант №1 (выделение ПАВ кислого и основного характера,

таких как опийные алкалоиды, их производные и синтетические заменители, производные барбитуровой кислоты, фенотиазина, бензодиазепина, тиоксантена и др. для скринингового исследования)

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

Из подготовленной пробы мочи отбирают 3 мл и переносят в колонку с сорбентом Extrelute NT 3, установленную в систему для экстракции под вакуумом, экспозиция 10 минут. Колонку промывают 12 мл смеси хлороформ – этиловый эфир уксусной кислоты (10:2). Скорость пропускания раствора 1-1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью органический растворитель из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл хлороформа, присоединяя его к основному извлечению. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева. (Элюат № I).

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

Элюаты переносят в концентрационные чашки и выпаривают в токе азота при температуре 40° С или токе теплого воздуха при температуре не выше 60° С.

Полученные элюаты I (содержит вещества с кислыми и нейтральными свойствами) и II (содержит вещества основного

характера) исследуют методами ГХ, ГХ/МС или ВЭЖХ-МС/МС без дериватизации, либо с дериватизацией при использовании методов ГХ и ГХ/МС.

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

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

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

#### *Твердофазная экстракция*

Вариант №1 (выделение ПАВ для скринингового исследования – опиоидных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей; кокаина; карбамазепина, эфедрина, амфетамина, метамфетамина и их производных; циклодола, кетамина, трициклических антидепрессантов; производных троповой кислоты, бензодиазепаина,

дибензодиазепина, фенотиазина, тиоксанта, бутирофенона; клофелина, димедрола, дименгидрината; производных фенацаламина, синтетических каннабиноидов производных 1Н-индол-3-карбальдегида)

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

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

Вариант №2 (выделение синтетических дизайн-амфетаминов группы фенамина – катион, метилон, бутилон, этилон, меткатион, нафирон, мефедрон, альфа-PVP, MDPV, альфа-PHP, 4-MeOPVP и др.)

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

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

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

### 3.8 Технология пробоподготовки образцов волос и ногтей для выделения ПАВ.

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

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

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

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

удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60° С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100-200мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 3 мл метилового спирта, выдерживают в ультразвуковой ванне 3 часа, центрифугируют при 6-14 тыс. об/мин. Метанол отделяют и упаривают в концентрационной чашке досуха. Сухой остаток растворяют в 150 мкл метанола. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки, прибавляют 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0 и подвергают дальнейшей очистке методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 мг/3 мл. Скорость потока 3-5 мл/мин. Кондиционирование картриджа осуществляют последовательным пропусканием 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Подкисляют путем пропускания через картридж 2 мл 1М раствора уксусной кислоты, высушивают под вакуумом в течение 2-х минут. Промывают картридж 3 мл гексана. Затем проводят экстракцию веществ кислого и нейтрального характера путем пропускания 2 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1) со скоростью 1-2 мл/мин. Полученное извлечение собирают (Элюат № I). Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3-5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2-х минут. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25% раствор аммиака (78:20:2). Извлечение собирают отдельно (Элюат № II). Элюаты упаривают в

токе теплого воздуха при температуре не выше 60° С или в токе азота при температуре не выше 40° С.

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

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

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 минут. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60° С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100-200мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл, добавляют 1,5 мл метилового спирта, выдерживают на вортексе 1 минуту. Метанол отделяют. К навеске добавляют 1 мл 0,2% раствора β-глюкуронидазы и химотрипсина в 0,1 молярном растворе аммония двууглекислого. Выдерживают 12 часов при 40° С в термостате. Охлаждают до комнатной температуры, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 1 часа. Водную фазу отделяют и подвергают дальнейшей очистке методом ТФЭ. Для ТФЭ используют картриджи с неполярной фазой, смешанной с катионитом (типа Bond Elute Certify или аналог) 200 mg/3 мл. Скорость потока 3-5 мл/мин. Кондиционирование

картриджа осуществляют последовательным пропуском 3 мл метилового спирта и 3 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 6,0. Пропускают подготовленное извлечение из волос (ногтей), промывают картридж 3 мл деионизированной воды. Подкисляют путем пропускания через картридж 2 мл 1М раствора уксусной кислоты, высушивают под вакуумом в течение 2-х минут. Промывают картридж 3 мл гексана. Затем проводят экстракцию веществ кислого и нейтрального характера путем пропускания 2 мл смеси гексан – этиловый эфир уксусной кислоты (1:1) со скоростью 1-2 мл/мин. Полученное извлечение собирают (Элюат №1). Далее картридж промывают 3 мл метанола со скоростью 3-5 мл/мин, высушивают под вакуумом в течение 2-х минут. Для элюирования веществ основного характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25% раствор аммиака (78:20:2). Извлечение собирают отдельно (Элюат № II). Элюаты упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60° С или в токе азота при температуре не выше 40° С.

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

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

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в

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

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

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

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в

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

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

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

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

характера картридж промывают 2 мл смеси метилен хлористый – пропанол-2 – 25% раствор аммиака (78:20:2). Элюат переносят в концентрационную чашку и упаривают в токе теплого воздуха при температуре не выше 60° С или в токе азота при температуре не выше 40° С.

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

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

Образец волос или ногтей отмывают от загрязнений в химическом стакане с водным раствором поверхностно-активных веществ в течение 15 минут. Промывают деионизированной водой до полного удаления моющего средства, затем промывают метанолом. Образец высушивают при температуре 60° С, измельчают ножницами, взвешивают (масса навески 100-200мг). Измельченный образец помещают в экстракционную трубу объемом 12 мл. К навеске образца в экстракционной трубе прибавляют 1,5 мл раствора соляной кислоты в метаноле (9:1), выдерживают 1 час в ультразвуковой ванне при температуре 60° С, затем 12 часов при температуре 37° С. Извлечение центрифугируют, жидкость отделяют от образца и переносят в мерную пробирку объемом 5 мл, объем доводят водой до 3 мл, подщелачивают 10N раствором калия гидроокиси до рН 11,0 по универсальной индикаторной бумажке. Колонку экстракционную Extrelute NT 3 устанавливают в канюлю вакуумной установки для экстракции. Подготовленную пробу мочи переносят в колонку с сорбентом Extrelute, экспозиция 10 минут. Промывают 10 мл гексана,

подкисленного 1 каплей 3 N соляной кислоты. Скорость пропускания раствора 1-1,5 мл/мин. В конце промывки к установке подключают вакуумный насос и выкачивают полностью гексан из колонки. Колонку отсоединяют от вакуумной установки и канюлю промывают 1 мл гексана. Органическое извлечение выпаривают досуха в концентрационной чашке в токе теплого воздуха, не допуская перегрева. Полученное извлечение исследуют методами ГХ, ГХ/МС без дериватизации, либо после дериватизации.

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

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

*Дериватизация йодметаном (метилирование)* используется для выявления производных барбитуровой кислоты и их метаболитов; метаболита тетрагидроканнабинола–11-нор-дельта-9-

карбокситетрагидро - каннабиноловой кислоты, синтетических каннабиноидов производных 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида; кислых метаболитов синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов.

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

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

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

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

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

*Дериватизация уксусным ангидридом (ацетилирование)* используется для выявления опийных алкалоидов, их метаболитов и производных; синтетических опиоидов (метадон, фентанил и его

производные и др.), производных фенилалкиламина и их метаболитов (амфетамин и др.); производных 1,4-бензодиазепина и продуктов их гидролиза; псилоцина, псилоцибина; производных салициловой кислоты; бензоилэкгонина, кокаина, клофелина, димедрола, трамадола; синтетических дизайн-амфетаминов (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболитов).

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

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

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

К сухому остатку в концентрационной чашке, полученному после

проведения выделения из биологического материала разными экстракционными методами, добавляют 80 мкл трифторуксусного ангидрида. Содержимое тщательно перемешивают пипеткой с нанесением раствора на боковые стенки чашки. Смесь переносят в виалу с коническим дном. Виалу закрывают крышкой с септой и помещают в сушильный шкаф при 55 ° С на 30 минут.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Дериватизация триметилхлосиланом (TMS) в присутствии N,O-бис-триметилсилилфторацетамида (BSTFA) (силилирование)** используется для выявления опийные алкалоидов, их метаболитов и производных; синтетических опиоидов (метадон, фентанил и его производные и др.), производных фенилалкиламина и их метаболитов (амфетамин и др.); производных 1,4-бензодиазепина и продуктов их гидролиза; псилоцина, псилоцибина; производных салициловой кислоты; бензоилэкгонина, кокаина, клофелина, димедрола, трамадола; синтетических дизайн-амфетаминов (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболитов; производных барбитуровой кислоты и их метаболитов; метаболита тетрагидроканнабинола–11-

нор-дельта-9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты, синтетических каннабиноидов производных 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида; кислых метаболитов синтетических каннабиноидов группы JWH и их структурных аналогов.

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

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

#### **4. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ТЕХНОЛОГИЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ.**

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

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

- при проведении скринингового анализа биологического образца крови (плазмы, сыворотки) без конкретизации цели исследования

рекомендуется использовать комплекс, состоящий из двух способов пробоподготовки: разрушение связей аналитов с белками с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.2) и ферментативный гидролиз  $\beta$ -глюкуронидазой (химотрипсином или химопсином) с последующей ЖЖЭ (глава 4.3.7);

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

- при проведении целенаправленного исследования образца мочи с целью обнаружения опийных алкалоидов, их производных и синтетических заменителей рекомендуется использовать солянокислый гидролиз с последующей ТФЭ (глава 4.3.5) и дериватизацией трифторуксусным ангидридом (глава 4.3.9) или ферментативный гидролиз  $\beta$ -глюкуронидазой (глава 4.3.7) с последующей ЖЖЭ с использованием сорбента Extrelut NT (глава 4.3.7 вариант 2) или ТФЭ (глава 4.3.7 вариант 1);

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

- при проведении целенаправленного исследования образца мочи с целью обнаружения амфетамина/метамфетамина и их производных; синтетических дизайн-амфетаминов производных фенациламина (в т.ч. PVP, MDPV и др.) и их метаболитов рекомендуется использовать

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

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

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

- при проведении целенаправленного исследования образцов крови или мочи с целью обнаружения фенциклидина (РСР) рекомендуется использовать ТФЭ (глава 4.3.3 вариант №2);

- при проведении целенаправленного исследования образцов мочи с целью обнаружения кокаина и его метаболитов рекомендуется использовать ТФЭ (глава 4.3.3 вариант №3);

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

- при проведении целенаправленного исследования образца мочи с целью обнаружения синтетических каннабиноидов производных 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида рекомендуется использовать щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.6);

- при проведении целенаправленного исследования образца мочи с целью обнаружения синтетических каннабиноидов производных 1*H*-индол-3-карбальдегида (AB-PINACA, AB-FUBINACA и др.)

рекомендуется использовать комплекс из двух способов пробоподготовки: прямую ЖЖЭ с получением щелочного извлечения (глава 4.3.1 вариант №2), ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4 вариант №4) и щелочной гидролиз с последующей ЖЖЭ или ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.6);

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

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

- при проведении целенаправленного исследования образцов мочи с целью обнаружения ПАВ и лекарственных средств кислого характера – производных салициловой, фенилпропионовой, барбитуровой кислоты и бензодиаземина рекомендуется использовать ЖЖЭ с помощью сорбента Extrelut NT (глава 4.3.4 вариант №3).

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

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

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

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

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

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

- при выявлении каннабиноидов растительного происхождения; синтетических каннабиноидов производных 1*H*-индол-карбальдегида и 1*H*-индазол-карбальдегида; производных барбитуровой кислоты рекомендуется использовать способ дериватизации йодметаном;

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

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

## ПРИЛОЖЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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