
.....

**ЧЕЛЯБИНСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ**

**Практическое руководство по скринингу лекарственных,
наркотических веществ и их метаболитов методом газовой
хроматографии с масс - селективным детектором для целей
судебной токсикологии**

(Часть I)

Челябинск

2001

Практическое руководство по скринингу лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с масс - селективным детектором для целей судебной токсикологии. Часть I //Челябинск, Челябинское областное бюро СМЭ, 2001, 62 с.

Руководство подготовлено экспертом судебно-химического отделения Челябинского Областного бюро СМЭ, к.х.н. Мелентьевым А.Б.

Содержание

Список сокращений.....	3
1. Введение.....	4
1.1. Выбор биообразцов для скрининга.....	6
2. Подготовка образцов для скрининга.....	8
2.1. Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами.....	10
2.2. Проверка степени извлечения некоторых наркотических и лекарственных веществ из биожидкостей.....	19
2.3. Дериватизация.....	27
3. Хроматографический анализ.....	32
3.1. Расчет времен удерживания.....	32
3.2. Поиск целевых соединений на хроматограммах.....	42
Литература.....	48
Приложения.....	50

Список сокращений

- Ac – ацетилированное производное
- AcA – уксусный ангидрид
- BSA – (N,O-бис(триметилсилил) ацетамид
- Bu – масляный эфир
- BuOH – н-бутанол
- BuCl – бутилхлорид (хлорбутан)
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭЖХ/МСД – ВЭЖХ с масс - селективным детектированием
- ГХ – газовая хроматография
- ГХ/МСД – газовая хроматография с масс-селективным детектированием
- I-BuOH – изобутанол (бутанол-2)
- Me – метиловый эфир
- HFB – гептафтормасляный эфир
- HУ- кислотный гидролиз
- pKa – отрицательный логарифм константы ионизации кислоты
- PFB – пентафторбензил производное
- PFP – пентафторпропионовый эфир
- Pr – пропиловый эфир
- Pro – пропионовый эфир
- CHCl₃ – хлороформ
- СКО – среднее квадратичное отклонение
- СМЭ – судебно-медицинская экспертиза
- SIM – селективный ионный мониторинг
- ТМАН – тетраметиламмония гидроксид
- ТМС – триметилсилил- эфир
- TFA – трифторуксусный эфир
- ФОС – фосфорорганическое соединение

1.Введение

Газовая хроматография на капиллярных колонках широко используется за рубежом в судебной и клинической токсикологии для рутинного скрининга наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов, пестицидов и ФОС в биологических жидкостях и волосах [1-9]. Особую популярность в настоящее время приобретает систематический токсикологический анализ, проводимый методом газовой хроматографии с масс - селективным детектором, так как этот метод позволяет с высокой степенью надежности детектировать одновременно множество токсикологически важных веществ в биообразцах. В зарубежной литературе (Journal of Chromatography, Journal of Analytical Toxicology и др.) периодически публикуются обзоры, посвященные систематическому токсикологическому анализу наркотических и лекарственных веществ.

Обычная стратегия аналитической процедуры токсикологического анализа включает на первом этапе скрининговые тесты, на втором этапе подтверждающий анализ проб, дающих положительные реакции при скрининге, вторым независимым методом с количественным определением идентифицируемого вещества. Однако такая двухступенчатая процедура оптимальна для анализов, в которых идентифицируются вещества, входящие в определенный перечень, например, при допинг - контроле или анализе наркотических веществ. В судебной и особенно в клинической токсикологии, с нашей точки зрения, нельзя ограничиваться заранее определенным списком веществ, а для скрининга необходимо использовать метод, охватывающий как можно более широкий круг потенциальных токсикантов. В настоящее время в России очень быстро расширяется как круг зарубежных лекарственных психотропных средств, так и новых синтетических наркотических веществ, находящихся в незаконном обороте.

Некоторые из этих веществ (LSD, бупренорфин, производные фентанила, низкодозовые производные бензодиазепина и другие) могут быть обнаружены в биожидкостях только очень чувствительными методами, такими как ГХ/МСД или ВЭЖХ/МСД. Существуют тысячи лекарственных веществ, наркотиков, пестицидов, ФОС и других ядов, которые могут быть причиной интоксикации и смерти. Некоторые вещества в организме полностью метаболируют, тогда в моче и плазме могут быть обнаружены только их метаболиты. С другой стороны, все метаболиты должны идентифицироваться в ходе анализа и быть различимы с другими потенциальными токсикантами и с эндогенными веществами. По мнению признанных специалистов в токсикологическом анализе Н.Н. Maurer & R. A. de Zeeuw [10,11], применение неспецифических хроматографических методов, даже если их объединить, недостаточно для целей надежной идентификации, особенно в судебной токсикологии. По этой причине назрела острая необходимость в применении систематического токсикологического анализа, основанного на анализе биожидкостей методом ГХ/МСД, как наиболее универсального, высокочувствительного и специфического метода для скрининга или подтверждения наличия токсикантов в организме, которые могут быть обнаружены методом газовой хроматографии. Скрининг методом ГХ/МСД может быть проведен используя реконструированные масс-хроматограммы по характеристическим ионам или поиск по групповым ионам, предложенный Maurer Н.Н. в работах [4,7,11]. Позитивные сигналы поиска по характеристическим или групповым ионам могут быть подтверждены сравнением полных масс спектров со справочными.

В настоящей работе дан общий подход к скринингу наркотических, лекарственных веществ в биожидкостях методом ГХ/МСД, который выработан в Челябинском областном бюро судебно-медицинской

экспертизы за последние пять лет. В части 2 работы будут приведены конкретные аналитические данные для практической идентификации некоторых групп и отдельных представителей наркотических и лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов. Следует отметить, что приведенные аналитические данные получены в результате проведения конкретной экспертной работы и не всегда охватывают идентификацию полного круга метаболитов наркотических и лекарственных веществ. Однако эти данные позволяют, как правило, обнаружить нативное вещество (если это возможно) и один или два наиболее важных метаболита, что достаточно для надежного обнаружения факта приема препаратов.

1.1. Выбор биообразцов для скрининга

Большинство авторов методик скрининга наркотических и лекарственных веществ [1,4,6,9] сходятся во мнении, что для скрининга и идентификации неизвестного лекарственного или наркотического вещества лучше всего подходит моча, так как концентрации лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в моче велики относительно их концентрации в крови или плазме. Кроме того, в некоторых случаях в моче метаболиты обнаруживаются в более высоких концентрациях и в течение более длительного времени, чем нативные вещества [6].

Концентрации токсикологически важных веществ в плазме или цельной крови во многих случаях очень низки для проведения скрининга. Однако в литературе приведены методики, использующие ГХ с азотно-фосфорным и масс-селективным детекторами для скрининга большой группы наркотических и лекарственных веществ в крови для целей токсикологического анализа [1,12], а также методики для скрининга отдельных групп лекарственных и наркотических веществ, бензодиазепинов

[13, 14,15], барбитуратов [16], амфетаминов [17], каннабиноидов [18], фенотиазинов [19], антиэпилептиков, антидепрессантов, нейролептиков и опиатов [15, 20,21]. Трупная кровь из-за ее высокой вязкости, по сравнению с плазмой или цельной кровью живых лиц, представляет большую проблему для большинства методов пробоподготовки [9]. В большинстве случаев образцы крови или плазмы анализируются для количественного определения токсиканта, обнаруженного при скрининге мочи. Токсикологический анализ волос всегда обнаруживает только хроническую интоксикацию или неоднократное употребление [4].

В связи с вышесказанным, основным объектом скрининга на наркотические и лекарственные вещества является моча. Только при ее отсутствии для проведения скрининга берется трупная кровь. В связи с большим количеством балластных веществ, экстрагируемых из крови при ее пробоподготовке, анализ крови может гарантировать только наличие заранее оговоренного списка наркотических и лекарственных веществ. При наличии мочи из трупной крови мы проводим только анализ наиболее распространенных наркотических и психотропных веществ (группа опия, диазепам, amitриптилин, тизерцин, клозапин, димедрол) и тех, анализ которых в моче затруднен из-за интенсивного метаболизма (группа атропина). Анализ крови на опиаты помимо скрининга мочи проводится также из-за того, что при передозировке героина (особенно в сочетании с алкоголем) часто смерть наступает настолько быстро, что морфин не успевает вывестись с мочой в заметном количестве, что может дать отрицательный результат анализа мочи на опиаты [22] при наличии морфина в крови.

2. Подготовка образцов для скрининга.

Подготовка образцов биожидкостей перед анализом должна обеспечить:

1. Разрушение конъюгатов, так как большинство полярных метаболитов наркотических и лекарственных веществ выводятся с мочой в конъюгированном виде.
2. Изолирование анализируемых веществ из биоматериала.
3. Дериватизацию полярных труднолетучих наркотических, лекарственных веществ и их метаболитов.
4. Переочистку экстракта (если необходимо).

В то же время важно, чтобы при подготовке образцов в анализируемых соединениях не нарушалась их основная структура, так как это приведет к трудностям их идентификации. Для разрушения конъюгатов обычно применяется либо мягкий, но продолжительный ферментный гидролиз, либо более жесткий прямой кислотный гидролиз. Обычно ферментный гидролиз используется в допинг - контроле и для анализа некоторых групп соединений, чувствительных к кислотному гидролизу (типа 1,4 бензодиазепинов, кокаина и др.). Для токсикологических анализов (особенно срочных) обычно предпочитается кислотный гидролиз [4]. При этом обязательно необходимо учитывать возможность гидролиза соединений, имеющих сложно - эфирные и амидные связи, а также иногда и простые эфирные связи. Для целей скрининга наркотических и лекарственных веществ мы применяем кислотный гидролиз в растворе 7% соляной кислоты. Образующиеся при этом продукты гидролиза и их дериваты приведены далее в разделе, посвященном идентификации отдельных групп соединений.

В обзоре [4] Н.Н. Maurer делает вывод, что авторы методик систематического токсикологического анализа для процедур поиска неизвестного яда предпочитают жидкость - жидкостную экстракцию, как

наиболее универсальный метод изолирования. В то же время для подтверждения наличия определенного вида наркотического или лекарственного вещества предпочтение отдается твердофазной экстракции. В более позднем обзоре [9] О. Drummer пишет, что авторы предпочитают твердофазную экстракцию для подготовки образцов к анализу методом ГХ/МСД и жидкость-жидкостную экстракцию для анализа образцов с помощью ВЭЖХ.

Известно, что с помощью жидкость-жидкостной экстракции в органическую фазу извлекаются вещества, находящиеся в неионизированном виде (по принципу подобное растворяется в подобном). Зависимости доли неионизированных форм основания и кислоты от рН среды можно рассчитать по формулам:

$$\alpha_b \text{ (доля неионизированной формы основания)} = \frac{1}{(1+10^{\text{pK}_a-\text{pH}})},$$

$$\alpha_a \text{ (доля неионизированной формы кислоты)} = \frac{1}{(1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a})},$$

где pK_a – константа ионизации кислоты, сопряженной основанию.

В идеальном случае, когда неионизированная форма практически нерастворима в воде и хорошо растворима в слабополярном органическом растворителе, а ионизированная форма соединения, наоборот, нерастворима в органической среде и хорошо растворима в водной фазе, по этим же формулам можно ориентировочно рассчитать долю анализируемого соединения, извлекаемого в органическую фазу в зависимости от рН водной среды. Известно, что классические схемы химико-токсикологического анализа [23,24] предполагают отдельное изолирование и анализ соединений кислотного и основного характера. Однако при этом приходится анализировать по крайней мере 2 образца одной биожидкости, если же учитывать анализ слаболетучих и полярных метаболитов, то анализу

необходимо подвергать уже 3 и более образцов одной биожидкости. При большой загрузке судебно - химических отделений бюро СМЭ и недостатке оборудования в них анализировать большое количество образцов одной биожидкости дорого и неэффективно. Тем не менее, некоторые авторы [1,15] проводят скрининг из одной фракции биожидкости и получают удовлетворительные результаты по извлечению веществ как основного, так и кислотного характера. Это явление нельзя объяснить, если руководствоваться только описанными выше соотношениями между рН водной фазы и степенью извлечения из нее слабополярных наркотических и лекарственных веществ. Для объяснения этого явления нами поставлены модельные эксперименты по экстракции из водных растворов лекарственных веществ с разными кислотно-основными свойствами.

2.1 Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами.

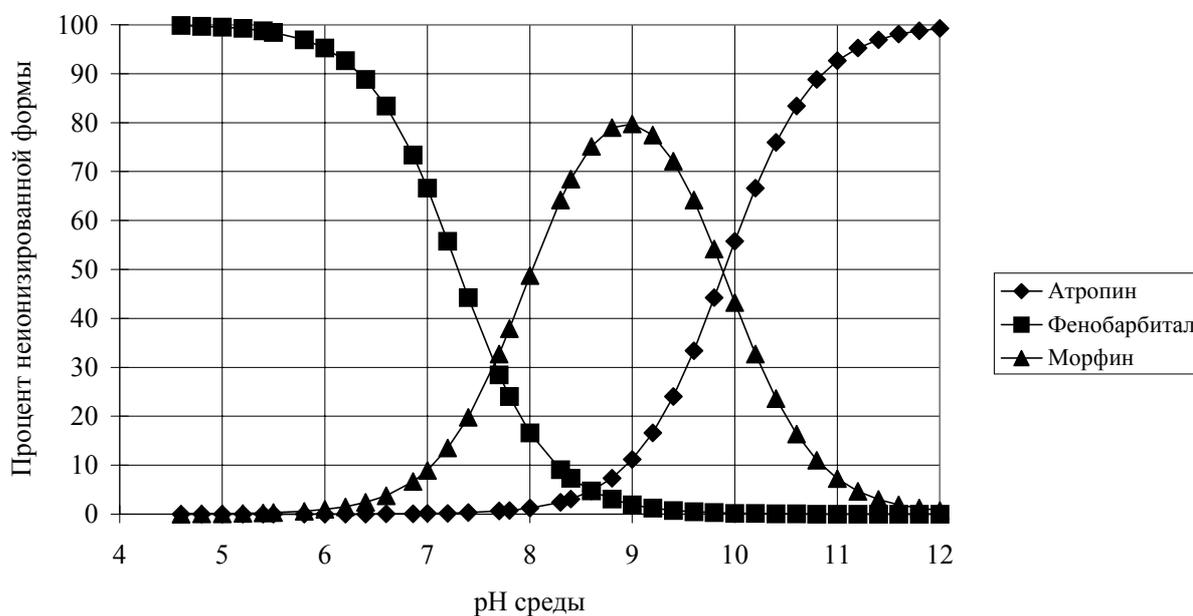
В качестве модельных выбраны 3 вещества из перечня “Токсикологических веществ, подлежащих судебно-химическому исследованию в лабораториях бюро СМЭ” (Приказ Минздрава СССР №1021 от 25.12.1973 г.), имеющих различные кислотно-основные свойства :

- фенobarбитал, вещество кислотного характера, имеет одну из самых низких $pK_a=7$,
- атропин, одно из самых сильных оснований, pK_a сопряженной с основанием кислоты = 10,
- морфин – амфолит $pK_{a1}=8$, $pK_{a2}= 9,9$.

Морфин сам по себе имеет большое токсикологическое значение и может служить моделью для исследования поведения при экстракции большого круга метаболитов, имеющих несколько полярных ОН- групп

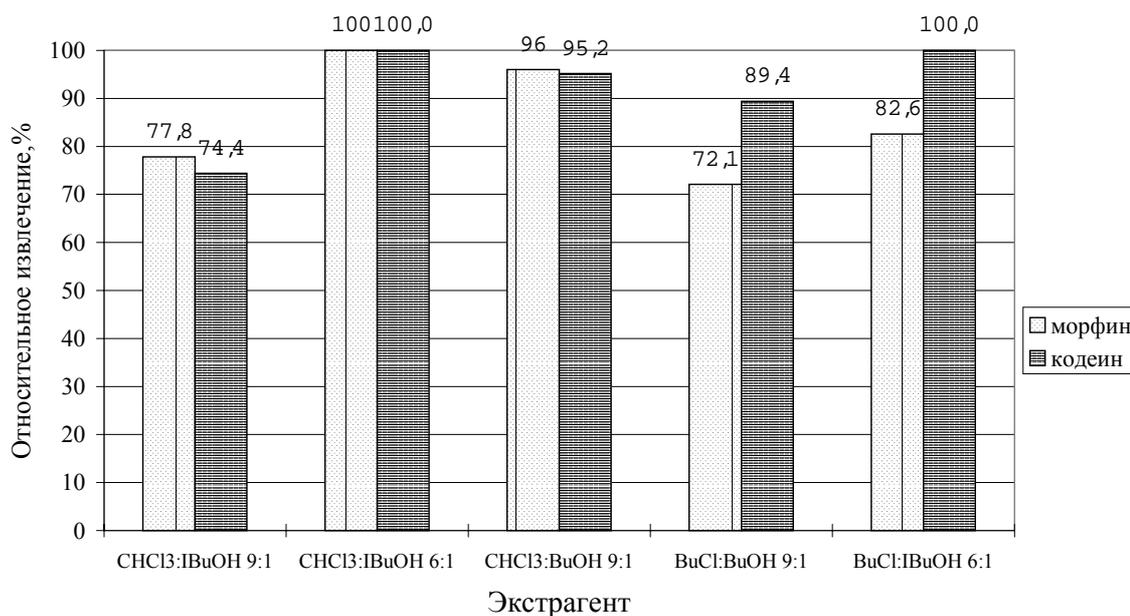
различной природы. Такие соединения гораздо более гидрофильны, чем большинство лекарственных и наркотических веществ, и с их изолированием из биожидкостей, как правило, возникают проблемы. Все три вещества удовлетворяют требованиям, необходимым для расчета степени извлечения по формулам для степени ионизации, так как их неионизированные формы хорошо растворимы в органическом растворителе (хлороформе) и слабо растворимы в воде и наоборот, ионизированные формы значительно лучше растворимы в воде, чем в органических растворителях [23]. Результаты предварительного расчета степени ионизации и доли неионизированных форм для этих веществ в зависимости от рН среды приведены на рисунке 2.1. Как видно из рисунка, нет такой области рН, в которой по расчету все три вещества имели бы значительную долю неионизированной формы и, следовательно, извлекались бы совместно в значительных количествах. Экспериментальное изучение изолирования этих веществ проведено методами экстракции (в хлороформ и смесь хлороформа с изобутанолом 6:1) и сорбции на Полисорбе-1. Смесь хлороформ - изобутанол (6:1) выбрана из известного списка смешанных растворителей для экстракции гидрофильных лекарственных веществ из водных растворов на основании проведенных экспериментов по определению степени и стабильности извлечения морфина и кодеина из мочи при рН=8,6. Результаты определения степени извлечения морфина и кодеина некоторыми смесями растворителей приведены на рисунке 2.2. За 100 % приняты максимальные степени извлечения, наблюдаемые в данных опытах. Мы не проводили эксперименты со смесями хлороформ-этанол и хлороформ-изопропанол, так как эти смеси растворителей экстрагируют очень большое количество эндогенных веществ, мешающих дальнейшему хроматографическому анализу [25]. Из рисунка видно, что наибольшая степень извлечения морфина и кодеина наблюдается для смеси хлороформ:

Рис. 2.1 Зависимости доли неионизированных форм атропина, фенobarбитала и морфина от pH среды



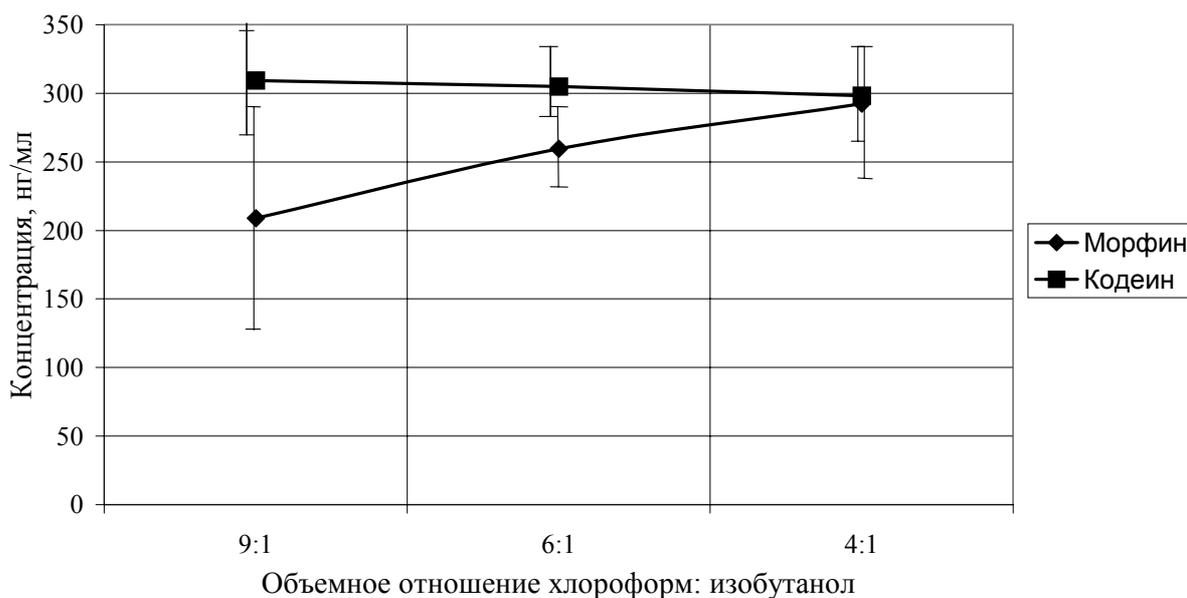
изобутанол (6:1), чуть хуже результаты получены для смеси хлороформ: н-бутанол (9:1). Объемное отношение хлороформ: изобутанол было выбрано на основе изучения воспроизводимости опытов по экстракции морфина и кодеина из мочи с концентрациями по 300 нг/мл (рекомендуемый

Рис.2.2 Относительные степени извлечения морфина и кодеина смесями растворителей



международными организациями [26] уровень Cutoff для опиатов). На рисунке 2.3 приведены, определенные в ходе опытов концентрации морфина и кодеина, а также ошибки их определения (n=8). Видно, что экстрагенты с отношением хлороформа к изобутанолу 6:1 и 4:1 обладают статистически неразличимыми средними значениями концентраций морфина и кодеина и примерно одинаковой дисперсией, однако смесь хлороформа с изобутанолом 4:1 дает больший фон эндогенных соединений в экстракте, поэтому для дальнейших исследований нами выбрана смесь хлороформ-изобутанол 6:1.

Рис.2.3 Концентрации морфина и кодеина, определенные при экстракции смесями хлороформ-изобутанол



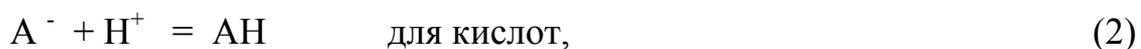
Определение степени извлечения модельных веществ экстракцией. К 1 мл буферных растворов с рН=4,3; 5,5; 6,86; 7,7; 8,3; 8,8 (фосфатные буферные растворы), 9,2; 10,0 (боратные буферные растворы) и 12,0 (аммиачный буферный раствор) добавлялось по 20 мкл этанолового раствора фенобарбитала с концентрацией 1 г/л, по 50 мкл метаноловых растворов морфина и атропина с концентрацией 0,1 г/л и по 5 мл органического растворителя. После экстракции в течение пяти минут на

встряхивателе АВУ-6М от каждой пробы отбиралось по 4 мл органического экстракта, который пропускался через 1 г безводного сульфата натрия, слой соли промывался 1 мл хлороформа и экстракт делился пополам. В одной половине экстракта (после его испарения) методом ультрафиолетовой спектроскопии по методике [24] определено содержание фенобарбитала, а ко второй половине экстракта добавлено 10 мкл метанолового раствора основания этилморфина с концентрацией 0,3 г/л (внутренний стандарт), экстракт был испарен досуха в токе воздуха. К сухому остатку добавлялось 70 мкл BSA, смесь нагревалась 15 минут при 80°C. 1 мкл полученной смеси исследовался методом ГХ/МС на хроматографе HP-5890 с масс - селективным детектором HP-5972 в режиме SIM по ионам 361, 124, 140 (атропин -ТМС эфир), 429, 414, 401 (морфин –2ТМС эфир), 385, 357, 356 (внутренний стандарт –ТМС эфир). В качестве образцов сравнения (стандарт со 100% степенью извлечения) этими же методами исследовались 8 мкг фенобарбитала (8 мкл раствора с концентрацией 1 г/л) и смесь, состоящая из 2 мкг атропина (20 мкл раствора с концентрацией 0,1 г/л), 2 мкг морфина (20 мкл раствора с концентрацией 0,1 г/л) и 3 мкг этилморфина (10 мкл раствора с концентрацией 0,3 г/л). В качестве органической фазы при экстракции использовались хлороформ и смесь хлороформа с изобутанолом в объёмном соотношении 6:1.

Определение степени извлечения модельных веществ сорбцией. К 1 мл буферных растворов, список которых приведен выше, добавлялось по 20 мкл этанолового раствора фенобарбитала с концентрацией 1 г/л, по 50 мкл метаноловых растворов морфина и атропина с концентрацией 0,1 г/л. Полученные растворы пропускались со скоростью 1 мл/мин через предварительно кондиционированный сорбент Полисорб-1 фракции 0,1-0,25 мм, взятый в количестве 0,2 г. Сорбент кондиционировался 2 мл метанола и 2 мл соответствующего буферного раствора. После сорбции сорбент

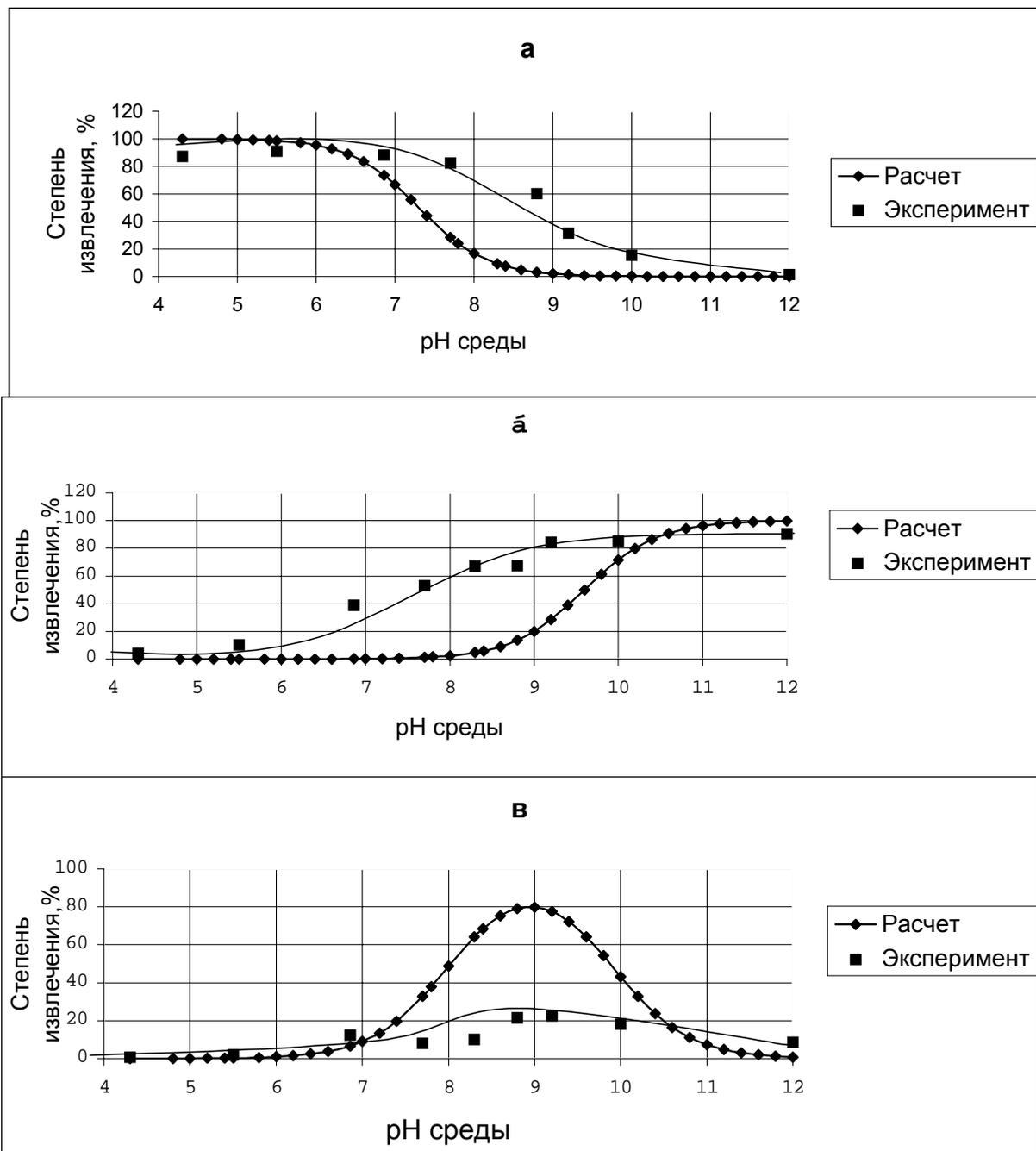
промывался 0,5 мл воды и сушился под вакуумом 15 минут. Элюирование проводилось 2 мл метанола. Далее по 2/5 метаноловых элюатов использовались для определения фенобарбитала, атропина и морфина по методикам, изложенным выше в подразделе экстракции.

Все точки эксперимента по экстракции и сорбции были проведены не менее двух раз, параллельные измерения усреднены. Результаты эксперимента приведены на рисунках. 2.4-2.7. На рисунке 2.4 приведены расчетные и экспериментальные кривые извлечения при экстракции хлороформом. Общий вид расчетных и экспериментальных кривых для фенобарбитала и атропина одинаков, однако экспериментальная кривая для фенобарбитала сдвинута по оси рН на 1,5- 2 единицы в сторону увеличения рН. Наоборот, экспериментальная кривая для атропина сдвинута по оси рН на 1,5-3 единицы в сторону уменьшения рН. Экспериментальная кривая для морфина, хоть и имеет небольшой максимум при рН около 9 (как предсказывает теория), но степень извлечения при этом не превышает 25% и нестабильна. Такой ход экспериментальных кривых извлечения для фенобарбитала и атропина может быть объяснен смещением кислотно-основного равновесия в водной фазе при контакте ее с органическим растворителем. Так как в водной фазе существует равновесие между ионизированной и неионизированной формами:



то при контакте водной фазы с органической в последнюю селективно переходят только неионизированные формы. Значительного изменения рН водной фазы из-за образования или связывания ионов H^+ по реакциям 1 и 2 также не произойдет из-за использования буферных растворов. Если продукты реакции удаляются из зоны реакции, то система стремится восста-

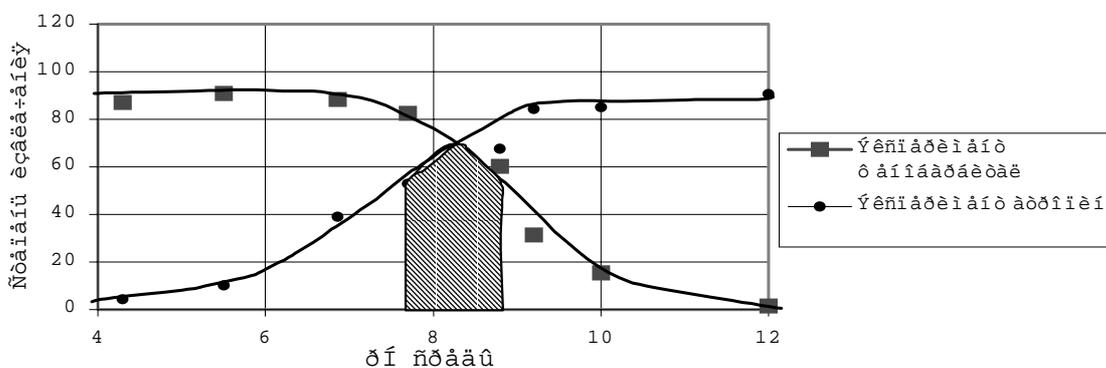
Рис.2.4 Расчетные и экспериментальные кривые степени извлечения фенобарбитала (а), атропина (б) и морфина (в) в зависимости от рН среды при экстракции хлороформом.



новить равновесие, а значит часть оставшихся в водной фазе ионизированных форм опять будет превращаться по приведенным выше реакциям в новые порции неионизированной формы и так далее. Следовательно, из-за сдвига кислотно - основного равновесия в водной фазе

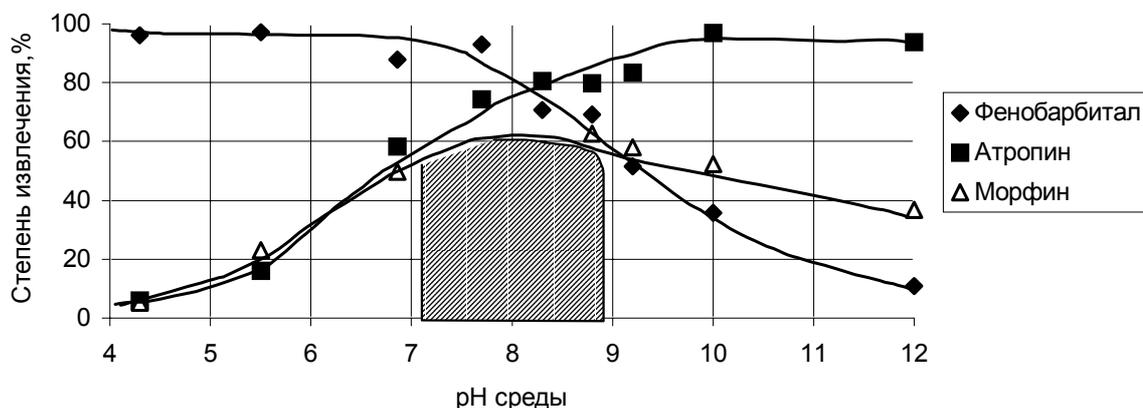
при контакте ее с органическим растворителем в органическую фазу при данном рН среды водной фазы будет переходить больше основания и больше кислоты, чем это можно ожидать при расчете по формулам для констант ионизации. Это явление мы и наблюдали на практике (см. рис.2.4). Учитывая это явление, появляется реальная возможность одновременного извлечения при определенном рН среды веществ как кислотного, так и основного характера. На рисунке 2.5 область совместного извлечения

Рис.2.5. Расчетные и экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала и атропина в зависимости от рН среды при экстракции хлороформом



фенобарбитала и атропина заштрихована. Извлечение морфина (и большинства гидрофильных метаболитов лекарственных веществ) в хлороформ, как и ожидалось, при этих условиях находится на низком уровне. Поэтому извлечение хлороформом можно рекомендовать только для относительно слабополярных и гидрофобных веществ. Однако, известен способ увеличения извлечения полярных гидрофильных веществ повышением полярности органического растворителя за счет добавки в слабополярный растворитель более полярных компонентов [23,24]. На рисунке 2.6 приведены экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина при экстракции смесью хлороформом - изобутанол 6:1 (по объему). Видно, что общий ход кривых для фенобарбитала и атропина по сравнению с экстракцией хлороформом

Рис.2.6. Экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина в зависимости от рН среды при экстракции смесью хлороформ-изобутанол (6:1)

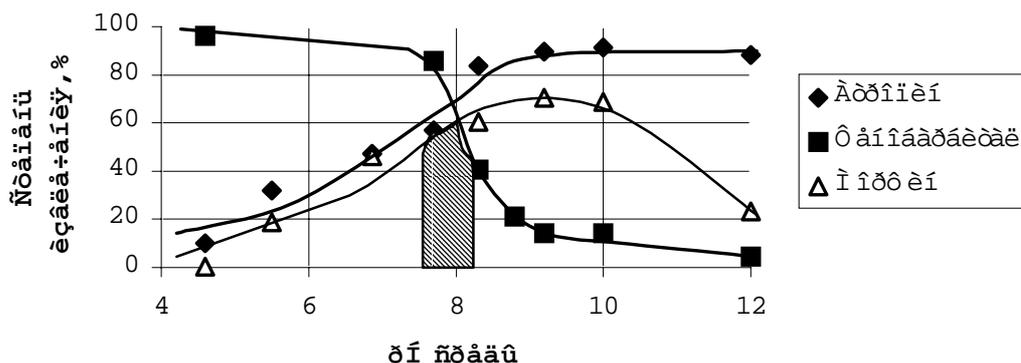


изменился мало, зато значительно поднялся уровень извлечения морфина и несколько расширилась область совместного извлечения всех трех модельных веществ (заштрихована). В этой области при экстракции смесью хлороформ : изобутанол степень извлечения не падает ниже 50 %. Это дает реальную возможность использовать область pH от 7,2 до 9 для одновременного скрининга всего круга наркотических и лекарственных веществ и их полярных метаболитов. Следует отметить, что авторы работ [1,15], предлагающих одновременное извлечение всего круга анализируемых веществ проводили это извлечение при значениях pH, близких к предлагаемой в данной работе.

На рисунке 2.7 приведены экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина при сорбции на Полисорбе-1. Видно, что область совместного извлечения всех трех модельных веществ хотя и существует, но значительно сузилась и сместилась в область более низких pH (7,3-8,1). Несовпадение области максимального извлечения морфина (8,5-10,5) и области совместного извлечения всех трех модельных веществ

делает сорбцию на Полисорбе-1 менее технологичным вариантом для проведения скрининга, чем экстракция смесью хлороформ: изобутанол.

Рис.2.7. Экспериментальные кривые извлечения фенобарбитала, атропина и морфина в зависимости от рН среды при извлечении сорбцией на Полисорбе-1.



Таким образом, из трех опробованных вариантов извлечения модельных веществ из водной фазы в органическую для проведения скрининга рекомендуется экстракция смесью хлороформ: изобутанол (6:1) при рН водной фазы от 7,2 до 9.

2.2. Проверка степени извлечения некоторых наркотических и лекарственных веществ из биожидкостей.

С целью проверки предлагаемой области рН для извлечения широкого круга наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и продуктов гидролиза (для веществ, гидролизующихся в кислой среде). Нами проведены эксперименты по экстракции этих веществ из мочи после гидролиза при рН 8,4-8,6 (свежеприготовленный насыщенный раствор бикарбоната натрия) смесью хлороформ: изобутанол (6:1).

Методика эксперимента: К 1мл “холостой” мочи добавлялось до 25 мкл спиртовых растворов смеси лекарственных и наркотических веществ для

достижения их концентраций в моче на уровне 0,5-1 мкг/мл. Для определения степени извлечения метаболитов и продуктов гидролиза в качестве стандартных растворов, затравливаемых в мочу, использовались этаноловые растворы экстрактов мочи с положительных экспертиз после гидролиза мочи. К образцам добавлялось по 100 мг бикарбоната натрия. Проверялся рН среды по бумаге “Рифан” затем образцы экстрагировались 5 мл смеси хлороформ : изобутанол 6:1 (по объёму). После экстракции в течение пяти минут на встряхивателе АВУ-6М от каждой пробы отбиралось по 4 мл органического экстракта, который пропускаясь через 1 г безводного сульфата натрия. Слой соли промывался 1 мл хлороформа, к органической фазе добавлялось по 20 мкл раствора внутреннего стандарта (циклизин -0,04 г/л), растворитель испарялся в токе воздуха. К сухим остаткам добавлялось по 100 мкл метанола и 1 мкл анализировался методом газовой хроматографии на хроматографе НР-5890 с масс - селективным детектором НР-5972 в режиме SIM по двум характеристическим ионам для каждого анализируемого соединения. В качестве образца сравнения (стандарт со 100% степенью извлечения) использовалась смесь из 20 мкл тех же самых смесей лекарственных и наркотических веществ, которые затравливались в мочу, и 20 мкл раствора внутреннего стандарта (циклизин -0,04 г/л). К образцу сравнения добавлялся метанол до общего объёма 100 мкл и затем проводился анализ аналогично описанному выше способу. Некоторые соединения анализировались в виде ТМС, метиловых эфиров или ацетилованных производных. В этих случаях:

- для получения ТМС эфиров к сухим остаткам после испарения растворителей добавлялось по 70 мкл BSA, смесь нагревалась 15 минут при 80°С. 1 мкл полученной смеси исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам ТМС производных анализируемых соединений;

- для получения метиловых эфиров к сухим остаткам добавлялось 20 мкл 5% раствора ТМАН в метаноле и 100 мкл безводного диметилсульфоксида. После двухминутной выдержки добавлялось 20 мкл метилиодида, смесь выдерживалась при комнатной температуре 10 минут при периодическом перемешивании. Далее к смеси добавлялось 200 мкл 0,1н раствора HCl и 3 мл хлороформа. После экстракции в течение 5 минут хлороформный слой переносился в чистый флакон и испарялся в токе воздуха досуха. К сухому остатку добавлялось 100 мкл метанола и 1 мкл исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам метиловых эфиров анализируемых соединений;

- для получения ацетилированных производных к сухим остаткам после испарения растворителей добавлялось по 40 мкл уксусного ангидрида и триэтиламина, смесь нагревалась 20 минут при 80°C и избыток реагентов испарялся в токе воздуха при 40 °C. Сухой остаток растворялся в 100 мкл этилацетата и 1 мкл исследовался методом ГХ/МСД в режиме SIM по характеристическим ионам ацетилированных производных анализируемых соединений.

Образцы сравнения для этих соединений также подвергались дериватизации и анализу в виде соответствующих производных. В таблицах 2.1 и 2.2 приведены данные по степени извлечения большой группы наркотических и лекарственных веществ, а также некоторых метаболитов и продуктов гидролиза. В столбце 4 таблицы приведены названия производных, которые подвергались анализу, если анализ производился в нативном виде, в этом столбце стоит знак “-”. Из приведенных данных видно, что для большинства лекарственных и наркотических веществ, с которыми проводился эксперимент, степень извлечения при данных условиях выше 70 %, для всех остальных она не ниже 50%.

Таблица 2.1.

**Экспериментальные степени извлечения из мочи некоторых
наркотических, лекарственных веществ.**

№ п.п.	Название соединения	pKa	Производ ные	Степень извлечения, %
1	Адифенин (Спазмолитин)		-	81,5
2	Алимемазин (Терален)	9,0	-	78,0
3	Амидопирин	5,0	-	51,7
4	Аминазин (Хлорпромазин)	9,3	-	74,5
5	Амитриптилин	9,4	-	77,1
6	Амобарбитал (Барбамил)	7,9	Me	96,2
7	Амфетамин	9,9	Ac	66,3
8	Анабазин	Н.д.	Ac	67,5
9	Атропин	10,0	TMC	75,1
10	Ацепромазин	9,3	-	61,3
11	Барбитал	8,0	Me	90,5
12	Бромгексин	8,5	-	86,0
13	Бутадион	4,5	-	96,9
14	Верапамил	8,9	-	54,6
15	Гексабарбитал	8,2	Me	95,2
16	Диазепам	3,3	-	76,3
17	Диклофенак	4,2	-	89,9
18	Дифенгидрамин(Димедрол)	9,0	-	90,2
19	Динезин		-	76,7
20	Дипразин	9,1	-	63,9
21	Имизин	9,5	-	76,4
22	Индометацин	4,5	Me	73,5

Продолжение таблицы 2.1				
№ п.п.	Название соединения	pKa	Производные	Степень извлечения,%
23	Карбамазепин		-	78,1
24	Кардиамин		-	87,9
25	Кетамин	7,5	-	99,3
26	Клозапин		Ac	85,8
27	Клонидин	8,2	Ac	73,2
28	Кодеин	8,2	Ac	86,4
29	Кокаин	8,7	-	88,8
30	Лидокаин	7,9	-	96,0
31	Маркаин (Бупивакаин)	8,1	-	84,2
32	Мебикар		-	94,5
33	Медазепам (Мезапам)	6,2	-	88,2
34	Мепробамат		-	80,2
35	Метамфетамин	9,9	Ac	68,1
36	Миансерин	7,1	-	83,1
37	Морфин	8;9,9	Ac	64,8
38	Нитразепам	3,4,10,8	-	70,6
39	Новокаин (Прокаин)	8,1	Ac	64,9
40	Окспренолол	9,5	Ac	98,2
41	Папаверин	6,4	-	77,1
42	Пентобарбитал (Этаминал)	8,0	Me	98,5
43	Промедол (Тримеперидин)		-	88,1
44	Пропранолол (Анаприлин)	9,5	Ac	94,6
45	Стрихнин	2,3;8	-	76,0

46	Супрастин (Галопирамин)		-	77,8
Продолжение таблицы 2.1				
№ п.п.	Название соединения	pKa	Производные	Степень извлечения, %
47	Тиаприд		-	57,5
48	Тизерцин (Левомепрамазин)	9,2	-	78,4
49	Тиопентал	7,5	Me	95,2
50	Тиоридазин	9,5	-	61,6
51	Трамадол	8,3	TMC	92,5
52	Триоксазин		-	92,5
53	Феназепам		-	77,8
54	Фенобарбитал	7,4	Me	89,1
55	Фентанил	8,4	-	79,8
56	Хинин	4;8,5	Ac	87,5
57	Хлордиазепоксид	4,6	-	69,8
58	Хлорпротиксен	8,8	-	73,3
59	Циклобарбитал	7,6	Me	94,5
60	Циклодол (Тригексифенидил)		-	87,1
61	Циннаризин		-	82,6
62	Эфедрин	9,6	Ac	89,2

По нашему мнению, этого уровня извлечения вполне достаточно для проведения скрининга. Работы в направлении тестирования методики и расширения круга метаболитов и продуктов гидролиза, которые могут быть идентифицированы данным методом, будут продолжены.

Таким образом, мы используем следующую методику изолирования из мочи наркотических, лекарственных веществ и их метаболитов:

Таблица 2.2

**Экспериментальные степени извлечения из мочи некоторых
метаболитов и продуктов гидролиза наркотических и лекарственных
веществ.**

№ п.п.	Название соединения	Производ ные	Степень извлечения, %
1	2-амино-5-хлорбензофенон (АХБ)	Ас	76,2
2	2-метиламино-5-хлорбензофенон (МХБ)	Ас	84,0
3	2-амино-5-бром-2'-хлорбензофенон (АБХБ)	Ас	83,0
4	2-амино-5-нитробензофенон (АНБ)	Ас	91,6
5	Дифенилметанол (продукт гидролиза дифенгидрамина)	Ас	89,5
6	1,2,5-триметил-4-фенил-пиперидил-4-ол (продукт гидролиза промедола)	Ас	74,1
7	Нортриптилин	Ас	90,9
8	Амитриптилин –М (10-гидрокси-)	ТМС	88,0
9	Амитриптилин –М (нор, 10-гидрокси-)	ТМС	85,6
10	Имипрамин-М (дезметил-)	Ас	58,2
11	Имипрамин-М (гидрокси-)	Ас	93,4
12	Имипрамин-М(дезметил, гидрокси-)	Ас	52,5
13	Клозапин –М (дезметил-)	Ас	60,1
14	Клозапин –М (гидрокси-) изомер1	Ас	89,6
15	Клозапин –М (гидрокси-) изомер2	Ас	82,3
16	Котинин	-	85,7
17	Левомепромазин –М (гидрокси-)	Ас	56,8

18	Метилэксгонин (пр-т гидролиза кокаина)	Ас	81,4
Продолжение таблицы 2.2			
№ п.п.	Название соединения	Производ ные	Степень извлечения, %
19	Миансерин-М	Ас	92,0
20	Пентоксифиллин –М(дегидро-)	-	84,8
21	Пентоксифилин –М2	Ас	87,9
22	Тиаприд –М(О-дезметил-)	Ас	64,7
23	Трамадол –М(О-дезметил-)	ТМС	77,6
24	Трамадол –М(N-дидезметил-)	Ас	80,5
25	Трамадол-М (О,N-дидезметил-)	Ас	57,1
26	Фенобарбитал-М(гидрокси-)	Ас	80,9
27	Хлорпромазин-М (гидрокси-)	Ас	90,4
Примечание: здесь и далее в таблицах, буква –М после названия вещества означает его метаболит.			

К 1 мл мочи добавляется 50 мкл раствора этилморфина г/х (0,02 г/л), 0,2 мл концентрированной соляной кислоты, флакон герметично закрывается и раствор нагревается на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляется 0,20 мл 30% раствора едкого натра и около 100 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора. Проверяется рН раствора по бумаге "Рифан" (рН должно быть 8,4-8,6), и объект экстрагируется 5 мл смеси хлороформ-изобутанол (6:1). Смесь встряхивается 5 минут для перемешивания и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин. в течение 5 минут. Органический экстракт

пропускается через безводный сульфат натрия и испаряется в токе воздуха досуха при температуре не выше 40°С.

2.3 Дериватизация

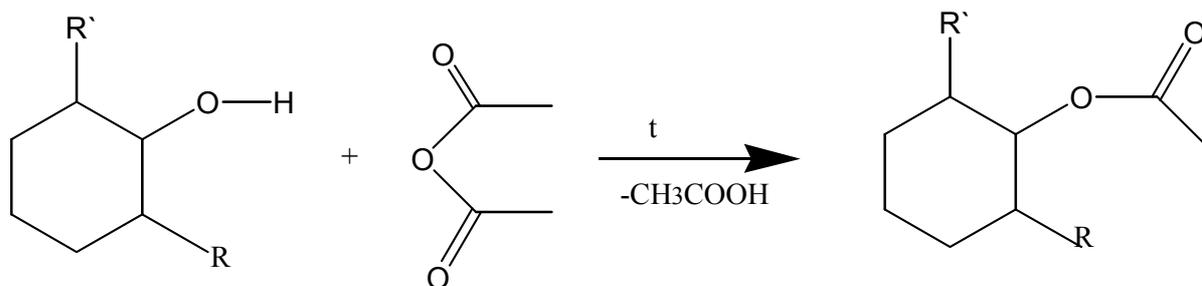
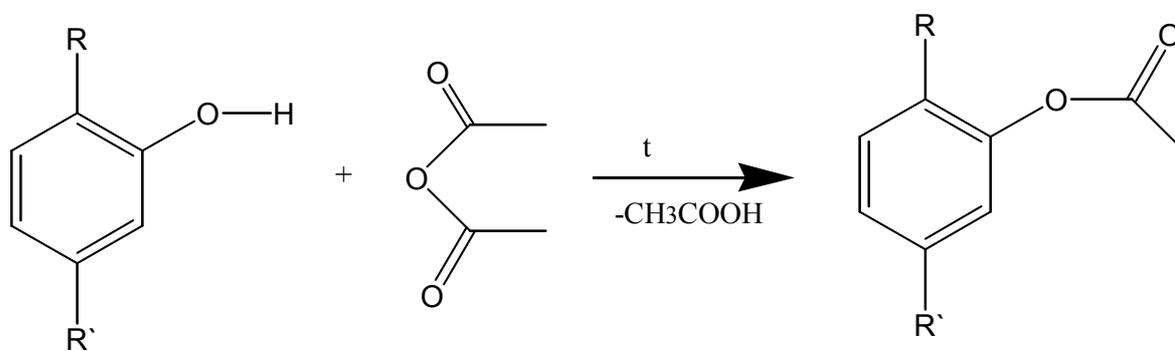
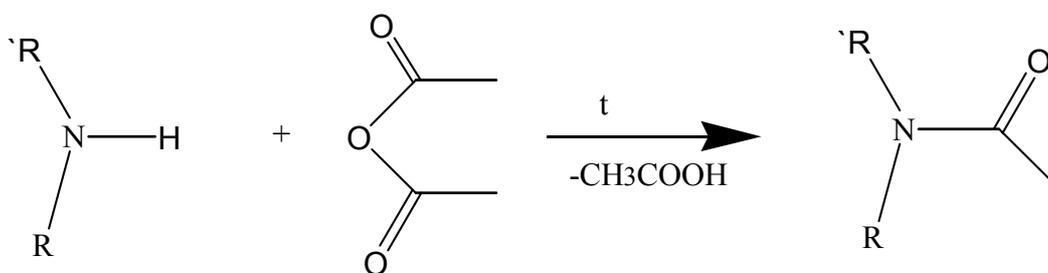
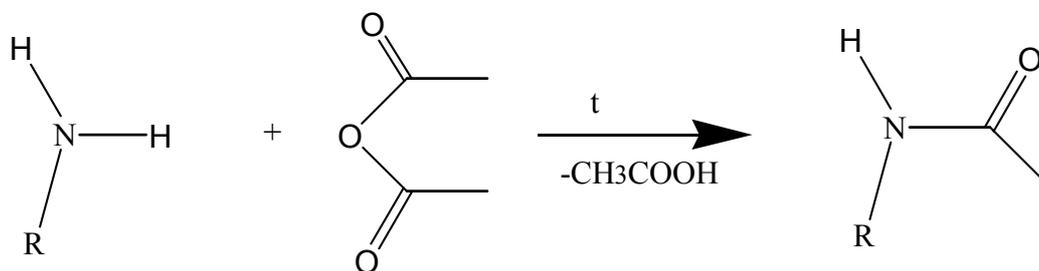
Стадия дериватизации необходима для анализа методом газовой хроматографии соединений, имеющих полярные группы -ОН и -NH. Чем больше полярных групп в соединении, тем менее оно летуче и тем меньше чувствительность и хуже воспроизводимость газохроматографического анализа без стадии дериватизации. Обычно метаболиты большинства лекарственных и наркотических веществ имеют одну или несколько полярных групп разной природы, это могут быть первичные и вторичные аминные группы H_2NR и $HNRR'$, имеющие основные свойства разной силы, фенольные или спиртовые гидроксигруппы -ОН, а также карбокси- и амидные группы, имеющие кислотные свойства разной силы. Поэтому для их анализа в моче после гидролиза необходима стадия дериватизации. Наиболее часто для анализа метаболитов применяется ацетилирование уксусным ангидридом в присутствии основного катализатора типа пиридина или триэтиламина. При ацетилировании происходит этерификация первичных и вторичных аминов, фенольных и спиртовых -ОН групп по схемам, приведенным на рис.2.8.

Ацетилирование наряду с безусловными преимуществами, такими как:

- дешевизна реактивов;
- стабильные дериваты с хорошими газохроматографическими свойствами;
- отсутствие эффекта “привыкания” колонки (как при анализе ТМС производных); обладает и некоторыми недостатками. Основным из них является возможность побочных реакций отнятия воды у некоторых соединений под действием сильного водоотнимающего средства -

уксусного ангидрида. Это приводит к тому, что из одного соединения с несколькими –ОН группами может образоваться несколько дериватов

Рис.2.8. Схемы ацетилирования аминов, фенольных и спиртовых гидроксильных групп.

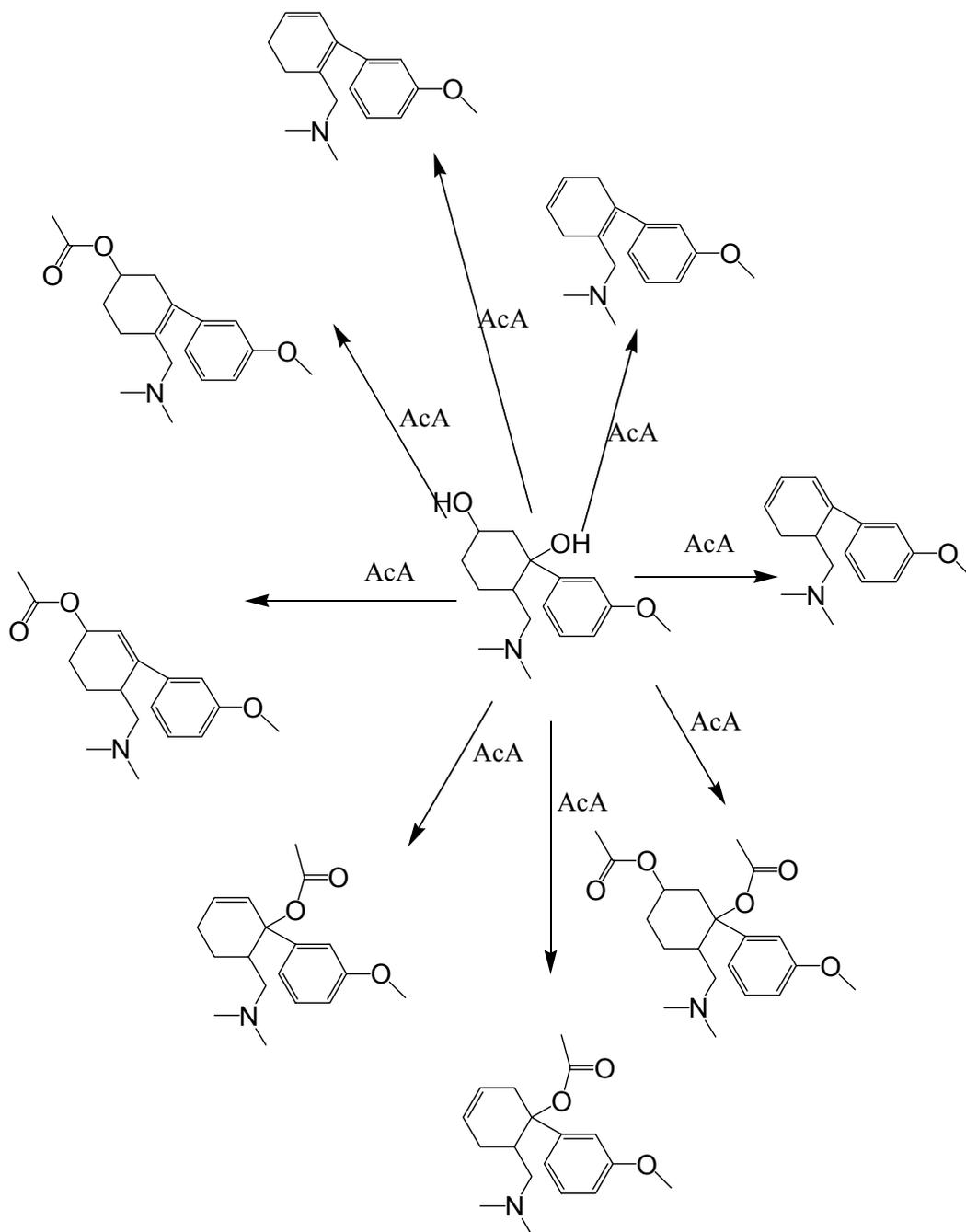


с непостоянным количеством продуктов реакции. Например, один из метаболитов трамадола (1-(3-метоксифенил)-2-(диметиламинометил)-гидроксициклогексан-1-ол) имеет структуру, изображенную на рис. 2.9. Этот метаболит имеет две -ОН группы в циклогексановом кольце и результатом реакции этого метаболита с уксусным ангидридом могут быть 8 соединений, структура которых изображена на рис.2.9. Конечно, не все возможные продукты побочной реакции получают на практике в заметных количествах, тем не менее, при наличии большого количества метаболитов у одного соединения или при употреблении нескольких препаратов одновременно это явление существенно усложняет идентификацию и снижает чувствительность газохроматографического анализа. Возможность подобных реакций при ацетилировании необходимо учитывать при поиске и идентификации метаболитов лекарственных и наркотических веществ на хроматограмме. Другим недостатком ацетилирования является отсутствие реакции с NH- группами кислотного характера. Это не дает возможности закрытия полярных групп в барбитуратах и некоторых других соединениях, имеющих амидные группы. Обычно концентрации барбитуратов и других соединений кислотного характера в крови и моче даже при лекарственной дозировке достаточно велики, поэтому они легко обнаруживаются при скрининге без дериватизации.

Алкилирование (метилирование, этилирование или пропилирование) обычно применяются для идентификации и количественного анализа веществ, имеющих NH- и OH- группы кислотного характера или карбоксильные группы [9,23,27,28], таких как барбитураты, каннабиноиды, диуретики и другие.

Триметилсилильные эфиры очень чувствительны к влаге и нестабильны при хранении, кроме того, введение реагентов для получения ТМС эфиров в колонку газового хроматографа при анализе ведет к ее «привыканию» и

Рис. 2.9. Схема возможных реакций, происходящих при ацетилировании 1-(3-метоксифенил)-2-(диметиламинометил)-гидроскиклогексан-1-ола (метаболита трамадола)



после этого резко ухудшаются газохроматографические характеристики колонки при анализе других дериватов и нативных лекарственных веществ. Однако, имея определенные навыки работы с триметилсилилирующими агентами и особенно при специализированных узконаправленных анализах, когда на приборе выполняются анализы только ТМС эфиров, с ними можно эффективно работать. Они в большинстве случаев имеют «хорошие» масс-спектры, что обеспечивает высокую чувствительность анализов.

Полифторированные реагенты (трифторуксусный, пентафторпропионовый и гептафтормасляный ангидриды) довольно дороги и также относительно легко гидролизуются, что ограничивает их применение, кроме того, для производных этих реагентов в библиотеках масс-спектров имеется очень мало справочных данных.

Следует также отметить, что избыток реагентов после ацетилирования (трифтор- пентафтор- и гептафторацетилирования) необходимо тщательно удалять, так как эти реагенты довольно реакционноспособны и могут повредить жидкую фазу колонки и металлические части масс – селективного детектора. Для целей скрининга мы используем ацетилирование смесью уксусного ангидрида с безводным пиридином, так как это один из самых простых и технологичных способов дериватизации, который не требует особых мер предосторожности и его преимущества для серийных массовых анализов, на наш взгляд, намного превосходят его недостатки.

3. Газохроматографический анализ

Для скрининга лекарственных и наркотических веществ обычно используют капиллярные колонки с неполярной или слабополярной неподвижной жидкой фазой - 100% диметилсилоксан, 5% фенилдиметилсилоксан и другие им подобные [4]. Если для 100% диметилсилоксана (фаза типа HP-1 или Ultra-1) существуют достаточно большие хроматографические базы данных [23,29], то для других фаз сведения об индексах удерживания относительно редки и разрозненны, что затрудняет их использование для поиска и идентификации лекарственных веществ и их метаболитов. Однако, индексы удерживания для 100% диметилсилоксана и слабополярных фаз типа HP-5 (Ultra-2, PAS-5, Rtx-5, ХТИ-5, МХТ-5, DB-5, SE-54, SPB-5, PTE-5, SAC-5, AT-5, BP-5, ВРХ-5, OV-5, PE-2) хорошо коррелируют между собой. Для расчета времен удерживания на слабополярных фазах соединений, для которых известны индексы удерживания на фазе типа HP-1, нами разработана программа на языке “Visial basic”, которая рассчитывает ориентировочные времена удерживания для интересующих нас веществ при наших конкретных газохроматографических условиях.

3.1. Расчет времен удерживания

Применение метода расчета времен удерживания иллюстрировано ниже на примере получения базы данных на колонке с фазой HP-5 длиной 30 метров, внутренним диаметром 0,25 мм с толщиной фазы 0,25 мкм. Температурный режим: начальная температура на колонке 80°C, поддерживается 1 минуту, затем нагрев со скоростью 40 град/мин до 200 °С и последующий нагрев со скоростью 12,5 град/мин до 300 °С с выдержкой при конечной температуре 7 минут. Общее время анализа 18 минут, что

позволяет проводить анализ 22-25 проб в смену. Ввод пробы без деления потока *Split/Splitless* с включением делителя потока через 1 минуту. Газовый режим: газ-носитель гелий, режим “*constant flow*”, начальное давление на колонке 11 psi, объемная скорость потока – 1,1 мл/мин, линейная скорость потока – 39 см³/мин. Напряжение на электронном умножителе на 200 вольт выше *Autotune*. При данных условиях на газовом хроматографе HP-5890 серии II с масс – селективным детектором HP-5972 проанализированы метаноловые растворы, содержащие по 0,05-0,1 г/л наркотических и лекарственных веществ. Эти тестовые смеси взяты как калибровочные. Для каждого вещества в этих смесях известны индексы удерживания на неполярной фазе, которые взяты из [29], желательнее в качестве реперных использовать вещества, индексы удерживания которых равномерно распределены от наименьшего значения до наибольшего. Индексы удерживания, кроме [29], можно взять и [23], однако в монографии “Clarke’s isolation...” база данных меньше, чем в библиотеке масс спектров PMW_TOX2, она ограничена нативными соединениями и не содержит индексов удерживания метаболитов и их производных. В таблице 3.1 приведены данные по времени удерживания, полученные при анализе тестовых смесей при газохроматографических условиях, описанных выше. Программа на языке “Visial basic” использует данные по индексам удерживания и временам выхода, которые находятся в электронных таблицах в формате .XLS, и вычисляет по ним уравнение связи между индексами удерживания и временами выхода в виде полинома n - ной степени вида: $\tau = \sum A_i * RI^n$, где τ - время выхода соединения при данных ГХ условиях, A_i - коэффициенты полинома, а RI – индексы удерживания на фазе типа HP-1 (100% диметилсилоксан). Программа вычисляет также ошибку аппроксимации (среднеквадратичное отклонение - СКО) для расчета доверительного интервала по времени удерживания, внутри которого с вероятностью 95 % находится истинное время удерживания.

Таблица 3.1.

Фрагмент хроматографической базы данных для получения уравнения связи между индексами удерживания и временем выхода.

№п.п.	Название соединения	Параметры удерживания	
		Индекс	Время, мин.
1	Диметилформамид	1000	3,02
2	Нафталин	1190	3,62
3	Эфедрин	1375	4,34
4	Барбитал	1500	4,8
5	Амобарбитал(Барбамил)	1710	5,7
6	Промедол	1810	6,27
7	Димедрол(Дифенгидрамин)	1870	6,45
8	Фенобарбитал	1965	7,02
9	Прокаин (новокаин)	2025	7,37
10	АХБ	2050	7,49
11	МХБ	2100	7,8
12	Амитриптилин	2205	8,44
13	Медазепам	2235	8,75
14	Дипразин(Прометазин)	2270	8,92
15	Карбамазепин	2285	9,2
16	Кодеин	2375	9,67
17	Пентоксифеллин	2435	10,02
18	Аминазин (Хлорпромазин)	2500	10,29
19	Тизерцин (Левомепромазин)	2540	10,4
20	Хлороквин	2595	10,89
21	Фентанил	2720	11,55
22	Нитразепам	2760	11,86
23	Папаверин	2820	12,23
24	Клозапин(Лепонекс)	2895	12,52
25	Галоперидол	2940	13,3
26	Циннаризин	3040	13,86
27	Тиоридазин	3125	14,37
28	Стрихнин	3140	14,5
29	Верапамил	3150	14,65
30	Верошпирон	3240	15,54
31	Неулептил (Перициазин)	3265	15,95

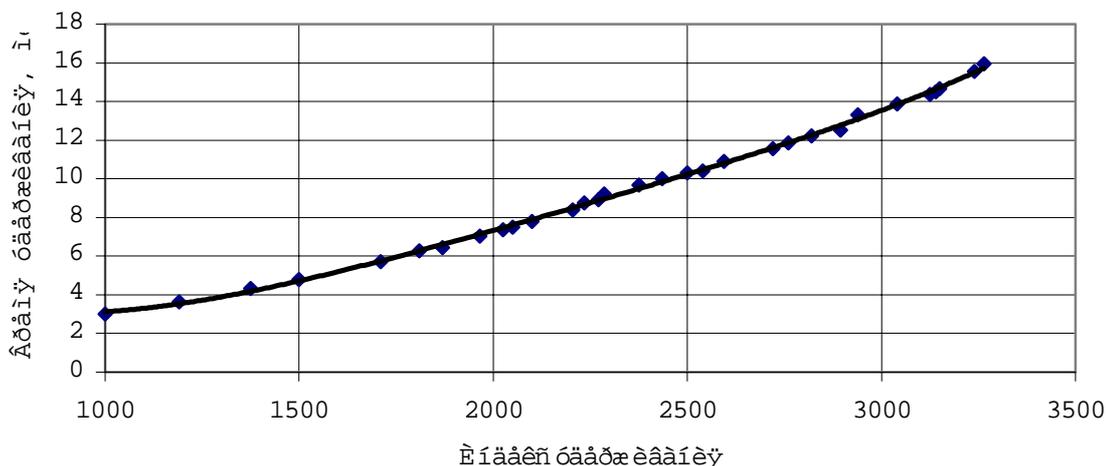
Обычно наименьшая ошибка аппроксимации для описанных условий хроматографирования получается для степени полинома равной четырем.

Для данных из таблицы 3.1 программой получено уравнение связи вида:

$$\tau \text{ (мин)} = 10,37 - 0,0197 \cdot RI + 1,70 \cdot 10^{-5} \cdot RI^2 - 5,15 \cdot 10^{-9} \cdot RI^3 + 5,94 \cdot 10^{-13} \cdot RI^4$$

с СКО равным 0,126 мин. На рис 3.1 графически представлены данные, приведенные в таблице 3.1, а также кривая аппроксимирующей зависимости.

Рис. 3.1. Графическое представление зависимости времени удерживания от индекса удерживания с аппроксимирующей кривой.



Полученное уравнение аппроксимации используется далее для расчета времен удерживания всех интересующих наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов с известными индексами удерживания для фазы типа НР-1. В настоящее время в нашей хроматографической базе данных более 500 соединений (нативные вещества, метаболиты и их дериваты), которые мы обязаны контролировать, или которые идентифицированы в проведенных ранее экспертизах. Для всех соединений, включенных в базу данных, программа автоматически рассчитывает времена удерживания для данных условий хроматографирования, кроме того, программа производит и обратный расчет, когда известно время

Таблица 3.2.

Фрагмент хроматографической базы данных с расчетными и экспериментальными временами удерживания некоторых соединений.

№ п.п.	Название соединения	Индекс удерживания	Время удерживания, мин.	
			Расчет	Эксперимент
1	Никотин	1380	4,18	4,22
2	Кардиамин (Никетамид)	1535	4,86	4,93
3	Амобарбитал-2Ме	1595	5,14	5,16
4	Метилэргонин Ас	1595	5,14	5,19
5	Ибупрофен	1615	5,24	5,2
6	Пентабарбитал-2Ме	1630	5,32	5,28
7	Димедрол НУ Ас	1700	5,67	5,65
8	Парацетамол Ас	1770	6,03	6,07
9	Гексабарбитал-Ме	1805	6,22	6,16
10	Пентобарбитал-М (ОН-) 2Ме	1820	6,30	6,15
11	Кетамин	1835	6,38	6,43
12	Тиопентал	1855	6,48	6,47
13	Фенобарбитал-2Ме	1860	6,51	6,37
14	Лидокаин	1875	6,59	6,57
15	Амидопирин	1895	6,70	6,81
16	Доксиламин	1920	6,84	6,75
17	Трамадол	1945	6,97	6,99
18	Трамадол-М(О-дезметил-)-Н ₂ О Ас	2000	7,27	7,08
19	Циклизин	2045	7,52	7,45
20	Трамадол-М(О-дезметил-) Ас	2080	7,72	7,59
21	Атропин-Н ₂ О	2085	7,74	7,63
22	Клофелин (Клонидин)	2090	7,77	7,88
23	Диклофенак-Н ₂ О	2135	8,02	8,04
24	Метадон	2160	8,16	8,05
25	Пропранолол	2160	8,16	8,16
26	Кетамин-Ас	2170	8,22	8,29
27	Галопирамин(Супрастин)	2190	8,33	8,28
28	Диклофенак-Ме	2195	8,36	8,32
29	Этофиллин-Ас	2200	8,39	8,29
30	Миансерин	2210	8,44	8,6

Продолжение таблицы 3.2.				
№ п.п.	Название соединения	Индекс удерживания	Время удерживания, мин.	
			Расчет	Эксперимент
31	Адифенин	2215	8,47	8,38
32	Атропин	2215	8,47	8,47
33	АХБ-Ас	2245	8,64	8,6
34	Циклодол(Тригексифенидил)	2250	8,67	8,85
35	Нортриптилин	2255	8,70	8,61
36	Триоксазин(Триметозин)	2260	8,73	8,71
37	МХБ Ас	2260	8,73	8,7
38	Маркаин (Бупивакаин)	2260	8,73	8,85
39	Метамизол-М Ас	2270	8,78	8,86
40	Карбамазепин	2285	8,87	9,1
41	Тетрагидроканнабинол Ме	2360	9,29	9,35
42	Фенобарбитал-М(ОН-)Ас	2360	9,29	9,55
43	Бромгексин	2375	9,38	9,56
44	Каннабидиол	2400	9,52	9,5
45	Диазепам	2430	9,70	9,91
46	Дизопирамид	2490	10,05	10,18
47	3-Моноацетилморфин	2500	10,10	10,41
48	Кодеин-Ас	2500	10,10	10,33
49	Пентоксифиллин-М(дигидро)	2505	10,13	10,1
50	Хлорпротиксен	2510	10,16	10,29
51	6-моноацетилморфин	2535	10,31	10,48
52	Каннабинол-Ас	2540	10,34	10,18
53	Каннабинол	2555	10,43	10,52
54	Миансерин-М(НО-) Ас	2580	10,58	10,92
55	Алимемазин -М (ОН-) Ас	2600	10,70	10,95
56	Пропранолол 2Ас	2605	10,73	10,76
57	Героин	2620	10,82	11,08
58	Трифтазин	2690	11,25	11,4
59	Налоксон	2715	11,40	11,39
60	Клозапин Ас	2870	12,41	12,36
61	Морфин-М(нор-) 3Ас	2960	13,04	13,3
62	Хлорпромазин-М(биснор-) Ас	2990	13,26	12,99
63	Клозапин-М(ОН-) Ас	3050	13,71	14,26
64	Клозапин-М(нор-) 2Ас	3490	17,88	17,3

удерживания вещества, но неизвестен его индекс удерживания. Получаемый во втором случае расчетный индекс удерживания, строго говоря, не может быть использован как справочный для фазы НР-1, но он может быть использован для расчета времени удерживания на фазе типа НР-5 при других ГХ условиях (другие размеры колонки, газовый и температурный режимы). В таблице 3.2. приведен фрагмент базы данных, где для сравнения приведены расчетные и экспериментальные времена удерживания для некоторых соединений, которые идентифицированы в образцах после получения аппроксимирующего уравнения и расчета по нему предполагаемых времен удерживания этих соединений. Видно, что в интервале времен удерживания от 3 до 13,5 минут ($RI = 1000-3000$) уравнение рассчитывает времена удерживания с приемлемой точностью, так как ошибки определения времен удерживания не превышают $\pm 3\text{СКО}$, то есть $\pm 0,38$ мин. Наибольшие ошибки аппроксимации наблюдаются для высоких значений индекса удерживания или времен удерживания выше 13,5 мин. Это может быть связано как с ошибками экстраполяции (в этом временном интервале уравнение работает в режиме экстраполяции, так как реперных точек с индексом удерживания выше 3000 очень мало), так и с небольшой точностью определения индекса удерживания в этом интервале значений RI . Исходя из вышесказанного, для надежного обнаружения интересующих нас лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов с расчетным временем удерживания до 13 минут нами используется временное окно $\pm 0,4$ мин, а для времен удерживания выше 13 минут $\pm 0,6$ мин.

В таблице 3.3 приведены индексы удерживания, полученные обратным расчетом по приведенной выше схеме, для некоторых лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов, сведения о которых

Таблица 3.3.

Расчетные индексы удерживания для некоторых лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов.

Название соединения	Параметры удерживания		Характеристические ионы		
	Время, мин.	Расчетный индекс	mz1	mz2	mz3
ГОМК-Н ₂ O (бутиролактон)	3,21	1065	86	56	85
Амфетамин- PFP	3,95	1280	119	257	190
Триэтиленгликоль	4,06	1310	45	89	58
Эфедрин -TFA	4,71	1475	154	110	117
Кардиамин-М(дезалкил-)	4,71	1475	106	149	78
Анабазин	4,73	1480	133	162	163
1,2,5-триметил-4-фенил-пиперидил-4-ол (продукт гидролиза промедола)	4,95	1530	186	201	224
МДА - PFP	5,19	1585	135	162	325
МДА - TFA	5,25	1600	135	162	275
Изониазид TFA	5,6	1675	106	78	233
МДМА TFA	5,75	1705	154	162	289
1,2,5-триметил-4-фенил-пиперидил-4-ол (продукт гидролиза промедола) Ac	5,88	1730	186	201	261
Трамадол-М(N-дезметил-)-H ₂ O Ac	6,63	1875	258	58	273
МДЕА - "EVE"	6,63	1875	162	91	119
Мебикар	6,66	1880	112	198	126
МДЕА PFP	6,68	1885	277	292	162
Пентобарбитал -М 2Me	6,69	1885	169	184	225
МДЕА TFA	6,69	1885	277	292	162
Теофиллин - Pr	6,74	1895	180	222	193
Клонидин 2Me	6,76	1900	222	257	224
Анабазин Ac	6,8	1905	161	133	203
Окспренолол 2TFA	6,88	1920	266	308	457
Клонидин Me	7,01	1945	208	243	210
Клонидин Pr	7,08	1955	229	231	236
Трамадол Ac	7,22	1980	58	188	305
Клонидин 2Pr	7,36	2005	194	236	278

Продолжение таблицы 3.3.					
Название соединения	Параметры удерживания		Характеристические ионы		
	Время, мин.	Расчетный индекс	mz1	mz2	mz3
Эфедрин 2Вu	7,57	2040	58	128	148
Атропин ТФА	7,65	2055	124	140	385
Атропин PFP	7,71	2065	124	94	435
Трамадол-М(О-дезметил-) 2Ac	7,8	2080	58	174	303
Каннабидиол PFP	7,9	2097	377	460	417
9-Тетрагидроканнабинол PFP	7,98	2110	445	417	460
Дибазол	7,98	2110	207	208	103
2-амино-5-нитробензофенон PFP	8,01	2115	191	269	388
2-амино-5-бром-2`-хлорбензофенон ТФА	8,07	2125	388	386	368
2-амино-5-нитробензофенон ТФА	8,19	2145	338	269	308
Каннабинол PFP	8,32	2165	441	442	456
Трамадол-М(ОН-) 2Ac	8,5	2195	58	174	363
Диклофенак -М (ОН-)	8,53	2200	231	233	246
Амитриптилин-М(нор,ОН-)-Н2О ТФА	8,56	2205	231	230	357
2-амино-5-хлорбензофенон Вu	8,6	2210	254	282	256
Диклофенак -М (ОН-) Me	8,65	2220	243	258	295
Кетамин-М(нор-) Вu	8,78	2240	202	152	208
Морфин 2НFB	8,84	2250	464	677	465
МДЕА Ac	8,91	2260	91	162	204
Пропранолол 2ТФА	8,94	2265	266	308	152
Клонидин Вu	9,06	2285	194	230	284
Оксспренолол 2Ac	9,06	2285	200	98	201
Этилморфин ТФА	9,09	2290	296	409	380
Кодеин НFB	9,1	2290	282	495	283
Метоклопрамид -ТФА	9,27	2320	86	280	323
Кетамин Вu	9,28	2320	180	244	236
Этилморфин НFB	9,31	2325	296	509	297
Этилморфин PFP	9,39	2340	296	459	297

Продолжение таблицы 3.3.					
Название соединения	Параметры удерживания		Характеристические ионы		
	Время, мин.	Расчетный индекс	mz1	mz2	mz3
Трамадол-М(N-дезметил,ОН-) -H ₂ O 2Ac	9,47	2350	116	331	228
6-Моноацетилморфин TFA	9,56	2365	364	423	380
Амитриптилин-М(нор-) TFA	9,62	2375	232	217	359
2-амино-5-бром-2`-хлорбензофенон TFA	9,72	2390	274	311	353
Клонидин -PFB	9,9	2420	354	356	389
Атропин Bu	9,91	2420	124	359	140
Хлорпромазин-М (нор-)	10,47	2510	44	304	233
Галопирамин-М(ОН-)	10,56	2525	58	125	247
Кодеин Pro	10,87	2575	355	282	229
Хлорпромазин-М (нор-,ОН-) 2Ac	10,97	2590	232	333	335
Клозапин PFP	11	2595	402	373	415
Этилморфин Pro	11,06	2605	369	296	340
Кодеин Bu	11,21	2630	369	282	222
Хлорпромазин-М(ОН-) изомер2 Ac	11,24	2635	58	291	376
Клозапин TFA	11,25	2635	352	323	365
Феназепам	11,52	2680	350	321	348
Этилморфин Bu	11,6	2694	383	296	354
Фтивазид	11,87	2740	149	78	271
6-Моноацетилморфин Bu	11,88	2740	327	397	268
Клозапин-М(нор-) 2TFA	12,08	2775	352	504	407
Морфин 2Pro	12,09	2775	341	397	324
Хлорпромазин-М(ОН-) изомер 3 Ac	12,11	2780	58	376	288
Дротаверин	12,26	2805	396	368	397
Клозапин-Pro	12,82	2900	312	325	382
Клозапин Bu	12,94	2920	326	339	328
Морфин 2Bu	13	2930	355	268	425
Фенолфталеин 2Me	13,11	2950	271	302	346
Хлорпромазин-М(2ОН) 2Ac	14,94	3275	58	433	392

отсутствуют в базах данных [23,29]. В таблице также приведены по три характеристических иона для каждого соединения, что позволяет использовать эти данные для идентификации соединений на хроматограммах. Параллельно нами создается база данных по индексам удерживания на фазе HP-5 (5% фенил- диметилсилоксан), так как эта фаза наиболее часто используется для химико-токсикологического анализа.

В таблице 1 приложения приведены данные по индексам удерживания (по n-алканам) на фазе HP-5 (5% фенил- диметилсилоксан), определенные нами в течение последнего времени, однако этих данных пока мало для полномасштабного их использования при расчетах времен удерживания. По мере пополнения банка данных индексов удерживания на фазе HP-5 как собственных данных, так и литературных мы планируем полностью проводить расчеты времен удерживания по индексам для этой фазы.

3.2. Поиск целевых соединений на хроматограммах.

После хроматографирования дериватизированного экстракта мочи автоматически включается библиотечный поиск по справочным масс-спектрам. Нами используется следующая стратегия поиска:

- первым производится поиск масс-спектров по личной библиотеке с вероятностью совпадения не ниже 90 %. В настоящий момент в личной библиотеке находится 380 справочных масс-спектров лекарственных, наркотических веществ и их дериватов, которые были идентифицированы в процессе выполнения экспертиз;
- далее производится поиск по специализированной токсикологической библиотеке PMW_TOX2.L с вероятностью совпадения не ниже 50%;
- и далее поиск по библиотекам WILEY275.L или NBS75K.L.

При больших концентрациях наркотических веществ и их метаболитов в моче в рапорте библиотечного поиска кроме нативного лекарственного или наркотического вещества присутствуют, как правило, несколько дериватов его метаболитов. Однако, не всегда библиотечный поиск эффективно обнаруживает анализируемые соединения, так как в экстракте гидролизной мочи присутствует довольно много эндогенных веществ, которые дают значительный фон на хроматограмме, что затрудняет библиотечный поиск. Для надежной фиксации присутствия в моче наркотических, сильнодействующих лекарственных веществ и их метаболитов необходим целевой поиск этих веществ. Maurer Н.Н. в работах [4,7,11] предлагает вести целевой поиск по групповым характеристическим ионам по всей хроматограмме. Для этого им предлагается несколько наборов групповых ионов для поиска пиков наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов на хроматограмме гидролизной мочи. Однако использование групповых ионов предполагает, что в нашем распоряжении имеются полные данные по масс-спектрам и индексам удерживания всех метаболитов наркотических и лекарственных веществ и их дериватов. Для лекарственных веществ, распространенных на Западе, Maurer Н.Н. с сотрудниками создали довольно подробную базу данных масс-спектров электронного удара и индексов удерживания [29], однако в отечественной практике применяются некоторые сильнодействующие вещества, которые не используются на Западе. Кроме того, мы при использовании собственной методики пробоподготовки мочи для скрининга иногда идентифицируем производные метаболитов некоторых веществ, которые отсутствуют в базе данных [29], поэтому мы пока не можем полностью использовать методику поиска по групповым ионам, предложенную Maurer Н.Н.. Для использования этой методики необходимо провести дополнительные исследования по проверке ее надежности при идентификации метаболитов специфичных отечественных

препаратов и расширить круг производных метаболитов наиболее часто используемых лекарственных и наркотических веществ.

Для целевого поиска определенного круга наиболее часто используемых лекарственных и наркотических веществ нами применяется визуальный поиск по характеристическим ионам для каждого из этих веществ в определенном временном промежутке. После проведения подготовительной работы по расчетам аппроксимирующего уравнения и предполагаемых времен удерживания для поиска пиков контролируемых соединений нами используются макрокоманды. Макрокоманды рисуют в окнах параллельного анализа для каждого контролируемого соединения (наркотического, лекарственного вещества, их метаболитов и дериватов) хроматограммы по характеристическим ионам в определенном временном окне. Эти хроматограммы используются для визуального поиска целевых соединений. Временное окно поиска определяется как время удерживания, рассчитанное по описанной выше схеме, плюс-минус $3 \cdot \text{СКО}$. Для описанного выше случая окно поиска составляет при времени удерживания до 13 минут $\pm 0,4$ мин, а для времен удерживания выше 13 минут $\pm 0,6$ мин. Если известно реальное, а не расчетное время удерживания для данного соединения, то при составлении макрокоманд учитывается реальное время удерживания и окно поиска может быть уменьшено. Следует заметить, что вновь устанавливаемая на хроматограф колонка калибруется при помощи калибровочных смесей (см. табл. 3.1.). Чтобы не терять реальные данные по временам удерживания на старой (снятой с хроматографа) колонке, рекомендуется изменением давления в инжекторе хроматографа подкорректировать времена удерживания на новой колонке соединений, входящих в калибровочную смесь, так, чтобы они были максимально близки к временам удерживания эти же соединений на старой колонке. В этом случае можно использовать в дальнейшем хроматографическую базу данных, полученную на старой колонке. Кроме

того, при работе на данной колонке банк данных по временам удерживания постоянно пополняется и для уточнения аппроксимирующего уравнения рекомендуется периодически производить перерасчет времен удерживания, включая в расчет в качестве реперных точек весь набор данных по временам удерживания, полученный на данный момент времени. Эта процедура, как правило, улучшает точность предсказания времен удерживания для дальнейшего использования при поиске пиков по макрокомандам.

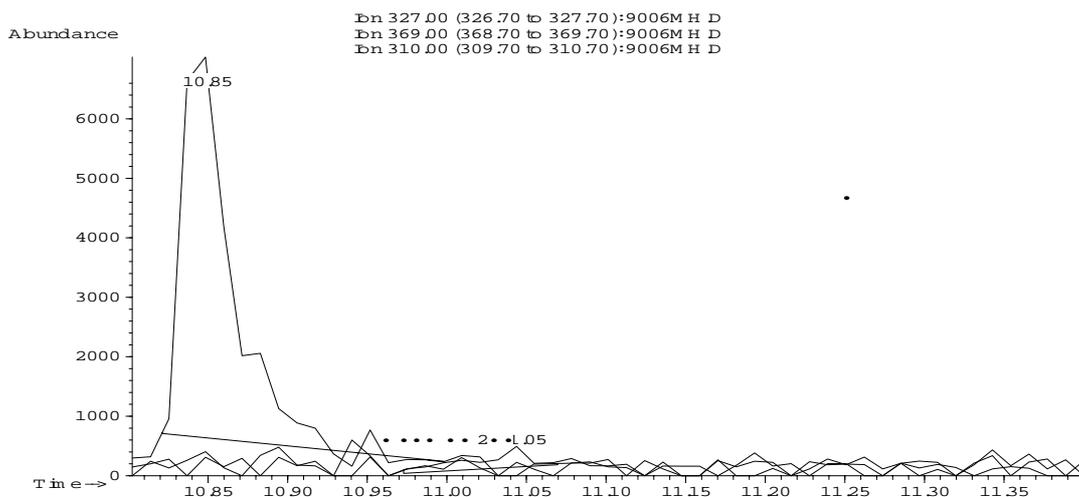
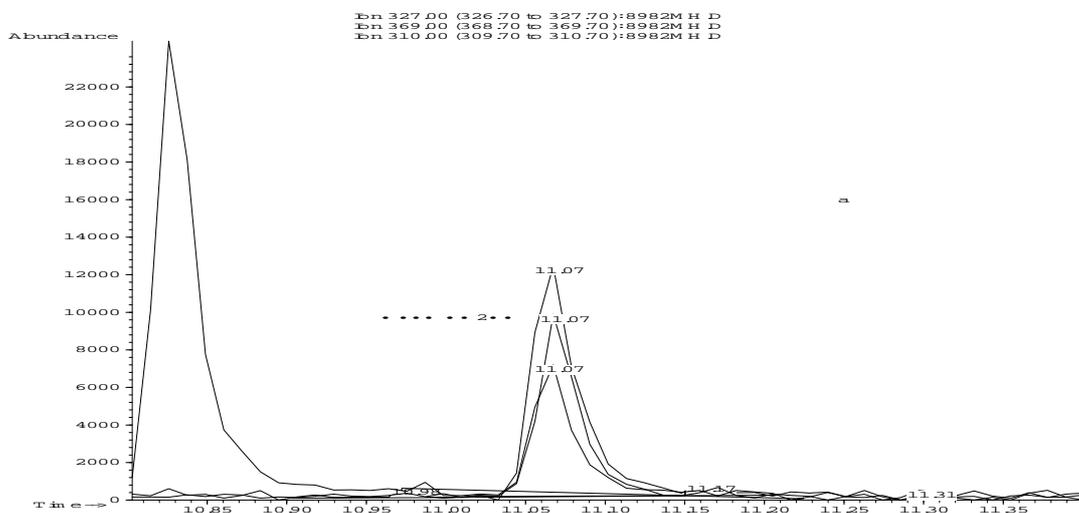
В качестве примера, в приложении 2 приведен текст макрокоманды для поиска некоторых наркотических веществ, их метаболитов и ацетилированных дериватов. Написанные в «Блокноте» макрокоманды следует поместить в директорию «Hrchem/Msexh» (здесь и далее приведены названия для варианта программного обеспечения HP G1034 C MS ChemStation). Вызов макрокоманд производится из параллельного анализа (Standalone Data Analysis), набором в командной строке (Command Line) имени файла в котором находятся макрокоманды, в нашем случае *macro* «*narc1.mac*» (см. Приложение 2). После загрузки в оперативную память машины файла, где находятся макрокоманды, отдельные макрокоманды можно вызывать набором в командной строке имени макрокоманды, в нашем случае *acyl1*. Приведенная в приложении 2 макрокоманда после ее запуска набором имени *acyl1* и нажатия клавиши *Enter* загрузит указанный вами файл с хроматограммой, поместит его в регистр R0 стековой памяти, и прорисует в окнах 5-16 параллельного анализа реконструированные хроматограммы по выборочным ионам, которые указаны в строчках (например для окна 5):

chr tlow:thigh,86,118,177 от времени , указанного в строчке *tlow=4.4* до времени , указанного в строчке *thigh=5.2*, проинтегрирует хроматограмму с помощью вспомогательной подпрограммы IN1 с порогом 10 единиц и поместит в окно (например 5) надпись, которая будет указана в строке

annotate 5,0,ii,t,"Амфетамин Ас" в кавычках "Амфетамин Ас". Макрокоманда поместит каждую из реконструированных хроматограмм в регистры стековой памяти R1-R9,X,Y,Z для того, чтобы их можно было бы в дальнейшем проанализировать до введения новой макрокоманды. Количество окон в каждой команде равно 12 и ограничено объемом стековой памяти. После того, как макрокоманда поместит в окна 5-16 параллельного анализа реконструированные хроматограммы, их необходимо визуально оценить. О возможном присутствии в пробе анализируемого соединения сигнализирует наличие в соответствующем окне трех пиков с одним временем удерживания и характерными ионными отношениями. Как правило, в строку, задающую характеристические ионы *chr tlow:thigh,86,118,177* первым включается самый интенсивный ион и далее в порядке убывания интенсивности. Это помогает в дальнейшем при быстрой визуальной идентификации наличия сигнала или, что важнее, при его отсутствии. На рис.3.2 приведены хроматограммы по характеристическим ионам, которые соответствуют положительному сигналу на *Морфин 2Ас* – 0,6 мкг/мл морфина (рис.3.2- а) и отсутствию сигнала (рис.3.2 - в). При этом самый интенсивный ион героина 327 имеет самый высокий пик и рисуется на хроматограмме белой линией (програмное обеспечения HP G1034 C MS ChemStation), менее интенсивный 369 ион рисуется зеленой линией, а сигнал иона 310 – желтой. Следует отметить, что наличие положительного сигнала на хроматограмме по характеристическим ионам еще не дает гарантии правильной идентификации соединения. Окончательная идентификация должна быть проведена сравнением полученного полного масс-спектра со справочным. Другой вариант идентификации - это анализ в режиме по характеристическим ионам (SIM) сначала «стандартной» биожидкости с известным содержанием анализируемого вещества, затем «холостой» биожидкости для проверки отсутствия сигнала без анализируемого

соединения и, наконец, анализ исследуемой биожидкости, причем время удерживания аналита в пределах ошибки эксперимента (обычно не более $\pm 2\%$) в «стандартной» биожидкости и анализируемой должны совпадать, а отношения сигналов подтверждающих ионов в «стандартной» и анализируемой биожидкостях не должны отличаться более чем на 20% [32].

Рис.3.2 Хроматограммы по характеристическим ионам при наличии морфина - 0,6 мкг/мл в пробе (а) и «холостой» пробы (в)



Таким образом, составляя новые макрокоманды и добавляя в них поиск новых наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов, можно существенно расширить круг поиска. В настоящее время при скрининге мочи на наркотические и лекарственные вещества нами используются 10 макрокоманд, в которые включены все наркотические и лекарственные вещества, которые лаборатория обязана контролировать при «Общем анализе», их наиболее важные метаболиты и дериваты, а также некоторые другие лекарственные вещества, которые, по нашему опыту, имеют токсикологическое значение и часто идентифицируются нами при анализах. Всего по макрокомандам мы ведем целенаправленный поиск 120 веществ, их выбор ограничен только целесообразностью и физическими возможностями оператора. При дальнейшем резком увеличении количества просматриваемых оператором хроматограмм увеличивается риск пропуска позитивного сигнала. Дальнейшее расширение круга целенаправленного поиска может быть связано с введением методики поиска по групповым ионам, однако из-за изложенных ранее причин, мы пока не готовы полностью перейти на эту методику.

Послесловие

Данное издание является первой частью «Руководства...».

Во второй части автор намерен описать газохроматографические и масс-спектральные характеристики некоторых групп и отдельных представителей наркотических, лекарственных веществ, их метаболитов и дериватов, которые могут быть идентифицированы по предлагаемой методике скрининга мочи. Публикация полного руководства частей 1 и 2 намечена на вторую половину 2002 года. Для определения тиража печати просим направлять Ваши заявки на «Руководство..» по электронной почте:

Е-mail адреса melentjev_a@mail.ru amel@pochtamt.ru

или по адресу 454076, г. Челябинск, медгородок, Областное бюро СМЭ, химическое отделение, Мелентьеву А.Б.

С домашней страничкой судебно-химического эксперта Мелентьева А.Б. можно познакомиться на сайте www.forchem.narod.ru

Литература

1. O.H. Drummer, S. Horomidis, S. Kourtis, M.L. Syrjanen, P.Tippett /J. Anal. Toxicol.,- 1994,- V.18,- p.134-138.
2. D.J. Ehresman, S.M.Price, D.J.Lakatua/J. Anal. Toxicol.,- 1985,-V.9,- p.55-62.
3. V.W. Watts, T.F.Simonick /J. Anal. Toxicol.,- 1986,- V.10,- p.198-204.
4. H.H. Maurer /J. Chromatogr., B ,-1992,-V.580,- p.3-41.
5. R.A. Brainthnaite, D.R. Jarvie, P.S.B. Minty, D. Simpson, B. Widdop/ Ann. Clin. Biochem.,- 1995,- V.32,- p. 123-153.
6. D. Simpson, R.A. Brainthnaite, D.R. Jarvie, M.J. Stewart, S. Walker, I.W. Watson, B. Widdop/ Ann. Clin. Biochem.,- 1997,- V.34,- p. 460-510.
7. H.H. Maurer/ Med. Focus.-1994,-V.12,-p.32-36.
8. M.R. Moeller/ J. Chromatogr., B,-1992,-V.580,- p.125-134.
9. O.H. Drummer/ J. Chromatogr., B,- 1999,-V.733,- p.27-45.
10. R.A. de Zeeuw / J. Chromatogr., B,- 1989,-V.488,- p.199.
11. H.H. Maurer, P. Wollenberg./ Drug Res.,-1990,-V.40, p.460.
12. A. Polettini/ J. Anal. Toxicol.,- 1996,-V.20,-p.579-586.
13. C. Drouet-Coassolo, C. Aubert, P. Coassolo , J. P. Cano/ J. Chromatogr.,B,- 1989,-V.487,- p.295.
14. J.V. Smith, K.Wise, R.W.Johnson /Appl. Note № 228-72, Hewlett Packard, 1989.
15. A. Tracqui, P.Kintz, P. Mangin / J. Forensic Sci.,-1995,- V40, - p.254-262.

16. H.H. Maurer, T. Kraemer, O. Ledvinka, C.J. Schmitt, A. Weber/J. Chromatogr., B,- 1990, -V.530,- p.307-326.
17. D. S. Isenschmid, B. S. Levine, Y. H. Caplan / J. Anal.Toxicol.,- 1988,- V.12,- p. 242.
18. C.R. Coodall, B.J.Basteyns / J. Anal.Toxicol.,- 1995,- V.19,- p.419-426.
19. H.Hattori, S.Ymamoto, M.Iwata, E.Takeshima, T.Yamada / J.Chromat., B,- 1992,- V.579,- p.247-252.
20. K.J.Lee, G.S. Heo, N.J.Kim, D.C. Moon / J. Chromator., B,- 1992, -V.608,- p.243-250.
21. R.N.Gupta / J.Chromatogr.,B,- 1992,- V.576,- p.183-211.
22. Н. В. Веселовская , А.Е. Коваленко. Наркотики. М.: Триада-Х,- 2000,- 206с.
23. Clarke`s isolation and identification of drugs/ London, Pharmaceutical Press,- 1986,- 1173 p.
24. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание. Методические указания / Москва,- 1989, -112 с.
25. С.С. Барсегян, И.Б. Барсегян/ В сб: Современные проблемы химико-токсикологического анализа наркотических средств(Материалы Всероссийской научно-практической конференции 23-24 сентября 1999 г.).- СПб.: НИИХ СпбГУ,- 1999,-с. 35-37.
26. R. Brenneisen / Labolife,- 1997, -V.6,- p.15-18.
27. H.H. Maurer, F.X. Tauvel, T. Kraemer / J. Anal. Toxicol,-2001,- V25,- p.237-245.
28. D. Wilkins, H. Haughey, E. Cone, M. Huestis, R. Foltz, D. Rollins /J. Anal. Toxicol,- 1995,- V.19, - p. 483-491.
29. K. Pflieger, H.H. Maurer, A. Weber/ Mass Spectral Library of Drug, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, - 1999.

30. С.С. Катаев, И.Ю. Смирнова, В.А. Залесова, Л.Н. Курдина/ СМЭ, - 2000, - №1,- С.27-31.
- 31.С.С. Катаев, Л.Н. Курдина, В.А. Залесова, Л.В. Тереньева, В.П.Гаранин/ СМЭ, - 2001,- №4,- С.34-37.
32. В.А. Goldberger, М.А. Huestis GC/MS: Quality control/Quality control procedures for forensic urine drug testing laboratores; Hewlett Packard, Technical note.

Приложение 1.

Хроматографическая база данных с индексами удерживания на фазе НР-5

№ п.п.	Соединение	Индекс RI (НР-5)	Индекс [29] RI (НР-1)	Время удерживания	Характеристические ионы			Индекс RI (НР-5) [лит-ра]
					m/z1	m/z2	m/z3	
1	Нафталин	1205	1190	3,62	128	102	127	
2	Резорцинол	1325		4,09	110	81	82	
3	Глицерин 3Ас	1335	1490	4,12	103	145	116	
4	Никотин	1360	1380	4,22	84	133	162	
5	Эфедрин артефакт	1390*		4,34	71	56	105	
6	Ниацинамид	1435	1605	4,5	122	78	106	
7	Метилпарабен	1450	1510	4,55	121	152	93	
8	Кардиамин-М	1490		4,71	106	149	78	
9	4-амино-ацетофенон	1505		4,75	120	135	92	
10	Барбитал	1515*	1500	4,8	156	141	155	
11	Ванилин АС	1520	1650	4,81	152	151	194	
12	Анабазин	1530		4,85	133	162	163	
13	МДМА	1550	1790	4,92	58	135	193	
14	Кардиамин (Никетамид)	1550*	1535	4,93	106	177	78	
15	Пропранолол-М (нафтол) Ас	1595	1555	5,1	144	115	186	
16	Амобарбитал-2Ме	1610	1595	5,16	169	184	225	
17	Ибупрофен	1620	1615	5,2	163	161	206	
18	Метилэргонин Ас	1625	1595	5,22	82	182	241	
19	Пентобарбитал-2Ме	1640	1630	5,28	169	184	225	
20	Просидол-М(нор-)				116	102	58	1660[31]
21	Фенацетин	1705	1680	5,56	108	179	137	

22	Изониазид ТФА	1715		5,6	106	78	233	
23	Котинин	1720*	1715	5,61	98	176	175	
24	Парацетамол	1720	1780	5,61	109	151	80	
25	Метронидазол Ас	1720	1695	5,62	1680	1695	87	
26	Димедрол НУ Ас	1730	1700	5,65	165	167	226	
27	Галоперидол-М - 2Н ₂ О	1735	1650	5,67	189	191	154	
28	Амобарбитал (Барбамил)	1740*	1710	5,7	156	141	197	
29	МДМА ТФА	1755		5,75	154	162	289	
30	Пентобарбитал (Этаминал)	1770	1740	5,83	156	141	197	
31	Пирроксан артефакт	1775		5,85	163	190	135	
32	Промедол НУ-Ас	1785		5,89	186	201	261	
33	Парацетамол 2Ас	1805		5,97	109	151	235	
34	Мепробамат	1815		6,03	83	55	144	
35	Парацетамол Ас	1825	1770	6,07	109	151	193	
36	Пентобарбитал-М (ОН) 2Ме	1835	1820	6,13	169	184	223	
37	Гексабарбитал-Ме	1840	1085	6,16	235	169	250	
38	Промедол	1855*		6,27	186	201	275	
39	Кофеин	1860*	1820	6,27	194	109	193	
40	Фенобарбитал-2Ме	1870	1860	6,32	232	117	175	
41	Карбамазепин-М (акридин)	1880	1800	6,36	179	151	178	
42	Циклобарбитал-2Ме	1885	1845	6,4	235	169	236	
43	Трамадол-Н ₂ О	1890	1905	6,42	58	155	245	
44	Мебикар	1895		6,45	112	198	126	
45	Димедрол	1895	1870	6,45	58	165	167	
46	Кетамин	1895*	1835	6,47	180	182	209	
47	Гексабарбитал	1900	1855	6,47	221	157	236	
48	Тиопентал	1900	1855	6,47	172	157	242	
49	Просидол-НУ-Н ₂ О				172	158	173	1911 [31]
50	Лидокаин	1920	1875	6,57	86	120	234	
51	Трамадол-М (N- дезметил-) -Н ₂ О Ас	1940		6,68	258	58	273	
52	Оксспренолол	1940	1970	6,68	72	221	150	
53	Пентобарбитал-М2 2Ме	1945		6,7	169	184	225	
54	Доксиламин	1945	1920	6,7	58	71	180	
55	Дизопирамид артефакт	1950	1980	6,72	193	192	165	
56	Метронидазол-М(ОН- метил) 2Ас	1950	1870	6,72	87	229	271	
57	Клонидин 2Ме	1950		6,74	222	257	224	

58	Антипирин	1955	1845	6,76	188	96	105	
59	Бензокаин Ас	1965	1990	6,81	120	165	207	
60	Амидопирин	1965	1895	6,81	56	231	97	
61	МДМА Ас	1990	2140	6,94	58	162	100	
62	Манноза 5Ас	1995	2000	6,97	115	157	331	
63	Имипрамин-М(цикл-)	2000	1930	6,98	195	194	180	
64	Трамадол	2000	1945	6,99	58	263	135	
65	Глюкоза 5Ас	2005	2010	7,01	115	157	242	
66	Клонидин-Ме	2005		7,01	208	243	210	
67	Просидол -НУ				190	172	191	2005[31]
68	Трамадол-М(О-дезметил-)-Н2О Ас	2010	2000	7,05	58	115	273	
69	Теofilлин	2015	2025	7,06	180	95	68	
70	Циклобарбитал	2020	1970	7,11	207	141	208	
71	Фенобарбитал	2020*	1965	7,22	204	117	232	
72	Клонидин-Pr	2025		7,13	229	231	236	
73	Метамизол(Анальгин)	2055	1995	7,28	56	83	217	
74	Трамадол Ас	2060		7,32	58	188	305	
75	Карбамазепин-М/артифакт	2070	1990	7,37	193	192	165	
76	Прокаин	2070	2025	7,37	86	99	120	
77	Клонидин-2Pr	2070		7,39	194	236	278	
78	Циклизин	2070*	2045	7,4	194	165	265	
79	АХБ	2090*	2050	7,49	230	232	195	
80	Оксазепам артифакт 1	2100	2060	7,55	239	205	241	
81	Трамадол-М(О-дезметил-) Ас	2105	2080	7,57	58	205	291	
82	Атропин-Н2О	2105*	2085	7,59	124	140	271	
83	Фенотиазин	2115		7,65	199	167	198	
84	МХБ	2140*	2100	7,8	245	228	247	
85	Клонидин(Клофелин)	2155	2090	7,88	229	231	172	
86	Трамадол-М(О-дезметил-) 2Ас	2160		7,89	58	174	303	
87	Метопролол артифакт	2170	2120	7,95	264	279	278	
88	Дибазол	2170		7,97	207	208	103	
89	Карбамазепин-М/артифакт Ас	2175	2040	7,98	193	235	165	
90	Метадон	2175	2160	7,99	72	165	294	
91	Диклофенак-Н2О	2185	2135	8,04	214	242	277	
92	Просидол				172	246	173	2195[31]
93	Пропранолол	2205	2160	8,16	72	115	259	
94	Дизопирамид- М	2210		8,2	194	196	280	
95	Этофиллин-Ас	2220	2200	8,25	180	266	206	
96	Галопирамин	2225	2190	8,28	58	125	127	

	(Супрастин)							
97	Кетамин-Ас	2225	2170	8,29	216	208	251	
98	Клонидин Ас	2230*	2060	8,29	236	238	271	
99	Диклофенак-Ме	2230	2195	8,3	214	242	309	
100	Адифенин	2240*	2215	8,38	86	165	167	
101	Амитриптилин	2245*	2205	8,44	58	202	215	
102	Атропин	2255	2215	8,47	124	289	140	
103	АХБ-Вu	2260			254	282	256	
104	Нортриптилин	2260	2255	8,51	202	189	220	
105	Пропранолол-М (дезамино-ОН-) 2Ас	2265	2195	8,54	159	115	302	
106	Грамадол-М(ОН-) 2Ас	2270		8,57	58	174	363	
107	Амитриптилин-М (нор ₂ ОН-)-Н ₂ О ТФА	2275		8,58	231	230	357	
108	АХБ-Ас	2275	2245	8,6	230	232	273	
109	Миансерин	2275	2210	8,6	193	264	220	
110	Имипрамин(Имизин)	2275	2215	8,6	234	235	280	
111	АБХБ	2290		8,68	274	276	309	
112	МХБ Ас	2290	2260	8,7	244	228	246	
113	Триоксазин (Триметозин)	2295	2260	8,71	195	281	196	
114	Пентоксифиллин- М(дигидро-)-Н ₂ О	2295	2300	8,71	181	180	262	
115	Медазепам	2300*	2235	8,72	242	207	270	
116	Гексамидин (Примидон)	2300	2260	8,74	190	146	117	
117	Амитриптилин-М (ОН)-Н ₂ О	2300	2235	8,75	58	215	275	
118	Пропранолол артифакт	2310	2210	8,81	127	115	271	
119	Тригексифенидил (Циклодол)	2310*	2250	8,85	98	218	219	
120	Морфин-2НFB	2315*		8,9	464	677	465	
121	Метамизол-М Ас	2320	2270	8,86	56	245	203	
122	Маркаин(Бупивакаин)	2325	2260	8,88	140	141	84	
123	Прометазин (Дипразин)	2330	2270	8,92	72	180	284	
124	Клонидин-Вu	2350			194	230	284	
125	Атропин Ас	2360	2275	9,1	124	331	140	
126	Этилморфин ТФА	2365	2320	9,12	296	409	380	
127	Доксиламин-М(нор-) Ас	2370	2340	9,15	182	183	167	
128	Карбамазепин	2375	2285	9,18	236	193	192	
129	Метоклопрамид - ТФА	2380*		9,19	86	280	323	

130	Хлорпромазин-М(цикл-)	2395	2100	9,3	233	235	198	
131	Дифенин	2400	2350	9,33	180	252	223	
132	Кетамин-Вu	2400			180	244	236	
133	9-Тетрагидроканнабинол Me	2405	2360	9,35	313	328	285	2423 [30]
134	Оксазепам	2405	2320	9,38	268	239	270	
135	Клонидин 2Ac	2415	2315	9,43	236	238	313	
136	Метамизол-М 2Ac	2420	2280	9,47	56	245	287	
137	Бутадион	2420	2375	9,47	183	77	308	
138	Имипрамин-М(ОН-цикл) Ac	2425	2535	9,48	211	253	210	
139	Прокаин Ac	2425	2350	9,5	86	120	162	
140	Каннабидиол	2425	2400	9,5	231	246	314	
141	Динезин	2435*		9,54	86	298	180	
142	Бромгексин	2435	2375	9,56	264	293	305	
143	Трамадол-М (N-дезметил, ОН-)-H ₂ O 2Ac	2440		9,58	116	331	228	
144	Фенобарбитал-М (ОН-)Ac	2445	2360	9,6	248	219	220	
145	Амитриптилин-М (нор-) ТФА	2445		9,62	232	217	359	
146	Кодеин	2450*	2375	9,64	299	229	214	
147	Трамадол-М(O,N-дезметил-)-H ₂ O 2Ac	2465		9,74	86	186	301	
148	Пентоксифиллин-М(3-карбокси-) Me	2470		9,75	180	207	294	
149	АБХБ-Ac	2470		9,76	274	311	353	
150	АНБ	2470	2365	9,77	241	77	242	
151	Каннабинол Me	2475		9,78	309	310	324	2490 [30]
152	Карбамазепин-М(ОН-цикл) Ac	2485	2450	9,84	209	251	180	
153	Этилморфин	2485	2420	9,85	313	284	243	
154	Диазепам	2500*	2430	9,91	283	256	285	
155	Трамадол-М(O,N-дезметил,ОН-)2Ac	2500		9,95	114	319	276	
156	Морфин	2505	2455	9,98	285	215	268	
157	Пентоксифиллин	2515	2435	10,03	221	193	180	
158	АНБ Ac	2515	2400	10,03	241	242	284	
159	Атропин-Вu	2515			124	359	140	
160	Пентоксифиллин-М дигидро)	2525	2505	10,1	180	193	280	
161	Тригексифенидил-М1	2525		10,1	98	281	346	
162	Верапамил-М (дезалкил) Ac	2530	2460	10,11	247	289	332	

163	9-Тетрагидроканнабинол	2530	2470	10,11	299	314	231	
164	Каннабинол-Ас	2540	2540	10,17	337	295	352	
165	Дизопирамид	2540	2490	10,18	195	212	239	
166	Хлорпромазин	2560*	2500	10,29	58	272	318,1	
167	Хлорпротиксен	2560	2510	10,29	58	221	255	
168	Тригексифенидил-М (ОН-)-Н ₂ О Ас	2565	2505	10,33	200	98	341	
169	Кодеин-Ас	2580*	2500	10,35	341	282	342	
170	Левомепромазин	2580*	2540	10,4	58	328	228	
171	3-Моноацетилморфин	2580	2500	10,41	327	285	215	
172	Тригексифенидил-М2	2580		10,41	98	218	219	
173	Хлордиазепоксид-М (дезоксо)	2580	2535	10,42	282	283	284	
174	Нордазепам	2585	2520	10,43	242	269	271	
175	Пентоксифиллин-М (дигидро-) Ас	2585	2560	10,45	180	181	322	
176	6-моноацетилморфин	2590	2535	10,48	327	268	215	
177	Каннабинол	2600	2555	10,52	295	238	296	
178	Этилморфин Ас	2605*	2530	10,57	355	296	356	
179	Пропранолол 2Ас	2640	2605	10,76	200	115	201	
180	Тригексифенидил-М3	2645		10,79	98	218	219	
181	Прометазин-М(нор-) Ас	2660	2540	10,87	212	180	312	
182	Имипрамин-М(ОН-) Ас	2665	2610	10,9	251	293	338	
183	Кодеин Pro	2665*		10,85	355	282	229	
184	Хлороквин	2665*	2595	10,89	86	205	319	
185	Имипрамин-М(ОН-) Ас	2665	2610	10,9	251	293	338	
186	Миансерин-М(НО-) Ас	2670	2580	10,92	209	322	278	
187	Триметоприм	2675	2590	10,95	290	259	275	
188	Алимемазин -М (ОН-) Ас	2674	2600	10,95	58	356	269	
189	Хлорпромазин-М (дезалкил-, ОН-) 2Ас	2685		11	232	333	335	
190	Амитриптилин-М (ОН-) Ас	2690	2500	11,03	116	220	335	
191	Этилморфин -Pro	2700*		11,04	369	296	340	
192	Амитриптилин-М2 Ас	2690		11,05	116	217	333	
193	Героин	2695*	2620	11,08	327	369	268	
194	Амитриптилин-М3 Ас	2710		11,16	217	215	319	
195	Тригексифенидил-М (ОН-) Ас	2715	2635	11,17	98	218	219	
196	Клозапин-ТФА	2725		11,25	352	323	365	

197	Хлорпромазин-М (ОН-) изомер 2 Ас	2730		11,26	58	291	376	
198	Перметрин (цис-)	2745	2640	11,35	183	127	390	
199	Налоксон	2750	2715	11,39	327	328	242	
200	Трифтазин	2755	2690	11,4	407	306	280	
201	Кодеин-Вu	2755			369	282	222	
202	Имипрамин-М(нор-)Ас	2760	2670	11,45	208	193	308	
203	Перметрин (транс-)	2760	2670	11,45	183	127	390	
204	11-нор-9-ТГК 2Ме	2765	2620	11,45	313	357	372	2779 [30]
205	Клозапин-М2 ТФА	2770		11,49	240	352	536	
206	Феназепам	2775*		11,52	350	321	348	
207	Ацетопромазин	2775	2755	11,53	58	280	326	
208	Пентоксифеллин-М (дигидрокси-) изомер2 2Ас	2775	2680	11,53	181	251	380	
209	Фентанил	2780	2720	11,55	245	146	189	
210	Этилморфин Вu	2785*		11,6	383	296	354	
211	Пентоксифеллин-М (дигидрокси-) изомер1 2Ас	2800		11,68	181	251	380	
212	Хинин Ас	2825		11,8	136	188	307	
213	Нитразепам	2840*	2760	11,86	280	253	264	
214	Триметоприм изомер1 Ас	2845	2700	11,9	332	289	275	
215	Хлорпромазин-М(ОН-)изомер4 Ас	2865		12	58	376	288	
216	Левомепромазин-М (ОН-) Ас	2865	2745	12	58	386	244	
217	Налоксон-2Ас	2865	2750	12	369	411	352	
218	Клозапин-М(нор-) 2ТФА	2880		12,08	352	504	407	
219	Налоксон 3Ас	2880	2770	12,09	411	453	394	
220	Хлорпромазин-М(ОН-) изомер3 Ас	2880		12,1	58	376	288	
221	Хинин	2880		12,1	136	117	137	
222	Героин-М(6-МAM) Вu	2885			327	397	268	
223	Морфин 2 Pro	2885*		12,09	341	397	324	
224	Тиаприд	2895	2820	12,16	86	213	256	
225	Папаверин	2900*	2820	12,23	338	324	308	
226	Пентоксифеллин-М2 2Ас	2910		12,27	180	265	380	
227	p-иодоклонидин-PFB	2925			480	353	482	
228	Клозапин Ас	2945	2870	12,45	298	312	368	
229	Индометацин Ме	2935	2770	12,4	139	141	371	

230	Хлорпромазин-М (ОН-) изомер1 Ас	2940		12,44	58	86	376	
231	Папаверин-М изомер1 Ас	2945		12,46	310	324	367	
232	Клозапин	2970*	2895	12,63	243	256	258	
233	Сахароза 8Ас	2985	2950	12,7	115	157	242	
234	Клозапин-PrO	3010			312	325	382	
235	Папаверин-М изомер 4 Ас	3020		12,89	324	310	367	
236	Хлорпромазин-М (бис-нор-) Ас	3030	2990	12,96	100	332	232	
237	Клозапин Ви	3050			326	339	328	
238	Фенолфталеин -2Ме	3050		13,11	271	302	346	
239	Морфина 2Ви	3055			355	268	425	
240	Хлорпромазин-М (нор-) Ас	3065	3070	13,2	114	232	346	
241	Триметоприм изомер2 Ас	3070	2880	13,24	332	259	275	
242	Галоперидол	3080	2940	13,3	224	237	226	
243	Морфин-М(нор-) 3Ас	3080	2960	13,3	209	355	397	
244	Тофизопам (Грандаксин)	3100	3020	13,43	326	382	341	
245	Холестерин	3160*	3085	13,71	386	368	43	
246	Циннаризин	3160*	3040	13,86	201	117	251	
247	Имипрамин-М(нор-,ОН-) 2Ас	3160	3070	13,88	114	266	366	
248	Токоферол Ас	3160	3070	13,9	430	472	165	
249	Триметоприм 2Ас	3180	3000	14,06	374	317	359	
250	Клозапин-М(ОН-) изомер1 2Ас	3220	2980	14,36	256	314	426	
251	Тиоридазин	3225*	3125	14,37	98	370	244	
252	Верапамил	3235	3150	14,51	303	304	151	
253	Холестерина ацетат	3245		14,62	368	369	353	
254	Стрихнин	3265*		14,7	334	335	162	
255	Хлорпромазин-М (2ОН-) 2Ас	3275		14,85	58	433	392	
256	Клозапин-М(ОН-) изомер2 Ас	3315	3050	15,23	259	314	384	
257	Верошпирон	3345*		15,54	267	340	325	
258	Перициазин	3385*	3265	15,95	114	223	365	
259	Клозапин-М(ОН-) изомер3 2Ас	3395		16,1	298	426	428	
260	Клозапин-М(нор-) 2Ас	3440	3490	16,64	396	310	298	
261	Хлорпромазин-М(нор,ОН-) 2Ас	3465		17	114	404	248	

262	Клозапин-М(нор-) Ас	3490	3650	17,3	354	243	192	
263	Клозапин-М2	3505		17,49	298	242	396	
264	Холестерин-Вu	3510		17,6	368	353	369	
265	Бупренорфин Ас	3530*	3410	17,8	420	452	509	
266	Клозапин-М3	3540		17,97	374	269	376	
267	Бупренорфин PrO	3640*		19,33	434	466	523	

Примечание - Индексы удерживания, помеченные * получены усреднением значений R_I по двум хроматографическим режимам на фазе НР-5.

Приложение 2

!-----macro fale narc1.mac-----

! Макрокоманда для иллюстрации поиска анализируемых

! соединений по реконструируемым хроматограммам

name acyl1

file

tic ,ro

format merged

initthresh 10

tlow=4.4

thigh=5.2

chr tlow:thigh,86,118,177

integrate x,tlow:thigh

dr 5

IN1

annotate 5,0,ii,t,"Амфетамин Ас"

exc x,r1

tlow=4.7

thigh=5.5

chr tlow:thigh,58,100,117

integrate x,tlow:thigh

dr 6

IN1

annotate 6,0,ii,t,"Метамфетамин Ас"

exc x,r2

tlow=5.8

thigh=6.4
chr tlow:thigh,58,100,148
integrate x,tlow:thigh
dr 7
IN1
 annotate 7,0,ii,t,"Эфедрин 2Ac"
exc x,r3
tlow=4.9
thigh=5.5
chr tlow:thigh,82,182,241
integrate x,tlow:thigh
dr 8
IN1
 annotate 8,0,ii,t,"Метилэжгонин Ac"
exc x,r4
tlow=5.6
thigh=6.2
chr tlow:thigh,186,201,261
integrate x,tlow:thigh
dr 9
IN1
 annotate 9,0,ii,t,"Тримепиридин- НУ Ac"
exc x,r5
tlow=6.6
thigh=7.3
chr tlow:thigh,58,162,100
integrate x,tlow:thigh
dr 10
IN1
 annotate 10,0,ii,t,"МДМА Ac"
exc x,r6
tlow=7.0
thigh=7.6
chr tlow:thigh,58,188,305

integrate x,tlow:thigh
dr 11
IN1
 annotate 11,0,ii,t,"Трамадол Ас"
exc x,r7
tlow=7.7
thigh=8.3
chr tlow:thigh,72,165,294
integrate x,tlow:thigh
dr 12
IN1
 annotate 12,0,ii,t,"Мегадон"
exc x,r8
tlow=8.0
thigh=8.6
chr tlow:thigh,216,208,251
integrate x,tlow:thigh
dr 13
IN1
 annotate 13,0,ii,t,"Кетамин Ас"
exc x,r9
tlow=10.0
thigh=10.7
chr tlow:thigh,341,282,342
integrate x,tlow:thigh
dr 14
IN1
 annotate 14,0,ii,t,"Кодеин Ас"
tlow=10.2
thigh=10.9
chr tlow:thigh,355,296,356
integrate x,tlow:thigh
dr 15
IN1

```
    annotate 15,0,ii,t,"Этилморфин Ас-ISTD"  
tlow=10.8  
thigh=11.4  
chr tlow:thigh,327,369,310  
integrate x,tlow:thigh  
dr 16  
IN1  
    annotate 16,0,ii,t,"Морфин 2Ас"  
return
```

```
name IN1 "Integretion"  
getscalars ,x[1]  
t=0.8*Yhigh  
ii=(tlow+0.2)*60000  
return
```

Для отзывов и замечаний

454076, Челябинск, медгородок
Областное бюро судебно-медицинской
экспертизы, химическое отделение
Мелентьеву А.Б.