

---

**Министерство здравоохранения Челябинской области**  
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения  
**«ЧЕЛЯБИНСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО  
СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»**

**МЕТОДИКА СКРИНИНГА ЛЕКАРСТВЕННЫХ, НАРКОТИЧЕСКИХ  
ВЕЩЕСТВ И ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ГХ-МС ИЗ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ  
ТРУПОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПО  
ТЕХНОЛОГИИ “QuEChERS”.**

**Челябинск  
2013**

«Методика скрининга лекарственных, наркотических веществ и пестицидов методом ГХ-МС из органов и тканей трупов с использованием пробоподготовки по технологии QuEChERS»// Челябинск, ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», 2013, 9 с.

### **АННОТАЦИЯ**

Настоящая методика предназначена для проведения скрининга лекарственных, наркотических, психотропных веществ, а также фосфорорганических веществ и некоторых пестицидов методом ГХ-МС из экстрактов внутренних органов и тканей. Для экстракции анализируемых веществ используется технология QuEChERS (“Кэтчерс” в произношении) основанная на извлечении аналитов в органический растворитель и очистке экстрактов на сорбентах для их последующего анализа приборными методами.

**Методика разработана экспертами судебно-химического отделения ЧОБСМЭ, к.х.н. Мелентьевым А.Б. и Латышевой Г.А.**

**Рецензент: Заведующий судебно-химическим отделением \_\_\_\_\_**

**Одобрено на заседании методического совета Челябинского областного бюро судебно – медицинской экспертизы, протокол № \_\_\_ от « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.**

## **1. Назначение и область применения**

Настоящая методика предназначена для проведения экспресс-скрининга лекарственных, наркотических, психотропных веществ, а также фосфорорганических веществ и некоторых пестицидов методом ГХ-МС из экстрактов внутренних органов и тканей, полученных по технологии «QuEChERS».

## **2. Метод измерений**

В основе методики лежит метод скрининга лекарственных, наркотических, психотропных веществ, а также фосфорорганических веществ и некоторых пестицидов методом ГХ-МС. Идентификация труднолетучих и наиболее часто употребляемых наркотических и лекарственных веществ основного характера производится в виде ацелированных производных, веществ кислотного и нейтрального характера, метаболитов ФОСов и пестицидов в виде метилированных производных. Изменения, которые вносятся настоящей методикой, относятся к способу получения экстрактов из внутренних органов и тканей. Экстракты из органов и тканей получают по методу «QuEChERS», то есть экстракцией тканей органическим растворителем (ацетонитрилом) и последующий очисткой на неполярном пористом сорбенте.

## **3. Средства измерения.**

- 3.1. Газовый хроматограф 6890 с автосамплером 7683В и масс-селективным детектором 5975В фирмы Agilent Tehnologies.
- 3.2. Колонка хроматографическая капиллярная HP-5MS 30 м\*0,25 мм\*0,25 мкм.
- 3.3. Микрошприц хроматографический объемом 10 мкл для автосамплера. Кат. № 5181-1267 (Agilent).
- 3.4. Весы аналитические ВЛР-200 или аналогичные.

- 3.5. Весы технические ВЛТ-150.
- 3.6. Пипетки дозаторы объемом 5-50 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл фирмы ВЮНИТ или аналогичные по точности с наконечниками для них.

#### **4.       Вспомогательное оборудование**

- 4.1. Ультразвуковая ванна Elmasonic S30.
- 4.2. Термоблок или термостат с максимальной температурой 100<sup>0</sup>С.
- 4.3. Центрифуги лабораторные со скоростью вращения 4000 об/мин и роторами для пробирок диаметром 30 и 17 мм.
- 4.4. Встряхиватель АВУ-6с или аналогичный.
- 4.5. Холодильник бытовой с морозильной камерой для хранения проб.
- 4.6. Компрессор воздушный КВ-1 или подобный.
- 4.7. Шкаф вытяжной.
- 4.8. Колба мерная 2 кл. точности емкостью 25 мл.

#### **5.       Материалы и реактивы.**

- 5.1. Наборы VetexQ Тох фирмы «ИнтерЛаб», содержащие полипропиленовые центрифужные пробирки емкостью 50 мл, пакеты со смесью солей для экстракции, пробирки со смесью для очистки емкостью 10 мл, в коробке по 25 штук.
- 5.2. Виалы для автосамплера Кат. № 5183-2030 (Agilent) с крышками.
- 5.3. Ацетонитрил «ч».
- 5.4. Этанол 95 %, ФС 42-3072-94.
- 5.5. Метанол «хч».
- 5.6. Хлористоводородная кислота конц «чда».
- 5.7. Бутилацетат «хч».
- 5.8. Этилацетат обезвоженный «хч».
- 5.9. Уксусный ангидрид «ч».
- 5.10. Пиридин «чда», обезвоженный и перегнанный.

- 5.11. Иодметан 99,5% фирмы «Sigma – Aldrich».
- 5.12. Циклизина гидрохлорид, фирмы «ICN Biomedicals».
- 5.13. Этилморфина гидрохлорид ФС 42-2268-84.
- 5.14. Гексобарбитал ФС 42-8198-03.
- 5.15. Сорбент Bondesil C18 40 мкм.

## **6. Требования безопасности**

- 6.1. При подготовке объектов к анализу и выполнении анализов необходимо соблюдать требование техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76.
- 6.2. Помещение, в котором производится подготовка объектов для анализа должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных по ГОСТ 12.1.005-88.
- 6.3. Удаление растворителей и избытка реагентов после дериватизации должно производиться в вытяжном шкафу.
- 6.4. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.83.
- 6.5. При эксплуатации всех приборов и аппаратов, имеющих электропитание, необходимо соблюдать требования ГОСТ 12.1.019-79 (Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты).

## **7. Подготовка к выполнению измерений**

- 7.1. *Приготовление стандартных растворов внутренних стандартов:*  
Стандартный раствор дионина (этилморфина г/х) с концентрацией 10 г/л готовится растворением порошка дионина 50 мг в 3 мл этанола с добавлением 2 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, подписывается

(Этилморфина г/х - 10 г/л, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Стандартный раствор циклизина с концентрацией 1 г/л (в пересчете на основание) готовится растворением 28,5 мг циклизина г/х в 25 мл метанола, подписывается (Циклизин – 1 г/л в MeOH), дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Стандартный раствор гексобарбитала с концентрацией 10 г/л готовится растворением 50 мг гексобарбитала в 5 мл метанола, подписывается (Гексобарбитал – 10 г/л в MeOH, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Срок годности стандартных растворов, хранимых в холодильнике 1 год. Навески порошков берутся на аналитических весах с точностью до 0,1 мг, растворитель отмеряется цифровой пипеткой или мерной колбой на 25 мл.

#### *7.2. Приготовление рабочего раствора смеси внутренних стандартов:*

Рабочий раствор, состоящий из смеси внутренних стандартов с концентрацией 0,1 г/л этилморфина г/х, циклизина, гексобарбитала приготавливается по мере надобности добавлением 25 мкл стандартного раствора этилморфина г/х (10 г/л), 250 мкл циклизина (1 г/л), 25 мкл гексобарбитала (10 г/л) в мерную колбу на 25 мл и заполнением до метки этанолом (метанолом). Смесь переливается во флакон из темного стекла и подписывается "Смесь В.С. для метода QuEChERS" и дата приготовления. Рабочий раствор хранится в холодильнике не более 1 месяца.

### **8. Подготовка проб органов и тканей к ГХ-МС анализу.**

5 г средней пробы печени (или другого органа) тщательно измельчаются и помещаются в центрифужную пробирку объемом 50 мл из набора VetexQ (или во флакон емкостью 15 мл), добавляется 50 мкл смеси внутренних стандартов (циклизина, этилморфина, гексобарбитала по 0,1 г/л) и 5 мл ацетонитрила, к содержимому пробирки добавляется 100 мкл

концентрированной соляной кислоты и смесь солей для экстракции из наборов VetexQ Tox. После перемешивания содержимого, пробирка помещается в ультразвуковую ванну на 20 мин. Далее образец центрифугируется при 4000 об/мин в течение 10 мин и верхний (органический) надосадочный слой в количестве 3-3,5 мл экстракта переносится в пробирку со смесью для очистки. Содержимое пробирки тщательно перемешивается и встряхивается в течение 10 мин на встряхивателе, центрифугируется при 4000 об/мин в течение 10 мин.

Для получения ацетилированных производных 1,0 мл экстракта переносится в автосамплерную виалу, растворитель испаряется в потоке воздуха при 40-50 С досуха. К сухому остатку добавляется 50 мкл смеси уксусного ангидрида с пиридином 3:2 и нагревается в термоблоке в течение 20 мин при 80°C. Избыток реагентов удаляется при 40°C в потоке воздуха досуха, к сухому остатку добавляется 400 мкл бутилацетата.

Для получения метилированных производных 1,0 мл экстракта объекта переносится во флакон, добавляется 20-25 мг безводного карбоната калия, 80 мкл йодметана. Смесь нагревается при температуре 60°C в течение 30 мин. Избыток реактивов удаляется в потоке воздуха и проба реконструируется в 400 мкл этилацетата. После 5 мин выдержки органический слой объекта переносится в автосамплерную виалу.

## **9. Условия ГХ-МС анализа экстрактов.**

Виалы с дериватизированными экстрактами помещаются в лоток автосамплера. Режимы работы хроматографа и масс-спектрометра: Вводимый объем образца 1 мкл. Ввод пробы без деления потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:15 (Split/Splitless). Промывка шприца изопропанолом до и после ввода пробы по 5 раз. Программирование температуры: начальная температура колонки 80°C (выдержка в течение 1,0 мин), подъем температуры со скоростью 40 град/мин

до 200°C и дальнейшее увеличение температуры со скоростью 12,5 град/мин до 300°C выдержкой при конечной температуре в течение 6 мин. Газ-носитель гелий, режим постоянного потока 1,4 мл/мин. Температура инжектора 260°C, устройства сопряжения с детектором 280°C. Энергия ионизации 70 eV. Температура источника ионов 230°C, квадруполя 150°C. Напряжение на электронном умножителе на 100 вольт выше «Autotune». При анализе ацетилованных экстрактов масс-селективной детектор работает в режиме сканирования ионов от 50 до 550 а.е.м. с задержкой на выход растворителя 4 мин. При анализе метилированных экстрактов масс-селективной детектор работает в режиме сканирования ионов от 40 до 450 а.е.м. с задержкой на выход растворителя 3 мин.

#### **10. Обработка хроматограмм экстрактов для поиска пиков токсикантов.**

Поиск пиков потенциальных токсикантов на хроматограммах экстрактов проводится в программе “AMDIS” с использованием библиотеки масс-спектров **mel.msp**. Предпочтительные настройки программы “AMDIS”:

##### **Analysis Settings**

- Minimum match factor – **60**
- Multiple Identification: **On**
- Type analysis - **Use Retention Index Data**
- RI window – **20 + 1 \*0,01RI**
- Match Factor Penalties: Level – **Weak**; Maximum Penalties - **20**; No RI in Library – **10**.

##### **Deconvolution**

- Component width – **20**
- Adjacent Peaks subtraction - **One**
- Resolution - **Medium**
- Sensitivity - **Medium**



- **Shape Requirement – Medium**

Настройки фильтров деконволюции могут меняться оператором в зависимости от состояния хроматографической системы.

Целевой поиск пиков наиболее часто встречающихся в экспертизах наркотических, психотропных веществ, их метаболитов и дериватов по их характеристическим ионам может быть произведен с помощью макрокоманд, реализованных на языке машинной станции и входящих в группу макрокоманд с именем файла «*urine.msc*» для ацетилированных производных и “*n2.msc* “ для метилированных производных. В случае обнаружения пиков потенциальных токсикантов по характеристическим ионам в макрокомандах, но не подтвержденных идентификацией по полным масс-спектрам в рапорте AMDIS, необходимо попытаться получить полные масс-спектры при ручной обработке. Только при удовлетворительной идентификации по полным масс-спектрам токсикант может быть признан идентифицированным.

#### **10. Контроль качества результатов при реализации методики в лаборатории.**

Внутренний контроль качества полученных результатов осуществляется по надежности идентификации (по рапорту AMDIS или библиотечному рапорту программы Enhanced Data Analysis) пиков внутренних стандартов. В экстракте после ацетилирования с вероятностью не менее 60% должны быть идентифицированы циклизин и ацетилированное производное этилморфина, а в метилированном экстракте циклизин и метиловый эфир гексобарбитала. При неудовлетворительной идентификации хотя бы одного из перечисленных стандартов рекомендуется провести повторный анализ хроматограммы с использованием других настроек фильтров деконволюции программы AMDIS. Если изменение параметров обработки не привели к удовлетворительной идентификации стандартов, выводы об отсутствии наркотических и психотропных веществ в анализируемых объектах сделать

нельзя. При этом, если нет возможности провести анализ другими методами, делается вывод: «В связи с (резкими гнилостными изменениями, недостаточным количеством биоматериала или др.) провести анализ материала от трупа ..... на наличие наркотических и психотропных веществ не представляется возможным». В случае обнаружения пиков потенциального токсиканта и/или его метаболитов при недостаточной достоверности идентификации рекомендуется из остатков экстракта на сорбенте после стадии очистки провести повторный анализ с получением других производных (TFA, PFP или TMS) для подтверждения идентификации и количественного определения токсиканта в биологической пробе.

#### **11. Рекомендации по подготовке проб с гнилостными изменениями**

При подготовке проб биологических тканей с резкими гнилостными изменениями рекомендуется на стадии очистки дополнительно добавить к смеси для очистки около 100 мг сорбента Bondesil C18 40 мкм. Это улучшит очистку экстракта от жирных кислот и обеспечит, в большинстве случаев, требуемое для анализа качество экстракта для идентификации потенциальных токсикантов.