

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Кубанский государственный университет»

На правах рукописи



Темердашев Азамат Зауалевич

ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В АНАЛИТИЧЕСКОЙ
ТОКСИКОЛОГИИ И ДОПИНГ-КОНТРОЛЕ

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Краснодар – 2021

Оглавление

| | |
|--|-----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| Введение..... | 7 |
| 1 Литературный обзор | 11 |
| 1.1 Определение природных и синтетических наркотических и психоактивных веществ в растительных материалах и лекарственных формах | 11 |
| 1.1.1 Определение природных наркотических средств в растительном сырье и лекарственных препаратах | 15 |
| 1.1.2 Классификация и идентификация синтетических наркотических средств | 27 |
| 1.1.3 Определение синтетических наркотических средств в коммерчески реализуемых продуктах..... | 35 |
| 1.1.4 Определение запрещенных препаратов в биологически активных добавках и продуктах питания..... | 42 |
| 1.2 Анализ биологических жидкостей | 48 |
| 1.2.1 Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов..... | 48 |
| 1.2.2 Определение фармацевтических препаратов («аптечных наркотиков»)..... | 60 |
| 1.2.3 Определение синтетических наркотических средств..... | 67 |
| 1.2.4 Определение природных наркотических и психоактивных веществ | 78 |
| 1.2.5 Определение рилизинг-пептидов гормона роста..... | 91 |
| 1.2.7 Определение катехоламинов..... | 109 |
| 1.3 Применение масс-спектрометрии высокого разрешения при проведении скрининга в анализе биологических жидкостей и растительного сырья | 114 |
| 1.4 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования..... | 118 |
| 2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов..... | 121 |
| 2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование | 121 |
| 2.2 Определение опиных алкалоидов на семенах мака пищевого | 125 |
| 2.3 Определение атропина и скополамина в дурмане индийском | 138 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.4 | Определение некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения | 151 |
| 2.5 | Оптимизация условий скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения | 164 |
| 2.6 | Определение запрещенных соединений в продуктах питания, БАД и спортивном питании | 182 |
| 2.7 | Определение мельдония в молоке и мясе | 194 |
| 2.8 | Определение некоторых «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях | 201 |
| 2.9 | Определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче | 217 |
| 2.10 | Определение мельдония в моче | 228 |
| 2.11 | Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче с использованием твердофазной экстракции | 234 |
| 2.12 | Определение стероидных гормонов в моче с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции | 243 |
| 2.13 | Применение твердофазной аналитической дериватизации для определения катехоламинов в моче | 253 |
| 2.14 | Определение некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях с использованием методов целевого и нецелевого скрининга | 257 |
| 2.15 | Поиск метаболитов ноотропного препарата унифирама в режиме нецелевого скрининга с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения | 267 |
| | Выводы | 279 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ 1 | 356 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ 2 | 357 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ 3 | 358 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ 4 | 359 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НС – наркотическое средство

ПВ – психоактивное вещество

ТГК – тетрагидроканнабинол

ТГК-СООН – тетрагидроканнабиноловая кислота

КБН – каннабинол

КБД – каннабидиол

КБГ – каннабигерол

КБД-СООН – каннабидиоловая кислота

КБГ-СООН – каннабигероловая кислота

у/з – обработка ультразвуком

КЗЭ-УФ – капиллярный зонный электрофорез со спектрофотометрическим детектированием

КЗЭ-ЭХЛ – капиллярный зонный электрофорез с электрохемолюминисцентным детектированием

ВЭЖХ-ДМД – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодно-матричным детектированием

ВЭЖХ-ФЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием

ВЭЖХ-ХЛД – высокоэффективная жидкостная хроматография с хемолюминисцентным детектированием

ВЭТСХ-денситометрия – высокоэффективная тонкослойная хроматография с денситометрическим детектированием

ЭРИ – электрораспылительная ионизация

ХИАД – химическая ионизация при атмосферном давлении

DAPPI – источник для прямого анализа с помощью фотоионизации при атмосферном давлении

ЭИ – электронная ионизация

Q – квадруполь

IT – ионная ловушка
QqQ – тройной квадруполь
СИП – спектрометрия ионной подвижности
ТЭА – триэтиламин
ДДСН – додецилсульфат натрия
ФБ – формиатный буферный раствор
УВЭЖХ-МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография–масс спек-
трометрия
ТОF – времяпролетный масс-спектрометр
ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
ТФЭ – твердофазная экстракция
Q-Trap – тройной квадруполь с функцией линейной ионной ловушки
для третьего квадруполя
QqTOF – гибридный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр
Orbitrap – орбитальная ловушка
Скан – режим полного сканирования
ММР – мониторинг множественных реакций
МС/МС, МС2 – тандемная масс-спектрометрия
МВР – мониторинг выбранной реакции
МВИ – мониторинг выбранных ионов
ТФЭ–ТД – твердофазная экстракция с термодесорбцией
ТЭА – триэтиламин
D1PT – N,N-диизопропилтриптамин
DPT –N,N-дипропилтриптамин
5-АсО-D1PT – 5-ацетокси-N,N-диизопропилтриптамин
5-МеО-M1PT – 5-метокси-N,N-метилизопропилтриптамин
5-МеО-DPT – 5-метокси-N,N-дипропилтриптамин
5-МеО-D1PT – 5-метокси-N,N-диизопропилтриптамин
5-МеО-DMT – метокси-N,N-диметилтриптамин
АМТ – α-метилтриптамин

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохимический анализ

ЭХД – электрохимический детектор

NPD – азот-фосфорный детектор

ФЛД – флуориметрический детектор

ТГК-СООН-Glu – глюкуронид 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловой кислоты

HDMS – гексаметилдисилазан

MBHFBA – метил-бис(гептафлуоробутирамид)

DLLME – дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция

DTT – дитиотреитол

INC – изоникотиноил хлорид

НФИ – источник нагреваемой фотоионизации

PFOC – пентафтороктаноил хлорид

ТМАН – тетраметиламмония гидроксид

NBD-Cl – 4-хлор-7-нитробензофуран

Актуальность работы.

Психоактивные, сильнодействующие и наркотические вещества были известны с глубокой древности и использовались в лекарственных и иных целях. С начала 60-х гг. наблюдается рост активности исследований в области синтеза новых соединений, отсутствующих в природе, но имеющих некоторое структурное подобие нейромедиаторам и природным психоактивным соединениям. Вне зависимости от степени воздействия на организм, большинство соединений, относящихся к природным и синтетическим наркотикам, психоактивным веществам, являются опасными и подлежат контролю [1–12].

В период с 2008 по 2016 гг., стремительно выросла популярность синтетических наркотических средств, так называемых «дизайнерских наркотиков». Это было обусловлено их доступностью и легальностью на момент распространения, что позволило им быстро выйти на уровень уже известных наркотических средств и даже превзойти их. Известные под названиями «Спайс», «соли» и «удобрения» они продавались через интернет, в магазинах, реализующих табачную продукцию и даже в мини-маркетах на заправочных станциях [13–17].

С 2000-х годов подавляющее большинство исследований, посвященных вопросам аналитической токсикологии, допинг-контроля и криминалистики, решаются методами хроматомасс-спектрометрии и тандемной масс-спектрометрии. Наиболее распространенным методом определения наркотических и психоактивных средств в различных средах, на сегодняшний день, является газовая хроматомасс-спектрометрия. Но данный метод имеет ряд существенных ограничений, не позволяющих проводить исследования новых сильнодействующих веществ и допинг-агентов, делая, таким образом, актуальным комбинирование методов жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии в сочетании с новыми методами пробоподготовки в целях проведения исследования в различных объектах [5, 7, 18]. Развитие методов хроматомасс-спектрометрии привело к возникновению и

распространению целого ряда направлений, наиболее перспективным из которых является развитие масс-спектрометрии высокого разрешения.

Существует большое количество нормативных документов [1–4] и научных публикаций [5–12], посвященных выделению и определению действующих веществ в растительном сырье и лекарственных формах. С другой стороны, актуальной представляется создание методологии комплексного подхода к анализу наркотических, психоактивных веществ и современных допинг - агентов для решения задач криминалистики, аналитической токсикологии и допинг-контроля. Учитывая, что большинство современных наркотических соединений успешно применяются в качестве допинг-агентов (стимуляторы, анаболики и др.), методология должна отвечать не только требованию скрининга широкого круга известных веществ, но и использоваться при проведении исследований по типу поиска «неизвестного в частично известном» или «неизвестного в неизвестном» с достаточно высокой чувствительностью. Такая методология может быть использована и в допинг-контроле, а также при изучении метаболизма новых ксенобиотиков.

Диссертационное исследование выполнялось в рамках реализации проектов Госзаданий Минобрнауки РФ (№ 4.873.2014/К и № 4.2612.2017/ПЧ) и РФФИ (15-03-02453 А, 14-03-31015 мол_а и 18-33-20009 мол_а_вед) с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

Разработанные методики используются в экспертно-криминалистическом центре Главного управления МВД России по Краснодарскому краю и бюро судебно-медицинской экспертизы г. Краснодара.

Разработанная методика определения мельдония в моче с использованием УВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в режиме гидрофильной хроматографии валидирована, метрологически аттестована (МИ 02067847.02-2017 "Определение мельдония в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием") и внесена в Федеральный реестр аттестованных методик (методы) измерений ФР.1.31.2018.29251.

Методика определения мельдония в молоке использовалась для проведения исследования в рамках урегулирования спора с РУСАДА в целях демонстрации возможности контаминации продуктов питания запрещенными веществами. Исследование выполнено в рамках обращения юридической группы «КлеверКонсалт».

Целями диссертационного исследования являлись:

1. Разработка методологии комплексного анализа объектов биологического, растительного и синтетического происхождения с целью выявления и определения наркотических и психоактивных средств, а также их метаболитов.

2. Обоснование и реализация методов целевого и нецелевого скрининга, новых подходов пробоподготовки и мониторинга при изучении стероидного и катехоламинового профиля, метаболизма новых ксенобиотиков в организме человека.

3. Разработка подходов к анализу наркотических средств природного и синтетического происхождения в биологических жидкостях человека с использованием подходов целевого и нецелевого скрининга

Для достижения поставленных целей решались следующие задачи:

- возможности и ограничения методологии нецелевого скрининга в аналитической токсикологии и проведении исследований метаболизма новых ксенобиотиков;

- оценка возможности применения методологии нецелевого скрининга для контроля качества спортивного питания, биологически активных добавок и продуктов питания;

- возможности твердофазной аналитической дериватизации при разработке пробоподготовки биологических жидкостей;

- возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для извлечения веществ различных классов соединений на примере селективных модуляторов андрогенных рецепторов и стероидов;

- изучение проблем идентификации основных классов наркотических, психоактивных средств и новых допинг-агентов, а также подходов их определения в различных объектах;

- анализ подходов и решений скрининга и количественного определения наркотических средств, оптимизация условий пробоподготовки при их определении, изучение матричных эффектов.

В настоящей работе рассмотрены вопросы нецелевого и целевого скрининга и определения наиболее распространенных наркотических, психоактивных веществ и современных допинг-агентов методами жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии. Изучены особенности применения дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции и твердофазной аналитической дериватизации для целей пробоподготовки мочи и спортивного питания. Изучены возможности различных вариантов нецелевого скрининга при изучении метаболизма ксенобиотиков и для целей аналитической токсикологии.

Определены индексы удерживания и основные характеристичные ионы изученных наркотических средств при проведении ГХ-МС анализа. Для всех соединений установлено MRM переходы при УВЭЖХ-МС/МС определении соединений, которые, в сочетании с данными по временам их удерживания и результатами хроматомасс-спектрометрического определения позволяют определить следовые количества веществ.

Разработаны методики скрининга и определения некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения, включая новые, «дизайнерские» катионы и синтетические каннабиноиды, отвечающие требованиям экспрессности, точности и надежности.

1 Литературный обзор

1.1 Определение природных и синтетических наркотических и психоактивных веществ в растительных материалах и лекарственных формах

Психоактивные вещества известны с глубокой древности. Первые упоминания об использовании в медицинских целях конопли (каннабиса) встречаются в источниках, относящимся к древнему Китаю и древнему Египту [19]. Применение каннабиса в виде лечебных настоек упоминается практически во всех древних медицинских книгах по растительной медицине [20]. Сегодня в большинстве стран каннабис находится под запретом, но в ряде случаев он разрешен к употреблению или может использоваться в лечебной практике.

Не менее долгую историю имеют и другие природные наркотические и сильнодействующие вещества – опиинные и тропановые алкалоиды, триптамины и фенилэтиламины. Более того, все они практически широко используются в медицине и в настоящее время.

Несмотря на то, что каждый тип соединений воздействует на определенные рецепторы в организме человека (рисунок 1), все они являются психоактивными, наркотическими веществами.

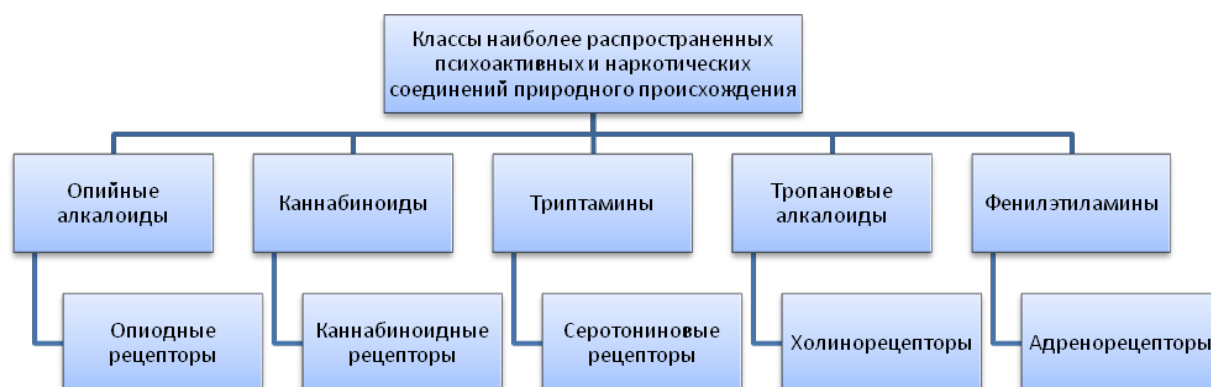
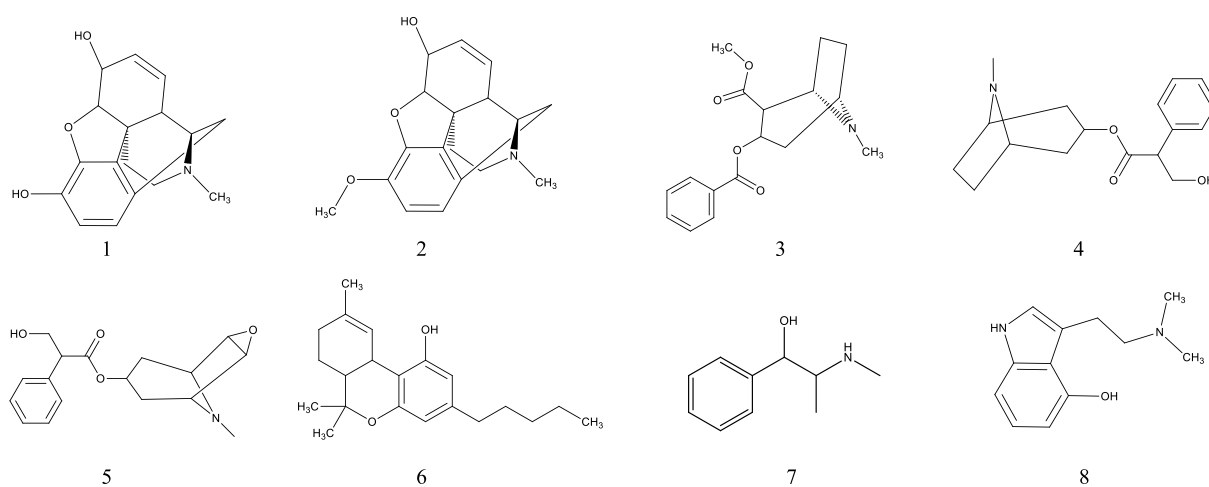


Рисунок 1 – Основные типы наркотических соединений и рецепторы, на которые они воздействуют

Стоит отметить, что некоторые соединения, например морфин, воздействуют сразу на несколько типов рецепторов [21].

Вне зависимости от степени воздействия на организм, большинство соединений, относящиеся к природным наркотикам (рисунок 2), являются опасными и подлежат контролю со стороны правоохранительных органов и здравоохранительных учреждений. Своевременный контроль и определение природных наркотиков в растительном сырье, лекарственных формах и биологических материалах привели к необходимости активного развития методик их определения [5, 7–12, 21–24].



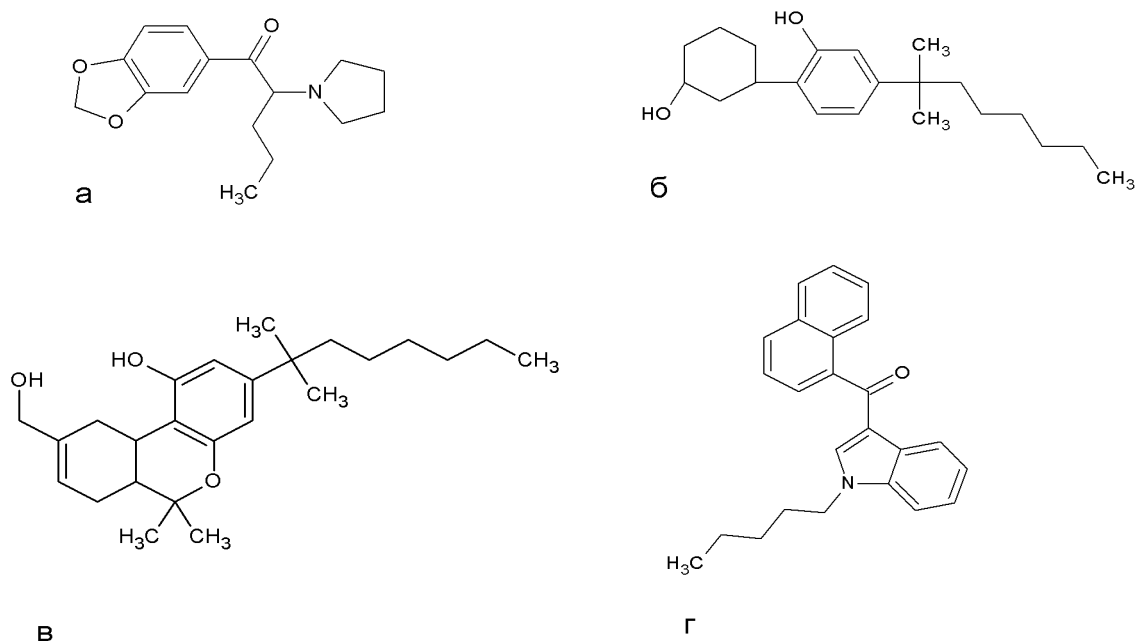
1 – морфин; 2 – кодеин; 3 – кокаин; 4 – атропин; 5 – скополамин; 6 – тетрагидроканнабинол; 7 – эфедрин; 8 – псилоцин

Рисунок 2 – Наиболее распространенные природные наркотические вещества

Не менее опасными и распространенными являются новые, синтетические наркотические средства, получившие широкое распространение с 2003–2005 гг. Их отличительной особенностью является наличие некоторого структурного подобия с нейромедиаторами и природными психоактивными соединениями [24]. Свою историю синтетические наркотические средства ведут с конца 60-х годов. В частности, одним из первых представителей синтетических НС является широко известный стимулятор метилендиоксипировалерон (MDPV) [25], синтезированный в 1969 году (рисунок 3а) в качестве средства для лечения хронической усталости, однако побочные эффекты не позволили использовать его по прямому назначению [25]. Развитию исследований по созданию других синтетических стимуляторов

послужили появившиеся в 1960-х гг. работы, посвященные установлению структуры тетрагидроканнабинола (ТГК), психоактивного компонента конопли (*Cannabis sativa*) и получению серии его синтетических аналогов действия – каннабимиметиков циклогексилфенольного ряда, названия которых имели префикс «СР» («cyclohexylphenol») (рисунок 3б). Эти вещества были разработаны известной фармацевтической компанией Pfizer [26]. Именно тогда впервые прозвучало определение «неклассических каннабиноидов» – веществ, являющихся аффинными лигандами (изостерическими модификаторами) каннабиноидных рецепторов СВ₁ и СВ₂, но не являющихся каннабиноидами по своей сути. Следующим важным этапом в развитии этого направления стало появление высокоаффинного каннабимиметика NU-210, дибензопирановая структура которого имеет значительное сходство со структурой ТГК. Работа, посвященная его получению и характеризующая его свойства, была опубликована в 1990 г., а само соединение (рисунок 3в) получило название в честь университета, в котором работали его создатели – Hebrew University [27, 28].

В 90-е годы прошлого века и начале нынешнего группа исследователей под руководством Джона Вилльяма Хаффмана (John William Huffman) (Клемсоновский университет, США) представила миру ряд синтетических каннабимиметиков, получивших название в честь руководителя (префикс «JWH»), одним из наиболее известных представителей которых является нафтоиндолное производное JWH-018 (рисунок 3г) [29]. Изначально, базируясь на структурах известных ранее аффинных каннабимиметиков аминоалкилиндольного ряда – праводолина и WIN-55-212-2 [30, 31], Huffman с соавторами определили ряд правил, связывающих структурные особенности и аффинность синтетических каннабимиметиков.



а – MDPV; б – CP-47,497; в – HU-210; г – JWH-018)

Рисунок 3 – Структуры некоторых синтетических наркотических средств

Большое количество разнообразных соединений, обладающих каннабимиметической активностью, было синтезировано и охарактеризовано Александром Макрянисом с соавторами (префикс «АМ», Alexandros Makriyannis) [32–52]. Меньшая известность работ этой чрезвычайно плодотворной группы связана с тем, что большинство полученных результатов были запатентованы.

Большое структурное разнообразие аффинных синтетических каннабимиметиков позволяет предположить низкую структурную селективность каннабиноидных рецепторов. Учитывая способ употребления каннабимиметиков (ингаляция или курение пропитанных ими смесей), можно ограничить их привлекательность для потребителей только теми соединениями, которые проявляют достаточную термическую и химическую стабильность, или образуют психоактивные продукты при термоллизе.

1.1.1 Определение природных наркотических средств в растительном сырье и лекарственных препаратах

Ввиду большого разнообразия растительного сырья, из которого могут быть выделены наркотические соединения, существует множество нормативных документов [9–12] и научных публикаций [6, 53–58], посвященных определению действующих веществ в растительном сырье и лекарственных формах. С учетом особенностей анализируемого сырья в этих публикациях и нормативных документах практически всегда указывается видовая принадлежность растения. В случае контроля лекарственных форм, принципиальным является достижение максимальной точности и надежности результатов анализа, а также его производительности [9–12].

При разработке способов определения целевых соединений в растительном сырье основное внимание уделяется оптимизации и автоматизации процедур подготовки проб, выбору аналитического оборудования и условий детектирования. На процедуры проведения рутинного анализа накладываются жесткие рамки как со стороны выбора аналитического метода, который должен обеспечить быстрый и точный массовый анализ проб, так и способа подготовки проб, в условиях которых должны достигаться максимальные степени извлечения и стабильность вещественных форм аналитов в процессе хранения образцов и полученных экстрактов. В серии публикаций 80–90-х гг. большое распространение получила сверхкритическая флюидная экстракция с использованием сверхкритического флюида CO_2 с различными модификаторами, которая позволяла достичь высокие степени извлечения тропановых алкалоидов (атропина, скополамина, кокаина), сокращая при этом время и снижая расход органических растворителей [59, 60].

В целом в аналитической практике нашли применение способы экстракции аналитов с использованием водной, водно-органической, органической сред и разнообразных сорбентов – жидкость-жидкостная (ЖЖЭ) и твердофазная экстракция (ТФЭ). При выборе способа экстракции учитывается возможность гидролиза некоторых соединений в процессе их извлечения из сырья (характерно для эфирных

алкалоидов - атропина, скополамина, кокаина и др.), поэтому нередко вопросы пробоподготовки имеют определяющее значение.

Содержания активных веществ в растительном сырье могут сильно различаться в зависимости от вида, времени и места сбора анализируемого материала, условий хранения, возраста и даже анализируемой части растения. Эти факторы приводят к зависимости результатов от вида матрицы и большому разнообразию применяемых методов качественного, полуколичественного и количественного анализа – титриметрии [1–3], спектрофотометрии (СФ) [4, 61], тонкослойной хроматографии (ТСХ) [29], высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) [4, 62] и газовой хроматографии (ГХ) [57, 63], газовой хроматомасс- спектрометрии (ГХ-МС) [64, 65] и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) [66–68].

Существенно проще работать с лекарственными формами, поскольку в них нормируется состав и процентное содержание всех компонентов, что облегчает выбор методов пробоподготовки и анализа препарата. Исключение составляют настойки различных трав, поскольку в них указывается содержание действующих веществ в пересчете на один компонент, которое, как правило, рассчитывается по результатам спектрофотометрического или титриметрического аддитивного определения целой группы соединений в исследуемом объекте [1–3].

В таблице 1 приведены способы определения некоторых НС в растительном сырье и лекарственных препаратах, условия их обнаружения и пределы детектирования.

Таблица 1 – Способы определения НС в растительном сырье и лекарственных препаратах

| Аналит | Объект | Предел детектирования | Экстракция | Метод анализа | Колонка | Условия | Ссылка |
|--|-----------------------|-----------------------|---|----------------------------|--|---|--------|
| ТГК, КБД | Конопля | – | Гексан (3 раза по 10 мин в у/з) | ГХ-МС (ЭИ, Q) | HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | 200°C → 280°C | [5] |
| ТГК, КБД, КБН | Конопля | 1–2 нг/мл | Гексан:изопропанол (9:1), дериватизация с MSTFA | ГХ-МС (ЭИ, Q) | HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | 120°C (2 мин) → 290°C (20°C/мин); 290°C (10 мин) | [6] |
| Морфин, кодеин, папаверин, носкапин, протопин | Мак | – | HCl (0.1 Н; 1 ч) → + NH ₄ OH (pH = 10) → + этилацетат (встряхивание) | ГХ-МС (ЭИ, Q) | HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | 100°C (1 мин) → 300°C (20°C/мин); 300°C (15 мин) | [22] |
| ТГК, ТГК-СООН, КБД, КБД-СООН, КБН, КБГ, КБГ-СООН | Конопля | 0.0625–0.25 мкг/мл | Метанол:хлороформ (9:1) (30 мин, встряхивание) | ВЭЖХ-ДМД | Waters XTerra MS C18 (250 мм × 2.1 мм, 5 мкм) | 68% А : 32% В (1 мин); 68% А → 90.5% А (20.5 мин); 90.5% А (3 мин); 90.5% А → 68% А (1 мин); 68% А (6 мин); А – CH ₃ OH; В – 50 мМ HCOONH ₄ | [6] |
| Псилоцибин | Галлюциногенные грибы | 4.4 нг/мг | Метанол (2 раза по 30 мин в у/з), дериватизация, реконструкция в элюенте 1-ой степени | ВЭЖХ-ФЛД, ВЭЖХ-МС (ЭРИ, Q) | Mightysil RP-18 GP column (150 мм×4.6 мм, 3 мкм) | 77% А : 23% В (23 мин); 77% А → 40% А (13 мин); А – 50 мМ CH ₃ COONH ₄ ; В – CH ₃ CN | [7] |
| Атропин, апоматропин, скополамин | Белладонна | 8–16 мкг/мл | Хлороформ:метанол:25% раствор аммиака (15:5:1) (трехкратная по 10 мин, встряхивание) | ВЭЖХ-УФ | Luna C8 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) | 12.2% А : 79.7 В : 8.1 С; А – ацетонитрил; В – 30 мМ фосфатный буфер (pH = 6.2); С – метанол | [8] |

| | | | | | | | |
|--|--------------------------------|--------------|---|----------------------|---|---|------|
| Морфин, кодеин, папаверин, наркотин, тебаин | Опий-сырец | – | 0.5% CH ₃ COOH (20 мин в у/з), ТФЭ | ВЭЖХ-УФ | Waters μ-Bondapak C18 (300 мм × 3.9 мм, 10 мкм) | 35% А : 1.5% В : 0.5% С : : 63% D; А – метанол; В – HCOOH; С – триэтиламин; D – вода; | [9] |
| Псилоцибин | Галлюциногенные грибы | 0.01 мг/мл | Метанол (двукратная, 15 мин в у/з) | КЗЭ-УФ | Капилляр (57 см × 50 мкм) | 10 мМ боратно-фосфатный буфер (рН 11.5), 25 кВ | [10] |
| Скополамин, атропин, анисодамин | Дурман | 2.4–4 мкг/мл | 80% этанол (30 мин в у/з) | КЗЭ-УФ | Капилляр (42.1 см × 50 мкм) | 50 мМ фосфатный буфер (рН 5) с 20% ТГФ, 20 кВ | [11] |
| Псевдо-эфедрин | Лекарственная форма (таблетки) | 0.371 мкг/мл | Растворение в воде | УФ-спектрофотометрия | – | Комплекс с молибдатом аммония (C = 4 × 10 ⁻³ М); λ = 324 нм; 25 мин | [52] |
| Эфедрин, псевдо-эфедрин, норэфедрин, норпсевдо-эфедрин, метилэфедрин | Эфедра | 0.3–1 мкг/мл | у/з и микроволное извлечение в системе HCl (37%):метанол (0.8:99.2) (v:v) | ВЭЖХ-УФ | Discovery HS F5 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) | 90% А : 10% В; А –CH ₃ COONH ₄ (7 мМ) в CH ₃ CN; В – вода | [53] |
| Атропин, скополамин | Дурман | 50–100 пг/мл | Метанол:вода (3:2, v:v) (у/з извлечение, 30 мин) | ВЭЖХ-МС (ЭРИ, Q) | Ascentis Express C18 (50 мм × 2.1 мм, 2.7 мкм) | 90% А : 10% В → 10% А : 90% В (10 мин); 10% А (7 мин); 10% А → 90% А (0.1 мин); 90% А (6.9 мин); А – 1% HCOOH в воде; В – 1% HCOOH в CH ₃ OH | [56] |

| | | | | | | | |
|---|-----------------------|----------------|--|---|--|--|------|
| Атропин, скополамин | Дурман | 3–10 мкг/мл | Встряхивание, нагревание, у/з, ЖЖЭ, ТФЭ, дериватизация (для ГХ-МС) | ВЭЖХ-ДМД, ВЭЖХ-МС (ЭРИ, Q), ГХ-МС (ЭИ, Q) | Luna C18 (250 мм × 2.1 мм, 5 мкм); HP Ultra-2 (30 м × 0.32 мм × 0.5 мкм) | ВЭЖХ-ДМД: фосфатный буфер (рН 3.5):ацетонитрил; ВЭЖХ-МС: 0.1% НСООН:ацетонитрил; ГХ-МС: 90°C → 300°C (10°C/мин) | [57] |
| Атропин, скополамин, норскополамин | Белена (гиосциамус) | 1–1.5 мкг/мл | 80% метанол при 60°C (16 ч) | КЗЭ-УФ | Капилляр (67 см × 75 мкм) | 40 мМ фосфатный буфер (рН 7.8), 20 кВ | [58] |
| Псилоцин, псилоцибин | Галлюциногенные грибы | – | Прямое определение; Хлороформ (1 ч в у/з), дериватизация с MSTFA | ГХ-МС (ЭИ, Q); СИП | HP-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | СИП: t (десорбера) = 258°C; t (камеры) = 235°C; L (камеры) = 7 см; ГХ-МС: 180°C → 320°C (20°C/мин); 320°C (5 мин) | [59] |
| Морфин, кодеин, орипавин, тебаин, носкапин, папаверин | Мак | 0.3–5.4 мкг/мл | Метанол (5 мл, 20 мин в у/з) | ВЭЖХ-ДМД | Zorbax Extend C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм) | 45% А : 55% В (2 мин); 45% А → 70% А (8 мин); 70% А → 85% А (10 мин); 85% А → 45% А (10 мин); А – CH ₃ OH; В – 0.1% НСООН + ТЭА (рН 9.6) | [60] |

| | | | | | | | |
|--|-----------------------------|---|---|--------------------|---|--|------|
| Анисодамин, атропин, скополамин, анисодин | Przewalskia tangutica Maxim | 0.03–0.46 мкг\мл | Метанол (30 мин в у/з, выдерживание в холодном месте 12 ч) | КЗЭ-ЭХЛ | Капилляр (40 см × 25 мкм) | 20 мМ фосфатный буфер (рН 8), 12 кВ | [61] |
| ТГК, КБД | Конопля | – | Прямое определение | DAPPI-МС/МС (QqQ) | – | Пары толуола | [62] |
| ТГК, ТГК-СООН, КБД, КБД-СООН, КБН, КБГ, КБГ-СООН | Конопля | 6.25–18.75 нг/г | Метанол:хлороформ (9:1, v:v) (30 мин встряхивание) | ВЭЖХ-ДМД | Waters XTerra MS C18 (250 мм × 2.1 мм, 5 мкм) | 68% А : 32% В (1 мин); 68% А → 90.5% А (20.5 мин); 90.5% А → 68% А (1 мин); 68% А (6 мин); А – CH ₃ ОН; В – 50 мМ НСООНН ₄ | [63] |
| Атропин, скополамин | Дурман | – | 25% аммиак (5мл), ЖЖЭ хлороформ:метанол (4:1, v:v), упаривание и перерастворение в метаноле | ВЭЖХ-МС (ЭРИ, QqQ) | Eclipse Plus C18 (100 мм × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 5% А : 95% В → 35% А : 65% В (10 мин); 35% А → 60% А (5 мин); 65% А → 90% А (5 мин); 90% А → 5% А (6 мин); А – CH ₃ CN; В – 20 мМ НСООНН ₄ в 0.1% НСООН | [64] |
| Морфин, кодеин, орипавин, тебаин | Мак | 1×10 ⁻¹⁰ –1×10 ⁻⁹ М | – | ВЭЖХ-ХЛД | Chromolith™ SpeedROD RP-18e (50 мм × 4.6 мм) | 20% А : 80% В → 60% А : 40% В (1.2 мин); 60% А (0.8 мин); | [65] |

| | | | | | | | |
|--|-----------------------------|---|--|-------------------------------|--|---|------|
| | | | | | | А – 0.1% HCOOH в CH ₃ OH; В – 0.1 CF ₃ COOH%, пост-колоночная дериватизация KMnO ₄ (5×10 ⁻⁴ М в 1% полифосфате натрия, pH 2) | |
| Эфедрин, псевдо-эфедрин, норэфедрин, метил-эфедрин | Лекарственная форма | 0.37–1.06 мкМ | Вода (500 мл, нагревание 1.5 ч) | ВЭЖХ-ДМД | Wako Wakosil-II 5C18 HG (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) | Вода:ацетонитрил (65:35) (v:v) с добавкой 0.4% ДДСН | [66] |
| Псилоцин, псилоцибин | Галлюциногенные грибы | 3.5×10^{-9} – 1.2×10^{-8} М | Метанол; раствор уксусной кислоты | ВЭЖХ-ХЛД | Synergi Max-RP C ₁₂ (150 мм × 4.6 мм, 4 мкм) | Метанол:10 мМ HCOONH ₄ (95:5) (v:v) (pH 3.5) | [67] |
| Мусцимол, иботеновая кислота | Галлюциногенные грибы | 10–25 мкг/мл | HCl (3 М, у/з извлечение), ЖЖЭ, дериватизация с BSTFA | ГХ-МС (ЭИ, Q) | DB-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | 50°C (1 мин); 50°C → 300°C (15°C/мин); 300°C (5 мин) | [68] |
| Морфин, кодеин, тебаин, наркотин, носкапин | Опий-сырец, макровая солома | 0.04–0.12 мкг/мл | Метанол (у/з извлечение) | КЗЭ-УФ | Капилляр (60 см × 0.5 мкм) | 50 мМ фосфатный буфер (pH 2.5) | [69] |
| Скополамин, атропин, скополамин-N- | Дурман | 0.13–0.95 мкг/мл | Метанол (у/з извлечение, нагревание), ЖЖЭ на твердом носителе (SLE), ТФЭ | ВЭТСХ-денситометрия; ВЭЖХ-ДМД | Camag silica gel 60 F ₂₅₄ ; Waters XTerra MS C18 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм) | ВЭТСХ-денситометрия: Ацетон:метанол:вода:25% аммиак (82:5:5:8) (v:v); | [70] |

| | | | | | | | |
|---|---------|---------------|----------------------------------|-----------------------|--|---|------|
| оксид, скополамин-N-метил | | | | | | ацетонитрил:метанол:85% НСООН (120:5:5) (v:v); ВЭЖХ-ДМД: 10% А : 90% В (6 мин); 10% А → 40% А (6 мин); 40% А (8 мин); 40% А → 85% А (5 мин); 85% А → 10% А (5 мин); 10% А (5 мин); А – CH ₃ CN; В – 15 мМ НСООНН ₄ | |
| ТГК, ТГК- СООН, КБД, КБД-СООН, КБН | Конопля | 0.03–9.9 г/кг | Метанол:хлороформ (9:1) (v:v) | ВЭЖХ-МС (ХИАД, ИТ) | Hypersil BDS C18 (150 мм × 2.1 мм, 3 мкм) | 60% А : 40% В (0.5 мин); 60% А → 80% А (0.5 мин); 80% А (20 мин); 80% А → 95% А (0.5 мин); 95% А (7 мин); 95% А → 60% А (0.5 мин); 60% А (6 мин); А – 10 мМ CH ₃ COONH ₄ + 0.2% НСООН в CH ₃ OH; В – 10 мМ CH ₃ COONH ₄ + 0.2% НСООН в воде | [71] |

Из данных таблицы 1 следует, что наиболее часто используемыми способами определения НС в растительном сырье являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография (ГХ), сопряженные с различными спектральными детекторами, а также ряд модификаций капиллярного электрофореза (КЭ). Применение титриметрических методов может приводить к большим ошибкам определения аналитов вследствие их недостаточной селективности [57].

Ежегодно увеличивается количество публикаций, посвященных подобного рода исследованиям методами масс-спектрометрии и хромато-масс-спектрометрии [57, 76, 77, 68, 78]. Данная тенденция обусловлена растущей доступностью современных высокоточных ГХ-МС и ВЭЖХ-МС систем и положительно сказывается на достоверности результатов как качественного, так и количественного анализа [79, 80]. К сожалению, при этом встречаются работы, где процедура идентификации проводится с использованием только библиотек масс-спектров, без учета параметров удерживания аналитов и использования стандартных образцов, что может привести к ложноположительным результатам [81].

В ряде случаев использование ГХ-МС затруднено ввиду термолабильности некоторых аналитов и необходимости дериватизации полярных соединений. Следует отметить, что процедура дериватизации может оказаться необходимой при разделении оптических изомеров [82, 83], что является достаточно актуальной задачей в силу различной биологической активности последних. Чаще всего подобного рода задачи решаются с применением хиральных селекторов [83, 84].

В рамках мероприятий по обеспечению нераспространения наркотических препаратов часто возникает потребность в экспрессном массовом анализе больших объемов сырья, грузов и изъятых препаратов. В этом случае предпочтительным является применение тест-систем и инструментальных методов, позволяющих проводить оперативный массовый, желательна неразрушающий, контроль. В качестве такого рода систем предложено использовать

«электронный нос» [85], портативные переносные ИК- или Раман-спектрометры [86], а также целый ряд тест-методов [3, 87]. Отдельно стоит отметить применение ТСХ, как метода скрининга некоторых НС [12, 28, 30]. Данный способ позволяет достаточно быстро установить групповую принадлежность вещества, а с использованием веществ-свидетелей очертить круг веществ-кандидатов по значению R_f .

При использовании тест-методов, а также для проявления ТСХ-пластин используются реактивы, дающие характерные окраски при взаимодействии с НС (таблица 2).

Таблица 2 – Реагенты, используемые для группового обнаружения НС

| Название реактива | Определяемые вещества/группы веществ | Характерная окраска |
|--------------------|---|---|
| Нингидрин | Первичные амины Вторичные амины | Фиолетовая Желтая |
| Реактив Марки | Опийные алкалоиды Амфетамин Меперидин Мескалин | Фиолетовая Оранжевая Коричневая Красная |
| Азотная кислота | Героин Морфин | Желтая Оранжево-красная, быстро переходящая в желтую |
| Тиоцианат кобальта | Кокаин | Синие хлопья |
| Реактив Эрлиха | ЛСД, алкалоиды спорыньи Диметилтриптамин, Диэтилтриптамин | Медленно появляющаяся пурпурная Темно-розовая |
| Реактив Дюкенуа | Марихуана Гашиш, гашишное масло, тетрагидроканнабинол | Серо-голубая Фиолетово-голубая |
| Прочный синий Б | Марихуана Гашиш, гашишное масло, тетрагидроканнабинол | Красно-коричневая Темная красно-коричневая |

Помимо реагентов, приведенных в таблице 2, широко распространены также такие реагенты, как реактив Манделина, FPN-реагент, раствор хлорида железа (III), нитрат ртути, фурфурол, раствор подкисленного йодплатината и др. [4, 54, 88].

Несомненным преимуществом «электронного носа» и переносных ИК/Раман-спектрометров является возможность проведения анализа без предварительной подготовки проб и разрушения анализируемого материала. Кроме того, портативные ИК/Раман-спектрометры, как правило, снабжаются встроенными спектральными библиотеками и поисковыми системами, что позволяет проводить определение наркотического соединения в автоматизированном режиме [86, 87]. Высокая разрешающая способность Раман-спектрометрии проиллюстрирована примером на рисунке 4 [89].

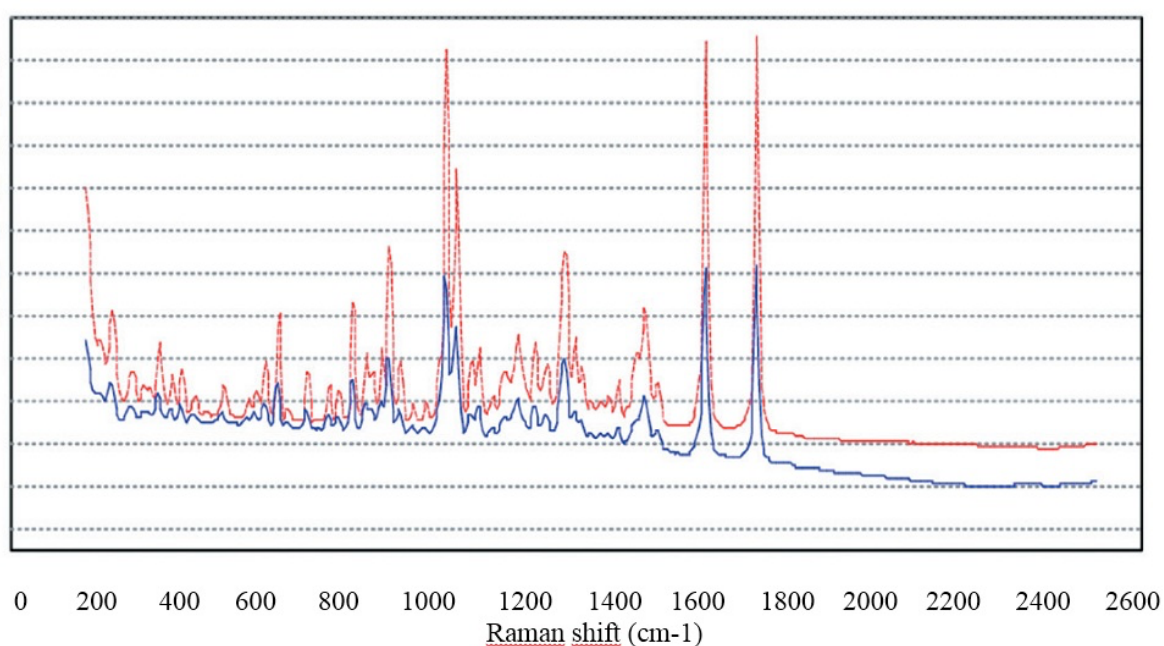


Рисунок 4 – Раман-спектр, полученный при анализе препарата, содержащего кокаин (внизу), в сравнении со спектром референсного соединения (вверху)

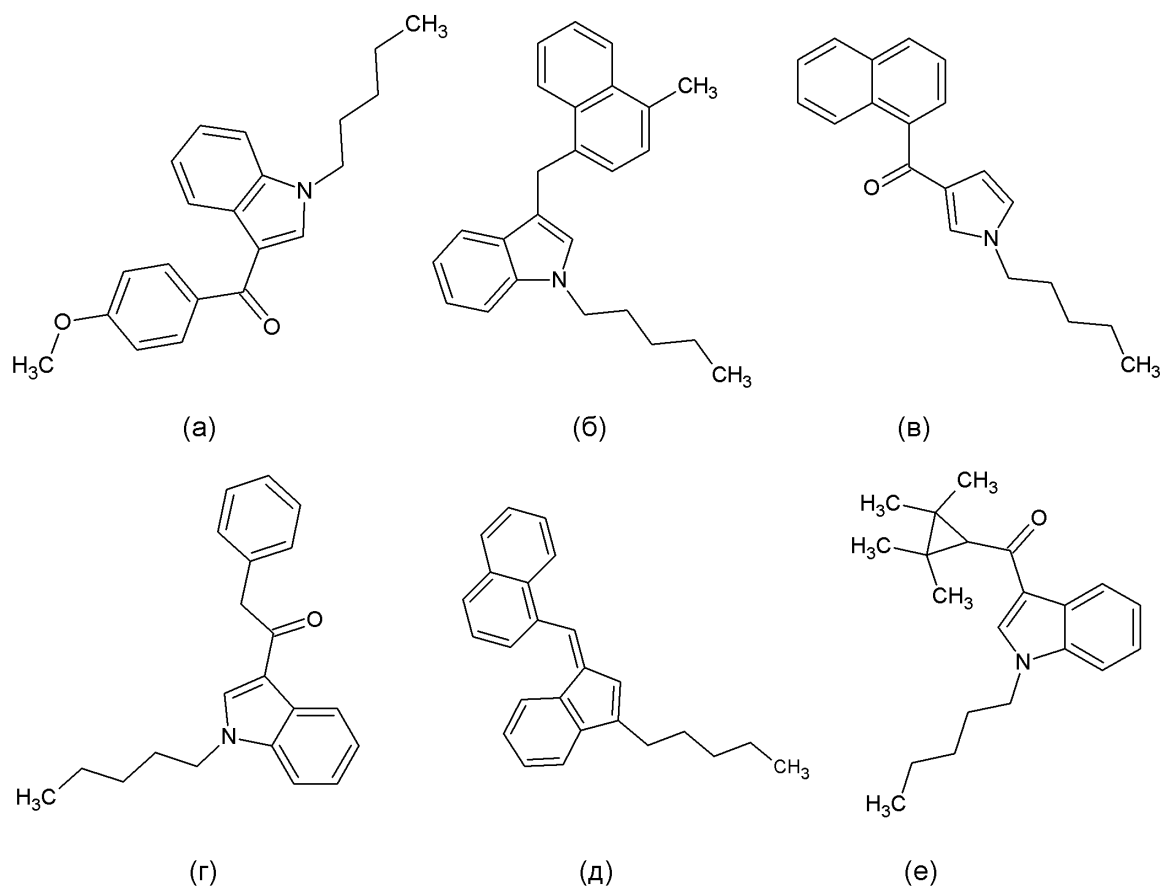
При использовании тест-методов все большее распространение получает схема, в которой путем темплатного синтеза получают селективные к определенному типу веществ материалы [89, 90]. С другой стороны, несмотря на возрастающую надежность тест-методов, в случае положительного результата тестирования обязательным является проведение подтверждающего анализа с использованием аттестованных методов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Например, в соответствии с методическими рекомендациями [54] количественный анализ сырья на содержание природных

наркотических веществ проводится с помощью газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД) с применением внутреннего стандарта, например, метилстеарата, относительно которого установлены соответствующие коэффициенты пересчета для различных типов наркотиков.

1.1.2 Классификация и идентификация синтетических наркотических средств

При рассмотрении синтетических наркотических средств следует принять во внимание их огромное разнообразие, что привело к тому, что классификация, основанная на структурных особенностях [91], устарела уже с момента её появления. Тем не менее, она может быть использована для классификации уже продаваемых и не столь многочисленных соединений, хотя и при условии необходимых дополнений. Согласно классификации [91] следует различать:

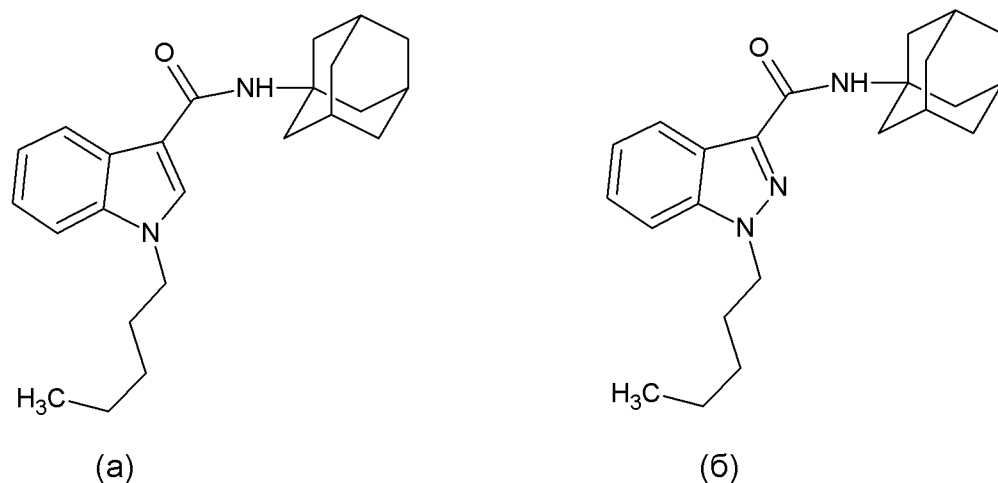
- нафтоиндолы, например JWH-018 (рисунок 3г);
- нафтилметииндолы, например JWH-184 (рисунок 5б);
- нафтоилпирролы, например JWH-030 (рисунок 5в);
- нафтилметииндены, например JWH-176 (рисунок 5д.);
- фенилацетииндолы, например JWH-167 (рисунок 5г);
- циклогексилфенолы, например CP47,497 (рисунок 3б);
- классические каннабиноиды или дибензопираны, например HU-210.



а – RCS-4; б – JWH-184; в – JWH-030; г – JWH-167; д – JWH-176 и е – UR-144
 Рисунок 5 – Структурные формулы синтетических каннабимиметиков

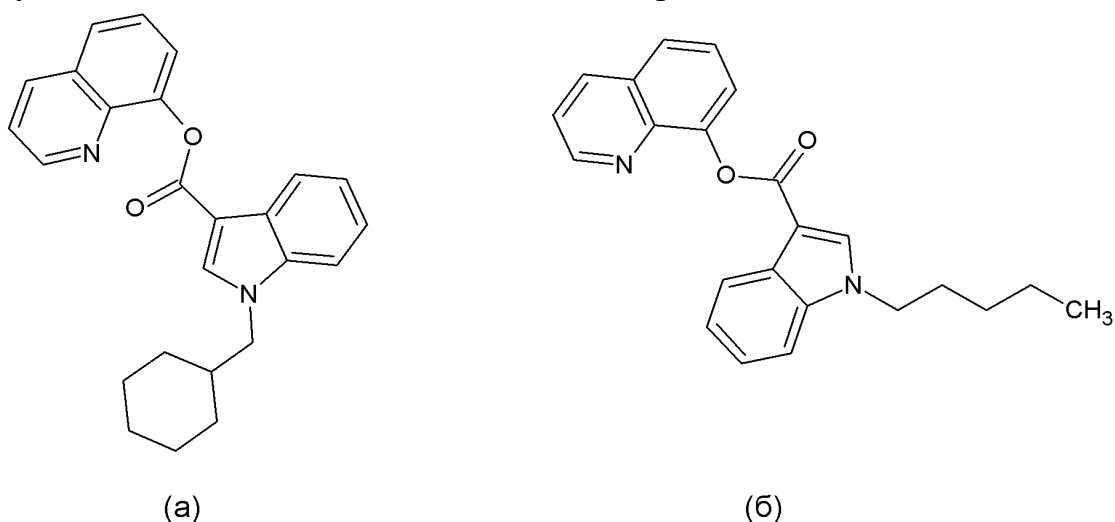
Новые соединения, появляющиеся на рынке психотропных средств, как правило, имеют в структурах азотосодержащий пятичленный гетероцикл, поэтому расширение классификации целесообразно основывать на этой особенности. Так, дополнительными группами можно считать:

- бензоиндолы, например RCS-4 (рисунок 5а);
- алканоиндолы, например UR-144 (рисунок 5е);
- индол-карбоксамиды, например APICA (рисунок 6а);
- индазол-карбоксамиды, например APINACA (рисунок 6б);
- индол-карбоксилаты, например PB-22 и VB-22 (рисунок 7).



а – APICA, б – APINACA

Рисунок 6 – Синтетический каннабиноид, производные индола и индазола



BB-22 (а) и PB-22 (б)

Рисунок 7 – Синтетические каннабиноиды, производные 8-оксихинолина

Все представленные соединения внесены в Список наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых запрещен законодательством Российской Федерации и рядом международных договоров (список I) [92]. Следует отметить, что запрещение оборота касается также производных указанных соединений. Соединения, структурные формулы которых указаны на рисунке 8д и 8е, могут быть классифицированы как пиперазоилиндолы и пиперазоилиндазолы соответственно.

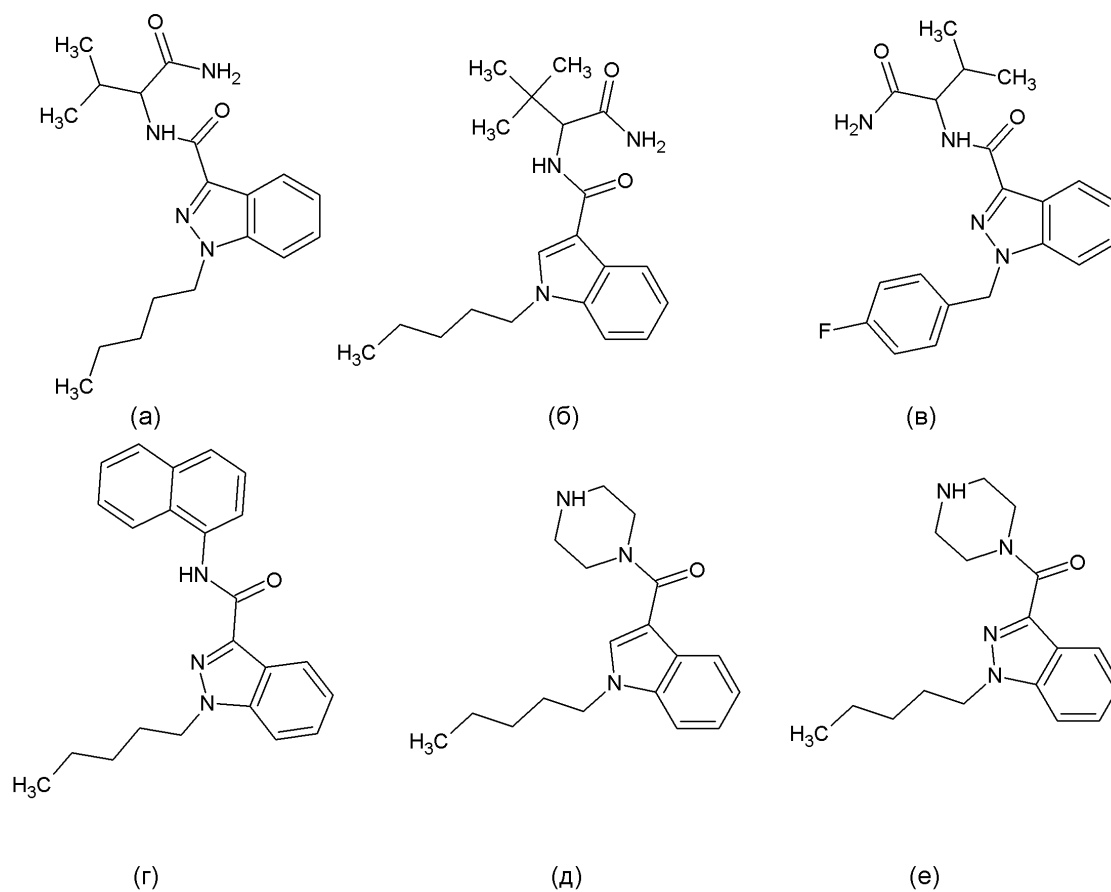
Наличие боковой пентильной цепи – наиболее распространенный структурный признак синтетических каннабиноидов (СК), хотя повышение

ассортимента этих соединений достигается и за счет замены цепи другими остатками, в том числе *n*-фторобензильным, циклогексилметильным, 1-метилпиперидин-2-ил-метильным или 5-фторопентильным.

Структурные формулы наиболее распространенных катинонов – психотропных соединений, практически не уступающих по «популярности» синтетическим каннабимиметикам, приведены на рисунке 9.

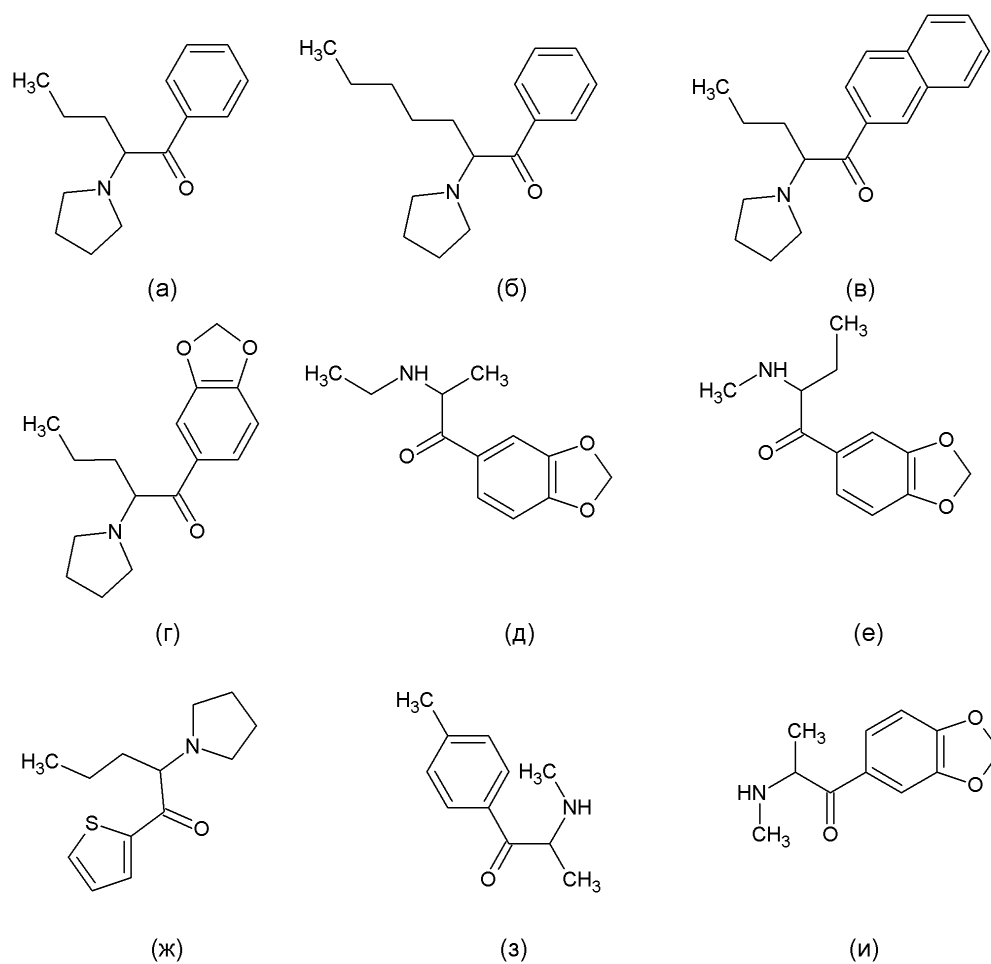
Среди значимых и распространенных новых соединений, появившихся в последние годы, стоит отметить производные фентанила, получившие широкое распространение (в частности, фуранилфентанил), опиоды U-47700, U-77891, U-69,593 и синтетические каннабимиметики, как MMB-022, AFUB7AICA и CUMYL-CB-MeGACLONE (рисунок 10).

Исходя из многообразия синтетических наркотиков и динамики появления новых дизайнерских образцов, актуальными задачами в области контроля НС являются как разработка способов выявления новых соединений, так и скрининг десятков, а порой и сотен известных соединений в нативном виде, в растительном сырье и биологических жидкостях.



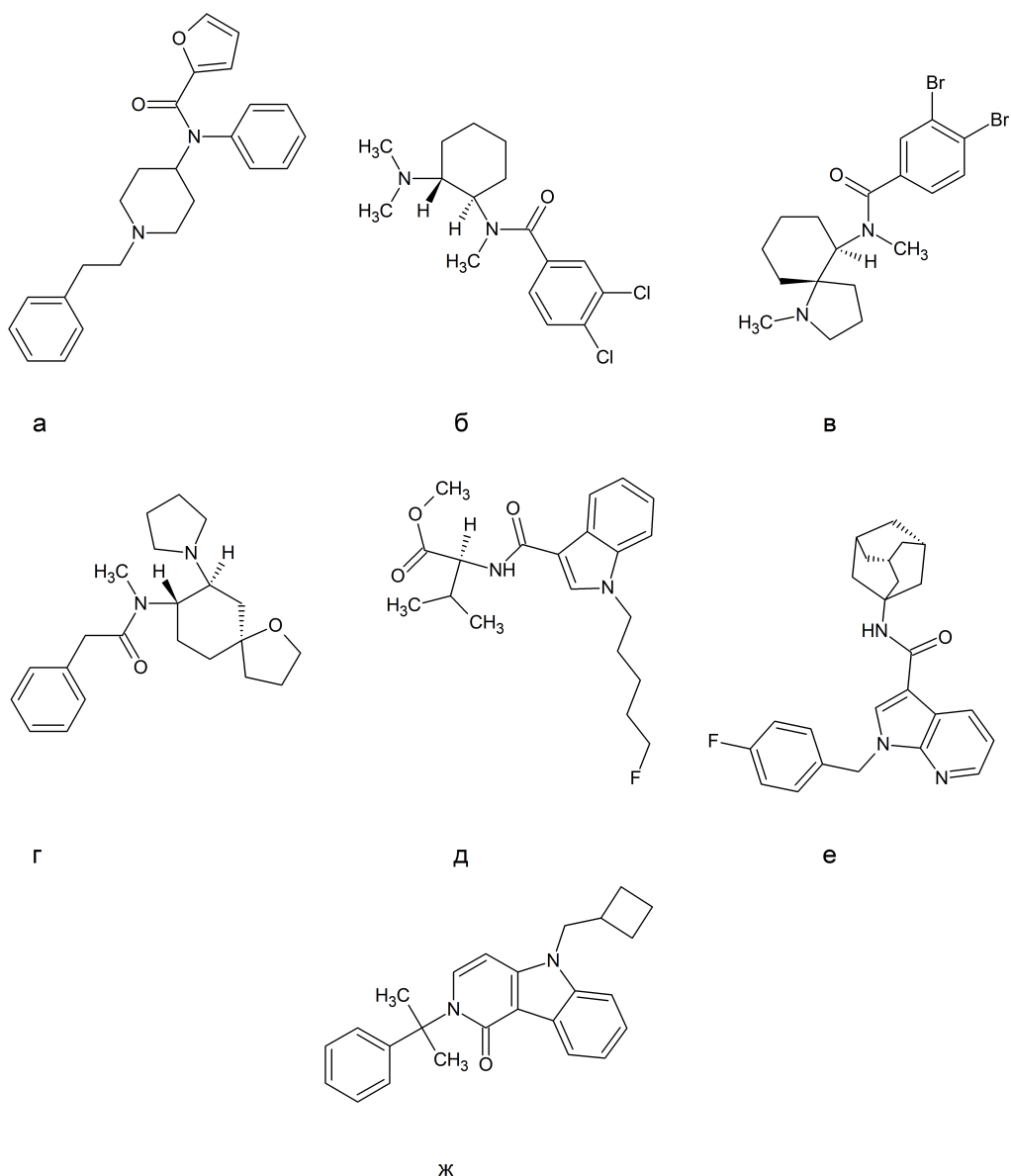
а – АВ-PINACA; б – ADBICA; в – АВ-FUBINACA; г – MN-018; д – PIP-018;
 е – PIP(N)-018

Рисунок 8 – Структурные формулы синтетических каннабимиметиков, оборот которых запрещен согласно постановлению Правительства РФ № 882 в 2013 г.



а – α -PVP; б – PV8; в – нафирон; г – MDPV; д – этилон; е – бутилон;
 ж – α -PVT; з – мефедрон; и – метилон

Рисунок 9 – Структурные формулы наиболее распространенных катионов



а – фуранилфентанил, б – U-47700, в – U-77891, г – U-69,593, д – MMB-022, е – AFUB7AICA, ж – CUMYL-CB-MeGACLONE

Рисунок 10 – Структурные формулы новых синтетических наркотических средств:

На сегодняшний день в аналитической и криминалистической практике сформировались единые требования к идентификации НС. Они практически полностью повторяют требования к идентификации любого нового органического соединения. В общем случае, в качестве идентификационных характеристик приводятся данные методов ЯМР, газовой хромато-масс-спектрометрии с электронной ионизацией (ГХ–МС (ЭИ)), ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией с электрораспылительной ионизацией (ВЭЖХ-

МС/МС, ЭРИ) и любого вида масс-спектрометрии высокого разрешения (**МСВР**) [14, 93]. В большинстве случаев масс-спектры высокого разрешения получают с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии (**ХМС**), поскольку источники ионизации при атмосферном давлении позволяют надежно определять молекулярную массу, что чрезвычайно важно для установления элементного состава соединения.

Более сложные подходы используют при идентификации метаболитов новых наркотических средств. Следует отметить, что в большинстве случаев при установлении структуры метаболитов нет возможности использовать ЯМР, поскольку очистить от матрицы необходимое количество метаболита крайне затруднительно.

1.1.3 Определение синтетических наркотических средств в коммерчески реализуемых продуктах

Важной и сложной является задача количественного определения и проведения скрининга НС. Особенно остро этот вопрос стоит в практике токсикологических лабораторий и лабораторий, занимающихся допинг-контролем. В этом случае основными способами анализа как конфискованных НС, так и биообразцов, становятся ГХ-МС (ГХ-МС/МС) и ВЭЖХ-МС/МС. Определение НС может выполняться с помощью поисковых библиотек и без использования стандартных образцов, что упрощает процедуру определения. Наиболее известными некоммерческими библиотеками психоактивных и наркотических средств, содержащими актуальные масс-спектры электронной ионизации, являются библиотеки SWGDRUG [94] и Cayman Spectral Library [95]; из коммерческих можно назвать обновления для библиотеки NIST11 [96] и MPW2011 [97], содержащие масс-спектры электронной ионизации и индексы удерживания аналитов. К сожалению, период выпуска обновлений коммерческих библиотек (3 и 4 года для NIST и MPW, соответственно) слишком длителен, что не удовлетворяет требованиям оперативного реагирования на появление новых НС.

Предварительным методом анализа биологических образцов является иммунохимический анализ (ИХА) [98]. Основным недостатком ИХА является его ориентированность на определение групп соединений и, следовательно, малая селективность, а несомненным достоинством – экспрессность. ИХА – метод предварительного анализа, что требует применения более надежных методов ХМС для подтверждения (или опровержения) его результатов.

На сегодняшний день наиболее популярными системами для проведения скрининга образцов и количественного анализа НС являются одноквадрупольные (для газовой хроматографии) и тандемные (для жидкостной хроматографии) масс-спектрометры низкого разрешения, такие как тройные квадруполи (QqQ) и тройные квадруполи с функцией линейной ионной ловушки для

третьего квадрупольного фильтра (**Q-Trap**) [99–101]. С использованием подобных систем были выполнены работы [102, 103], демонстрирующие скрининг более чем 700 соединений. При этом авторы предлагают при проведении автоматизированного поиска использовать времена удерживания и селективные переходы для каждого соединения, полученные в режиме мониторинга множественных реакций. Достоверность поиска оценивается по вычисляемому значению фактора подобия. Подобный подход широко используется при проведении библиотечного поиска по результатам ГХ-МС с электронной ионизацией [99]. Однако следует отметить, что в случае ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией данный подход для режима мониторинга множественных реакций должен использоваться особенно осторожно, поскольку единственный переход и время удерживания не всегда являются достаточной информацией для однозначной идентификации. Регистрация спектров ионов-продуктов вместо мониторинга множественных реакций повышает достоверность идентификации, но негативно сказывается на пределе обнаружения.

При определении НС методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС (ГХ-МС/МС) желательно следовать рекомендациям ВАДА [79], регламентирующие требования к количественному анализу и основные качественные параметры при использовании режимов детектирования избранных ионов мониторинга множественных реакций (соотношения относительных интенсивностей ионов и характеристики удерживания). В случае проведения газохроматографического определения НС для повышения достоверности анализа рекомендовано использовать значения индексов удерживания [99] или фиксированных времен [104].

Альтернативой указанным типам масс-спектрометров для проведения количественного анализа можно рассматривать масс-спектрометры высокого разрешения, позволяющие существенно улучшить соотношение сигнал/шум за счет точного определения m/z [105]. Применение МСВР в сочетании с матрично-активированной лазерной десорбцией с ионизацией [106] или

в условиях прямого анализа в реальном времени [107–110] позволяет обходиться без хроматографического разделения и выполнять быстрые определения НС после минимальной пробоподготовки или без нее. Эти методы ориентированы на определение НС в продаваемых или конфискованных продуктах, а основным их недостатком являются значительные матричные влияния, снижающие достоверность определения при малых концентрациях целевых аналитов.

Первоначально появление новых соединений на рынке можно было связать с обновлением списка НС, запрещенных к обороту на территории страны. Однако в последние годы наблюдается резкий рост количества выпускаемых на рынок соединений вне зависимости от частоты обновления списков, в том числе уже вошедших в список запрещенных (таких как JWH-018, MDPV, метилон, мефедрон).

Опубликовано значительное количество работ, посвященных идентификации и количественному определению синтетических каннабимиметиков [97–179] и катинонов [179–192] в продаваемых или конфискованных продуктах. Лишь небольшая часть указанных публикаций включает количественные аспекты определения НС (таблица 3). Следует отметить, что для определения НС в продаваемых продуктах (после идентификации) нередко используют дорогостоящие методы анализа: ВЭЖХ с диодным матричным детектором и газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором. Содержание синтетических каннабимиметиков в курительных смесях колеблется от 0.5 до 50 мг/г, а их содержание в порошкообразных субстанциях составляет более 70%. В большинстве указанных работ представлен достаточно полный набор спектроскопических характеристик идентифицируемых веществ: ЯМР-, УФ-, ИК- и масс-спектры для различных условий. Можно отметить работу [179], в которой суммированы данные ряда исследований и которая служит своего рода атласом масс-спектров, собранных коллективом авторов. В некоторых работах применен метод ГХ-МС/МС с использованием химической ионизации, что

позволяло получить пик молекулярного иона-аддукта, который впоследствии подвергнулся фрагментации в ячейке соударений.

Выбирая способ качественного или количественного определения НС, следует учитывать их химическую и термическую устойчивость. Так, структура каннабимиметиков включает тетраметилциклопропановый остаток (UR-144 и его аналоги), поэтому они подвержены термоллизу в условиях газохроматографического элюирования [159, 164, 166] и гидролизу в присутствии кислот [112, 114]. Синтетические каннабимиметики индол-карбоксилатной группы способны к переэтерификации в дозаторе газового хроматографа в присутствии спиртов, что требует использования иных растворителей (например, этилацетата) [178].

Таблица 3 – Определение НС в коммерчески доступных продуктах

| Аналит | Объект | Экстрагент (условия) | Метод анализа | Колонка | Условия хроматографирования | Ссылка |
|--|-----------------------------|--|-----------------------|--|--|--------|
| CP47,497-C8, JWH-018 | Растительные смеси | Петролейный эфир и метанол (40–60°C, аппарат сокслета) | ГХ-МС (ЭИ, TOF) | ZB-5ms (30 м × 0.32 мм × × 0.25 мкм) | 70°C (3 мин); 10°C/ мин; 330°C (5 мин) | [14] |
| CP47,497-C8, JWH-018 | Растительные смеси | Метанол | УВЭЖХ-МС (ЭРИ, Q) | ACQUITY UPLC HSS T3 (100 мм × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 40°C; 50–80% В, 0.3 мл/мин А (0.1% HCOOH) В (0.1% HCOOH в CH ₃ CN) | [93] |
| AM-694, JWH-015, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-210, JWH-200, JWH-250, JWH-251, (4-метоксифенил)(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанон | Растительные смеси, порошки | Метанол (10 мин, У/З) | ВЭЖХ-ДМД (305–320 нм) | ACQUITY UPLC HSS T3 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 40°C; 30% В (2 мин); 30–50% В (4 мин); 50% В (6 мин); 50–80% В (8 мин); 100% В (6 мин); 0.6 мл/мин А (5 мМ ФБ, 5% CH ₃ CN, рН3.5) В (0.1% HCOOH в CH ₃ CN) | [111] |
| AM-694, AM-2201, JWH-122, RCS-4, (2-метоксифенил)(1-пентил-1Н-индол-3-ил)метанон | Растительные смеси, порошки | Метанол (10 мин, У/З) | ВЭЖХ-ДМД (305–320 нм) | ACQUITY UPLC HSS T3 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 40°C; 30% В (2 мин); 30–50% В (4 мин); 50% В (6 мин); 50–80% В (8 мин); 100% В (6 мин); | [130] |

| | | | | | | |
|---|---|----------------------------|--------------------------|--|--|-------|
| | | | | | 0.6 мл/мин А (5 мМ ФБ, 5% CH ₃ CN, рН3.5) В (0.1% HCOOH в CH ₃ CN) | |
| JWH-250 | Растительные смеси, по- рошки | Метанол (10 мин, У/З) | ВЭЖХ-ДМД (305 нм) | ACQUITY UPLC HSS T3 (50 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 40°C; 0% В (30 с); 30–90% В (381 с); 0.6 мл/мин А (5 мМ ФБ, 5% CH ₃ CN, рН3.5) В (0.1% HCOOH в CH ₃ CN) | [131] |
| JWH-015, JWH-073, JWH-081, JWH-200, JWH-250, JWH-251 | Растительные и резиноподоб- ные смеси, по- рошки | Метанол (10 мин, У/З) | ВЭЖХ-ДМД (190–500 нм) | ACQUITY UPLC HSS T3 (100 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 40°C; 30 %В (3 мин); 30–70% В (2 мин); 70% В (7 мин); 0.3 мл/мин (для JWH-200). 50% В (3 мин); 50–70 % В (2 мин); 70% В (7 мин); 0.3 мл/мин (для остальных аналитов) А (0.1 % HCOOH) В (0.1% HCOOH в CH ₃ CN) | [139] |
| JWH-122, JWH-307 | Растительные смеси | Хлороформ (10 мин, У/З) | ГХ-ПИД | DB-1ms (15 м × 0.32 мм × × 0.25 мкм) | 100°C (1 мин); 10°C/ мин; 310°C (5 мин) | [140] |

| | | | | | | |
|--|---------------------------------------|---|---------------------|---|--|-------|
| AM-694, AM-2201, JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-203, JWH-210, JWH-250, WIN-55,212-2, Д9-THC | Растительные смеси | Метанол (3 мин перемешивание и 10 мин У/З) | ВЭЖХ-УФ (214 нм) | (250 мм × 100 мкм), Cogent C ₁₈ 4.2 мкм | CH ₃ CN: CH ₃ OH:H ₂ O: HCOOH (69:5:25:1), 500 нл/мин | [147] |
| JWH-073, JWH-018, 1-Бутил-3-(1-(4-метил)нафтоил)индол | Растительные смеси | Метанол (5 мин) | ГХ-ПВД | VF-5ms (30 м × 0.25 мм × × 0.25 мкм) | 70°C; 40°C/мин; 180°C; 10°C/ мин; 300°C | [156] |
| AM-2201, JWH-018, JWH-019, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-147, JWH-250, JWH-210 | Растительные смеси, порошки, таблетки | Метанол (5 мин, У/З) | ГХ-МС (ЭИ, Q) | HP-5ms (30 м × 0.25 мм × × 0.25 мкм) | 120°C; 20°C/ мин; 300°C (15 мин) | [158] |
| AM679, AM694, JWH-018, JWH-019, JWH-081, JWH-200, JWH-203, JWH-250, WIN48098, WIN55,212-2 | Порошки | Хлороформ | ГХ-ПВД | HP-5ms (30 м × 0.25 мм × × 0.25 мкм) | 200°C (2 мин); 7°C/ мин; 275°C (3 мин); 2°C/ мин; 280°C (2 мин); 10°C/ мин; 300°C (8 мин) | [161] |

1.1.4 Определение запрещенных препаратов в биологически активных добавках и продуктах питания

В соответствии с кодексом ВАДА под допингом понимают препараты, обуславливающие несправедливое преимущество перед другими спортсменами [193–237], следовательно, спортсмен несет ответственность за обнаруженные в его организме запрещенные препараты и/или их метаболиты. В случае, когда обнаруженное в биологических жидкостях человека запрещенное соединение является следствием употребления «загрязненных» продуктов, наказание в отношении спортсмена может быть смягчено [198].

Одним из наиболее распространенных источников «загрязненных» продуктов, является спортивное питание, на этикетке которого могут отсутствовать указания о содержании запрещенных ВАДА препаратов. Наиболее распространенной причиной употребления спортивного питания является желание увеличения эффективности тренировок и выносливости, ускорения скорости восстановления и поддержания тонуса [195–204]. Наиболее популярными продуктами являются энергетические напитки, гели, батончики, протеиновые смеси, а также вспомогательные препараты, содержащие «растительные смеси» для жиросжигания или предтренировочные комплексы, витаминные и минеральные комплексы и смеси аминокислот [205–209].

Подобные продукты могут играть важную роль и значительно повысить эффективность тренировок, но только в том случае, если употребляются под присмотром и в соответствии с рекомендациями врачей, после проверки на безопасность. Так, употребление гидролизатов белка действительно могут способствовать быстрому пополнению уровня белка, необходимого для набора мышечной массы, что особенно важно в силовых видах спорта, а употребление креатина способствует ускорению восстановления [206–209].

Несмотря на то, что в ряде продуктов спортивного питания содержание запрещенных веществ может быть достаточно мало, чтобы обуславливать

эффект от их употребления (на уровне нг/г), подобные продукты все равно относятся к потенциально опасным [210–216], что привело к возникновению лабораторий контроля качества спортивного питания в Германии и Нидерландах, а некоторые национальные антидопинговые организации и вовсе составили и опубликовали перечень потенциально опасных для спортсмена добавок [216].

Другим источником запрещенных препаратов могут являться обычные продукты питания, реализуемые в розничных и оптовых сетях. Классическим примером «загрязненных» продуктов является обнаружение анаболических стероидов в мясе [217–231]. Несмотря на то, что в большинстве стран их употребление для увеличения скорости набора мышечной массы крупного и мелкого рогатого скота или птицы запрещено, подобные прецеденты периодически происходят [217–220]. Причиной этого является выборочный контроль в партии, который необязательно придется на контаминированные объекты.

В ряде случаев не только мясная продукция, но и выпечка может стать источником запрещенных соединений. Ранее отмечалось, что маковые семена – один из источников опийных алкалоидов. Если в процессе термической обработки маковые семена находятся внутри изделия, то существует достаточно высокая вероятность сохранения опийных алкалоидов. Однако в этом случае возникает вопрос количественного определения опиатов (в частности, морфина) в биологических жидкостях спортсмена [231–237].

Более подробная информация об обнаруженных запрещенных соединениях в спортивном питании и продуктах питания представлена в таблица 4.

Таблица 4 – Способы определения запрещенных веществ в продуктах и спортивном питании

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Условия разделения | Детектор | Предел обнаружения | Ссылка |
|--|--|---|---|--|------------|--------------------|--------|
| Кленбутерол | Свинина, говядина, баранина | Гомогенизация, экстракция, центрифугирование, щелочной гидролиз, ТФЭ (Waters Oasis MCX) | Sigma Chirobiotic T (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 10 мМ формиат аммония в метаноле | QqQ (ЭРИ+) | 0.2 мг/кг | [217] |
| Кленбутерол | Предтренировочные комплексы и жиросжигатели | Растворение и разбавление | Waters Acquity HSS T3 (100 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) | QqQ (ЭРИ+) | 0.1 мг/г | [218] |
| β-метилфенилэтиламин, β-фенилэтиламин, амфетамин | 110 жиросжигателей, комплексов для похудения, предтренировочных комплексов | Растворение, ультразвуковая экстракция | Imtakt Scherzo SM-C18 (150 × 4.6 мм, 3 мкм) | 0.3% р-р фосфорной кислоты в воде (А):10 мМ р-р дигидрофосфата калия в воде и ацетонитрил (20:80, v:v) | ДМД | 3–13 мкг/мл | [219] |
| | | | Waters Acquity VEN C18 (100 | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р | QqQ (ЭРИ+) | | |

| | | | | | | | |
|--|---|---|--|---|---|------------|-------|
| | | | × 2.1 мм, 1.7 мкм) | муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | | | |
| н-этил-α-этилфениламин, фенилэтиламин, н,н-диэтилфенилэтиламин | 18 образцов предтренировочных комплексов и жиросжигателей | Разбавление и растворение | Phenomenex Luna Hydro-RP C18 (150 × 3 мм, 4 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | Q-Trap (ЭРИ+), ЯМР (¹ H, ¹³ C) | 5–50 нг/мл | [220] |
| 1,3-диметилпентиламин, кофеин, β-фенилэтиламин | 5 образцов масла герани | ЖЖЭ | Agilent Ultra-2 (17 м × 0.2 мм, 0.25 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 87 °С до 310 °С | NPD, Q (ЭИ) | 3–50 нг/мл | [221] |
| 1,3-диэтиламиламин | 16 образцов жиросжигателей | ЖЖЭ | – | – | ЯМР (¹ H, ¹³ C) | 0.1 г/кг | [222] |
| Эфедрин, метилэфедрин, нерпсевдоэфедрин, норэфедрин | 15 жиросжигателей | Измельчение, экстракция, центрифугирование, разбавление | Alltech C-18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | 5 мМ р-р лаурилсульфата натрия в смеси ацетонитрил:ТГФ:вода (38:5:57, v:v:v) | УФ (208 нм) | 5 мг/мл | [223] |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|--|------------------|-------------|-------|
| 25 анаболических стероидов | 29 образцов концентратов протестина, 15 образцов креатинина | Измельчение, экстракция, ТФЭ (Bondesil PSA) | J&W Scientific (30 м × 0.25 мм × 0.1 мкм) и SGE BPX-50 (2 м × 0.1 мм × 0.1 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 110 °С до 300 °С | ТОФ (ЭИ) | 9–109 нг/мл | [224] |
| Нецелвой скрининг на анаболические стероиды и стимуляторы | 103 образца креатинина, аминокислот, прогормонов, ноотропов | Стимуляторы: экстракция; Анаболические стероиды: экстракция, дериватизация (MSTFA + DTT + йодид аммония) | Стимуляторы: Phenomenex Zebron ZB-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) Анаболические стероиды: J&W DB-XLB (15 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: стимуляторы: нагрев от 40 °С до 310 °С; Анаболические стероиды: нагрев от 150 °С до 310 °С | Q (ЭИ) | – | [225] |
| 11 стероидных гормонов | 7 образцов спортивного питания | Экстракция 1М едким натром, ЖЖЭ, упаривание, перерастворение | Chrompack Nucleosil ODS (100 × 3 мм, 5 мкм) | 0.1% р-р уксусной кислоты в воде (А):ацетонитрил (В) | ДМД (220–360 нм) | – | [226] |

| | | | | | | | |
|---|---|--|---|---|---------------------|---|-------|
| | | Экстракция 1М едким натром, ЖЖЭ, упаривание, дериватизация (MSTFA + DTT + йодид аммония) | Agilent Ultra-1 (17 м × 0.2 мм, 0.25 мкм), Agilent Ultra-1 (12 м × 0.2 мм, 0.11 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 120 °С до 300 °С | Q (ЭИ), QqQ (ЭИ) | | |
| Скрининг на анаболические стероиды | 634 образца спортивного питания различных классов | Экстракция 0.1М едким натром, ЖЖЭ, упаривание, дериватизация (MSTFA + DTT + йодид аммония) | Agilent HP-5MS (16.5 м × 0.2 мм, 0.25 мкм), | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 100 °С до 320 °С | QqQ (ЭИ) | – | [227] |
| Стимуляторы, наркотики, барбитураты, бензодиазепины | 40 образцов растительных БАД | DLLME | Knauer Euro-spher 100-3 C18 (100 × 3 мм, 5 мкм) | Фосфатный буферный раствор (pH = 2.32) (А):ацетонитрил (В) | ДМД | – | [228] |
| | | | Agilent HP-5MS (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм), | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 60 °С до 280 °С | Q (ЭИ) | | |

1.2 Анализ биологических жидкостей

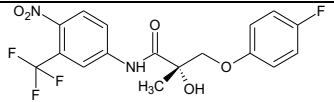
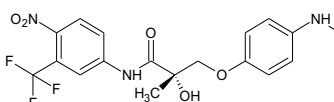
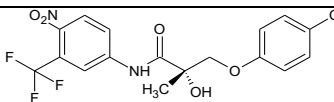
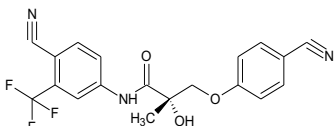
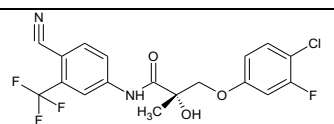
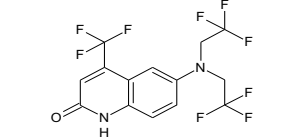
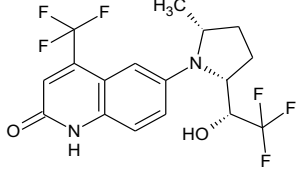
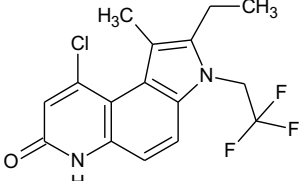
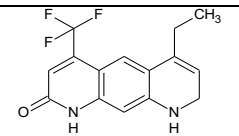
1.2.1 Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов

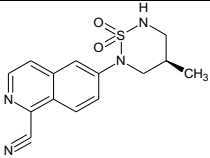
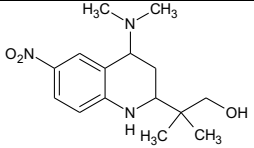
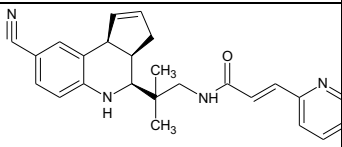
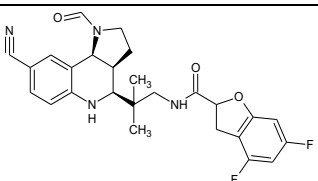
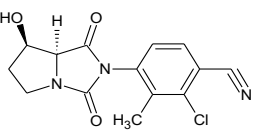
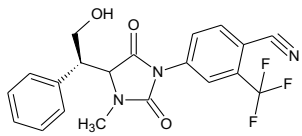
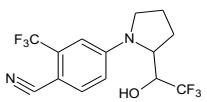
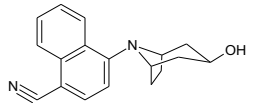
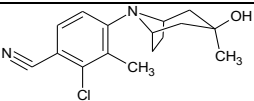
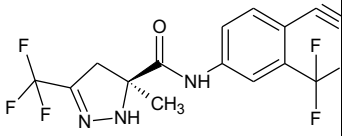
Андрогенные рецепторы – члены надсемейства ядерных рецепторов, активация которых происходит андрогенами, наиболее известным представителем которых является тестостерон. Под действием 5 α -редуктазы он трансформируется в организме в более активную форму – дигидротестостерон [238–240], также играющий важную роль в развитии и поддержании вторичных половых признаков у мужчин. Помимо этого, андрогены играют важную роль в мышечных и костных тканях у мужчин и женщин [241–244], что приводит к необходимости восполнения их недостатка в случае нарушений в их продуцировании организмом. Однако подобные гормональные терапии имеют существенные побочные эффекты, связанные с дальнейшим метаболизмом андрогенов экзогенного происхождения в организме. Так, в ходе реакции ароматизации [245, 246] тестостерон метаболизирует в 5 α -дигидротестостерон и эстрадиол, также обладающие высокой физиологической активностью. В последствии это может привести к нарушению продуцирования эндогенных гормонов.

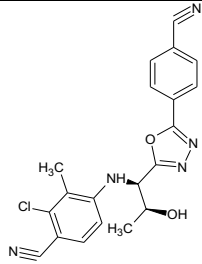
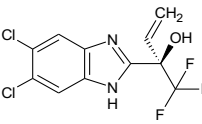
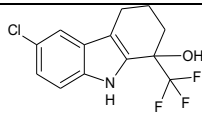
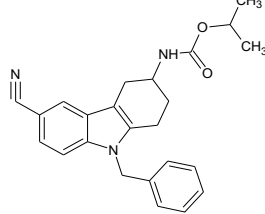
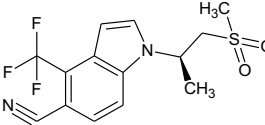
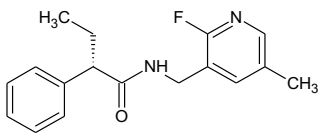
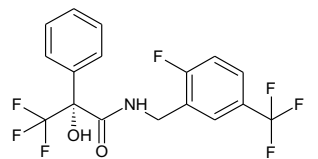
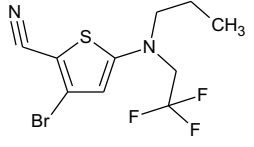
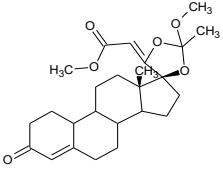
Это привело к поиску соединений, способных селективно активировать андрогенные рецепторы в определенных тканях, обладая, при этом меньшей активностью (или полным ее отсутствием) в органах малого таза, сердца и печени, тем самым делая их смешанными агонистами/антагонистами [247, 248]. Помимо этого, немаловажным вопросом для таких препаратов остается их биодоступность, цитотоксичность и фармакокинетика [249].

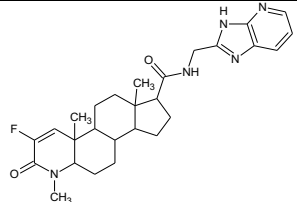
В настоящее время известно более десятка классов SARM, которые условно можно разделить на две группы: стероидные и нестероидные (таблица 5).

Таблица 5 – Классификация некоторых представителей селективных модуляторов андрогенных рецепторов

| Класс | Тривиальное название представителя класса | Элементный состав | Структурная формула представителя класса | Ссылка |
|------------------------------|---|---------------------------|---|--------|
| Производные арилпропионамида | S-1 | $C_{17}H_{14}F_4N_2O_5$ |  | [250] |
| | S-4 (GTx-007, андарин) | $C_{19}H_{18}F_3N_3O_6$ |  | [251] |
| | S-9 | $C_{17}H_{14}ClF_3N_2O_5$ |  | [252] |
| | S-22 (GTx-024, МК-2866, остарин) | $C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$ |  | [253] |
| | S-23 | $C_{18}H_{13}ClF_4N_2O_3$ |  | [254] |
| Производные хинолина | LGD-2226 | $C_{14}H_9F_9N_2O$ |  | [255] |
| | LGD-2941 | $C_{17}H_{16}F_6N_2O_2$ |  | [256] |
| | LGD-3303 | $C_{16}H_{14}ClF_3N_2O$ |  | [256] |
| | LG-121071 | $C_{15}H_{15}F_3N_2O$ |  | [257] |

| | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---|-------|
| | PF-06260414 | $C_{14}H_{14}N_4O_2S$ |  | [258] |
| Производные тетрагидрохинолина | S-40503 | $C_{15}H_{23}N_3O_3$ |  | [258] |
| | S-49288 | $C_{25}H_{26}N_4O$ |  | [252] |
| | S-101479 | $C_{26}H_{24}F_2N_4O_3$ |  | [259] |
| Производные гидантоина | BMS-564929 | $C_{14}H_{12}ClN_3O_3$ |  | [260] |
| Производные диарилгидантоина | DT-200 (GLPG0492) | $C_{19}H_{14}F_3N_3O_3$ |  | [261] |
| Производные пирролидина-бензонитрила | LGD-4033 (VK-5211, лигандрол) | $C_{14}H_{12}F_6N_2O$ |  | [261] |
| Производные тропанола | AC-262536 (сармастол) | $C_{18}H_{18}N_2O$ |  | [262] |
| | ACP-105 | $C_{16}H_{19}ClN_2O$ |  | [263] |
| Производные фенилпирозолкарбоксамиды | JNJ-28330835 | $C_{14}H_{10}F_6N_4O$ |  | [264] |

| | | | | |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------|---|-------|
| Производные фенил-оксадиазола | RAD-140 (радарин) | $C_{20}H_{16}ClN_5O_2$ |  | [265] |
| Производные бензоимидазола | JNJ-37654032 | $C_{11}H_7Cl_2F_3N_2O$ |  | [259] |
| Производные индола | RAD-35010 | $C_{13}H_{11}ClF_3NO$ |  | [260] |
| | LY-2452473 | $C_{23}H_{23}N_3O_2$ |  | [261] |
| | GSK2881078 | $C_{14}H_{13}F_3N_2O_2S$ |  | [262] |
| Производные пирдинил-метанамида | 2-FPA | $C_{17}H_{19}FN_2O$ |  | [252] |
| Производные фенилметанамида | MK-3984 | $C_{17}H_{12}F_7NO_2$ |  | [263] |
| Производные тиофена | NEP28 | $C_{10}H_{10}BrF_3N_2S$ |  | [264] |
| Стероидные | УК-11 (миостоп) | $C_{25}H_{34}O_6$ |  | [265] |

| | | | | |
|--|---------|-----------------------|---|-------|
| | МК-0773 | $C_{27}H_{34}FN_5O_2$ |  | [264] |
|--|---------|-----------------------|---|-------|

Помимо медицинского применения данные препараты, обладающие анаболическим действием, нашли применение и в профессиональном спорте в качестве допинг-агентов, что послужило причиной их внесения в перечень запрещенных соединений в 2008 году [266]. Несмотря на это, они продолжают активно распространяться на черном рынке, а ежегодно выходит не менее 10 новых соединений, которые могут быть отнесены к перспективным представителям данного класса, что делает актуальной своевременную разработку методов контроля SARM и их метаболитов в биологических жидкостях [267–290].

Метаболизм этих препаратов может быть описан классической схемой метаболизма ксенобиотиков в печени с участием цитохромов P450, что достаточно подробно представлено в [273], где приведены метаболиты андарина (рисунок 11).

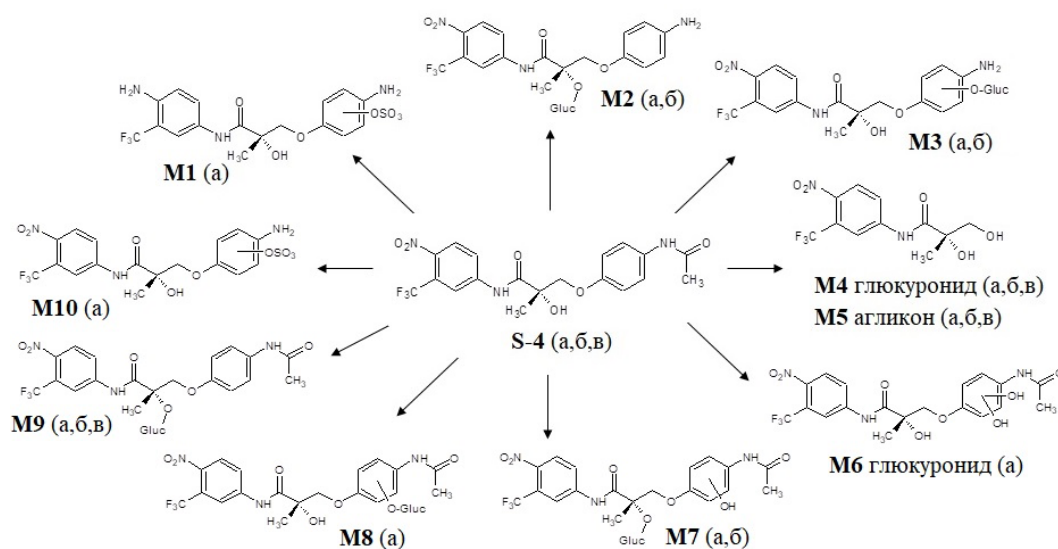


Рисунок 11 – Схема метаболизма андарина

Наиболее распространенным методом их определения является ВЭЖХ-МС/МС с учетом термолабильности многих селективных модуляторов андрогенных рецепторов и их метаболитов и особенностей превращения аналитов в организме. Так, если аналит выводится в нативном виде, при проведении скрининга целесообразен поиск исходного вещества и не только его метаболитов, поскольку позволит примерно очертить срок его употребления, однако широкие окна обнаружения возможны только в случае определения метаболитов, в том числе – долгоживущих (таблица 6, 7).

Таблица 6 – Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов в нативном виде в биологических жидкостях

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Подвижная фаза | Детектор | Предел обнаружения, нг/мл | Ссылка |
|--|----------------|---------------------|---|---|--------------------|---------------------------|--------|
| S-4 | Моча человека | Разбавление образца | Macharey-Nagel Nucleodur C18 Pyramid (50 × 2 мм, 3 мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % ледяную уксусную кислоту / ацетонитрил | QqQ / IT (ЭРИ+) | 1 | [273] |
| S-4, S-22, метаболит S-22, S-23, S-24 | Моча человека | Разбавление образца | Macharey-Nagel Nucleoshell RP18plus (50 × 2 мм, 2.7 мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / ацетонитрил | Orbitrap (ЭРИ+) | <0.1 | [274] |
| S-4 | Моча человека | Разбавление образца | Phenomenex Kinetex C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / 0.1 % муравьиная кислота в метаноле | QqQ (ЭРИ+) | 0.5 | [275] |
| S-1, S-4, S-22 | Лошадиная моча | Разбавление образца | Waters Aquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / метанол | Q-TOF (ЭРИ+) | - | [276] |

| | | | | | | | |
|---|---|-------------|---|---|------------------|-----|-------|
| AC-262536, S-1, S-4, S-6, S-9, S-22, S-23, BMS-564929, GLPG0492, LGD-2226, LGD-4033, LY-2452473, PF-06260414, RAD-140 | Моча человека, лошади, собаки, быка, мыши | ЖЖЭ | Phenomenex Luna Omega Polar C18 (100 × 2.1 мм, 1.6 мкм) | 0.1 % уксусная кислота в воде / 0.1 % уксусная кислота в метаноле | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | 1-5 | [277] |
| Производные арилпропионамида | Моча человека | ТФЭ (PAD-1) | Macherey-Nagel C-18 Isis (70 × 4 мм, 5 мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / ацетонитрил | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | 1 | [248] |
| S-22, S-23 и их метаболиты | Лошадиная моча | ТФЭ (PAD-1) | Waters XTerra RP18 Isis (150 × 2.1 мм; 3.5 мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / метанол | IT (ЭРИ+) | - | [278] |

| | | | | | | | |
|---|------------------|------------------|--|---|--------------|------|-------|
| Производные бензоимидазола и гидантоина | Моча человека | ТФЭ (PAD-1) | Macherey-Nagel Pyramid (70 × 4 мм, 5мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / ацетонитрил: метанол (1:1, по объему) | IT (ЭРИ+) | 1 | [279] |
| S-1, S-4, S-22 | Лошадиная моча | ТФЭ (C18; HLB) | Waters Aquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / метанол | Q-TOF (ЭРИ+) | - | [280] |
| S-40503 | Плазма человека | Осаждение белков | Macherey-Nagel Sphinx (70 × 4 мм, 5мкм) | 5 мМ ацетатный буфер, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / метанол | IT (ЭРИ+) | 8.3 | [281] |
| S-1, S-4, S-22 и их метаболиты | Лошадиная плазма | Осаждение белков | Aquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / метанол | Q-TOF (ЭРИ+) | - | [282] |
| S-1 | Плазма крыс | Осаждение белков | Waters Nova-pak C18 (150 × 3.9 мм, 4 мкм) | вода / ацетонитрил | IT (ЭРИ+) | <0.3 | [283] |

| | | | | | | | |
|---------------------|------------------|------------------|---|---|-----------------|----|-------|
| S-1, S-4, S-9, S-24 | Плазма человека | Осаждение белков | Hypersil gold C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.2 % муравьиная кислота в воде / ацетонитрил | Orbitrap (ЭРИ+) | 10 | [284] |
| S-4 | Лошадиная плазма | ТФЭ (C8/SCX) | Waters SunFire C18 (100 × 2.1 мм, 3.5 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / 0.1 % муравьиная кислота в метаноле | Orbitrap (ЭРИ+) | - | [285] |

Таблица 7 – Некоторые методы определения метаболитов селективных модуляторов андрогенных рецепторов в биологических жидкостях

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Подвижная фаза | Детектор | Предел обнаружения, нг/мл | Ссылка |
|--------------------------------|---------------|------------------------------|---|--|------------------|---------------------------|--------|
| LGD-4033 и метаболиты | Моча человека | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | Restek Raptor Biphenyl (100 × 2 мм, 2.7 мкм) | 25 мМ формиат аммония, содержащий 0.1 % муравьиную кислоту / ацетонитрил | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | - | [271] |
| S-4 и метаболиты | Моча человека | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | Phenomenex Synergi MAX (50 × 2 мм, 5 мкм) | - | QqQ / LIT (ЭРИ+) | 0.1 | [287] |
| S-4 и метаболиты | Моча человека | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | Aquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / 0.1 % муравьиная кислота в метаноле | Q-TOF (ЭРИ+) | - | [288] |
| Производные тетрагидрохинолина | Моча человека | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | Zorbax XDB-C8 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) | 5 мМ ацетат аммония, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / ацетонитрил: метанол (1:1, по объему) | IT (ЭРИ+) | 0.2-0.6 | [289] |

| | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------|--|--|--------------|--------|-------|
| Производные хинолина | Моча человека | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | Macherey-Nagel Sphinx (70 × 4 мм, 5 мкм) | 5 мМ ацетат аммония, содержащий 0.1 % уксусную кислоту / ацетонитрил | IT (ЭРИ+) | 0.05-1 | [290] |
| S-1, S-4, S-22 и метаболиты | Лошадиная моча | Ферментативный гидролиз, ТФЭ (HLB) | Aquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1 % муравьиная кислота в воде / метанол | Q-TOF (ЭРИ+) | - | [291] |

В большинстве случаев в рассмотренных методах используются те же методы пробоподготовки, что и при исследованиях с целью определения наркотиков, диуретиков, глюкокортикостероидов, стимуляторов и стероидов. Исключение составляют подходы, основанные на применении дисперсионной жидкость-жидкостной экстракции, в которых экстрагент и диспергент зачастую подбирают под конкретные аналиты, т.к. емкость экстрагента невысока по сравнению с классическими методами ЖЖЭ [278].

1.2.2 Определение фармацевтических препаратов («аптечных наркотиков»)

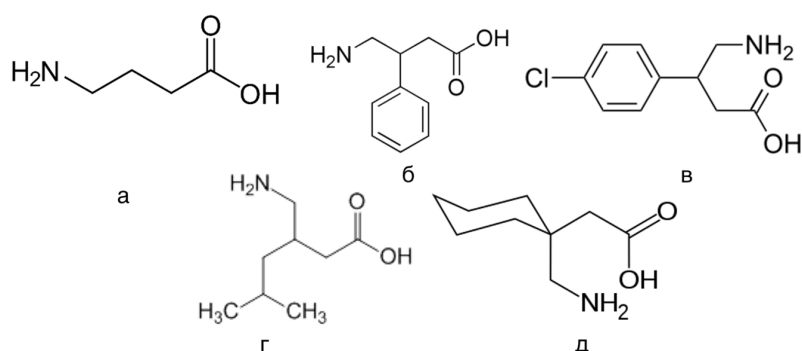
Применение фармацевтических препаратов в немедицинских целях – одна из наиболее распространённых проблем на территории многих стран, включая Россию, США, Канаду и Австралию. Совокупное употребление транквилизаторов и седативных средств в большинстве стран уступает лишь выявленным фактам употребления ТГК [292, 293].

Среди транквилизаторов особо распространено злоупотребление бенздиазепинами, такими как алпрозалам, клоназепам, даизепам и другие [294]. В целях усиления эффекта опьянения от их употребления лица, страдающие алкогольной зависимостью, нередко комбинируют их с крепкими алкогольными напитками. Одним из побочных эффектов такого сочетания может стать достаточно быстрая смерть.

С момента своего появления бенздиазепины очень популярны в США, где прямыми показаниями для их назначения является повышенная тревожность, бессоница, депрессия. Однако их употребление достаточно быстро приводит к возникновению медикаментозной зависимости, которую в последствии снимают вспомогательными препаратами под присмотром врачей. Это обстоятельство достаточно быстро стало причиной массового ввода всех актуальных бенздиазепинов в токсикологические скрининги [295]. С 2017 года на рынок вышел новый дизайнерский бенздиазепин, который разрешен в

ограниченном круге стран и в крайне малых дозировках – этиозалам. Помимо высокой эффективности, он обладает чрезвычайно высокой токсичностью, что делает крайне опасным его бесконтрольное распространение [293, 295].

Не меньшей известностью пользуются производные гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Высокая биодоступность даже при пероральном употреблении привело к их повсеместному распространению в медицине. Наибольшее распространение, на данный момент, получили такие её производные, как фенибут, баклофен, габапентин и прегабалин, более известный среди токсикологов, под своим торговым названием «лирика» (рисунок 12)



а – гамма-аминомасляной кислоты, б – фенибут, в – баклофен, г – прегабалина, д – габапентин

Рисунок 12 – Структурные формулы производных гамма-аминомасляной кислоты

На сегодняшний день определение производных ГАМК проводят как с помощью методов газовой [296, 297], так и с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии [298, 299].

При газохромато-масс-спектрометрическом определении прегабалина, принимая во внимание высокую температуру инжектора и то, что термостат газового хроматографа фактически является кинетическим реактором, необходимо учитывать его склонность в этих условиях к циклизации [296].

Определенные затруднения возникают и при ВЭЖХ-определении габапентина, ГАМК и прегабалина. В частности, оптимальным методом их определения в нативном виде является гидрофильная ВЭЖХ [298]. С другой стороны, после дериватизации с использованием о-фталевого альдегида,

дансилхлорида или FMOС-С1 [300–302], применение обращено-фазовой ВЭЖХ для определения этих аналитов также не представляет никаких сложностей.

Не меньшее распространение получили такие препараты, как трамадол, цикломед, тропикамид, атропин, кломид и другие [303–309]. Немаловажно, что для определения этих соединений количество методик, для реализации которых не требуется привлечение масс-спектрометрии, существенно больше. Отчасти это объясняется тем, что некоторые методы базируются на фармакопейных методиках, которые были адаптированы для уменьшения мешающих влияний при проведении исследований. Это значительно повышает их доступность при проведении анализа. Наиболее интересные работы, посвященные анализу соединений, которые могут быть объединены в группу «аптечных наркотиков» приведены в таблице 8.

Как видно из представленных данных, подходы к определению бенздиазепинов и других фармацевтических препаратов, обладающих психотропной активностью, практически идентичны применяемым для определения наркотиков [310–318].

Анализируя публикации последних лет, можно сделать вывод, что большинство из них направлены на развитие уже существующих методик. Учитывая высокую эффективность ионизации и схожесть физико-химических свойств новых бенздиазепинов, а также рост чувствительности и производительности современного аналитического оборудования, подобный подход представляется наиболее рациональным, особенно в отношении деятельности токсикологических лабораторий.

Принимая во внимание тот факт, что «аптечные наркотики» являются частным случаем токсикологического скрининга, в рамках которого выявляются также и наркотики, можно отметить тенденцию к адаптации универсальных подходов отбора, хранения и транспортировки проб, в которых особое внимание уделяется их стабильности (во избежание искажения результатов) [315–325]. В отношении подтверждающих методов анализа большое внимание

уделяется не только повышению чувствительности анализа, но и селективности и информативности – чем выше эффективность ионизации, тем больше вероятность возможности записи полного спектра ионов-продуктов с использованием даже инструментов низкого разрешения [320–324].

Таблица 8 – Некоторые методики определения «аптечных наркотиков» в биологических объектах

| Аналит | Объект | Пробоподготовка | Колонка | Условия разделения | Детектор | Предел детектирования | Ссылка |
|---|--------|------------------------------|--|--|--------------------|-----------------------|--------|
| Бромазепам, клоназепам, 7-аминоклоназепам | Моча | ТФЭ (Varian Tox-itube A) | Interchim Ur-tisphere ODB C18 (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 2 мМ формиат аммония в воде (pH = 3) (А):ацетонитрил (В) | QqQ (ЭРИ+) | 1-5 нг/мл | [314] |
| | Волосы | Щелочной гидролиз, ЖЖЭ | | | | 5-10 пг/мг | |
| Алпрозолам, диазепам, лоразепам, оксазепам, флу-нитразепам, кокаин, метамфетамин, опиаты, МДМА, МДА | Слюна | ЖЖЭ, дериватизация PFOC (ГХ) | Varian VF-1MS (15 м × 0.25 мм, 0.4 мкм), Waters Symmetry C18 (100 × 2.1 мм, 3.5 мкм) | ГХ: температурная программа: нагрев от 110 °С до 320 °С ВЭЖХ: 5 мМ ацетат аммония (А):ацетонитрил (В) | QqQ (ЭРИ+), Q (ЭИ) | 0.2–26 нг/мл | [315] |
| | Кровь | | | | | 0.9–58 нг/мл | |
| | Моча | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | | | | 4–207 нг/мл | |
| 23 бензодиазепина | Кровь | ЖЖЭ, дериватизация ТМАН | Agilent HP-5MS (30 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) | Газ-носитель – гелий; Температурная программа: нагрев от 120 °С до 295 °С | Q (ЭИ) | 0.52–177.2 нг/мл | [316] |

| | | | | | | | |
|--|--------|--|--|---|--------------------------|---------------|-------|
| Нитразепам, флу- нитразепам, ниметазепам | Моча | ЖЖЭ (ВЭЖХ); ЖЖЭ, дериватиза- ция MSTFA (ГХ) | Advance ACE5 (250 × 4.6 мм, 5 мкм); Agilent HP- 1MS (12 м × 0.2 мм, 0.33 мкм) | ГХ: газ-носитель: ге- лий; Температурная про- грамма: нагрев от 170 °С до 300 °С ВЭЖХ: 5% ацетонит- рила в 0.1% водном р-ре муравьиной кис- лоты (А):5% воды в 0.1% р-ре ацетонит- рила (В) | QqQ (ЭРИ+), Q (ЭИ) | 0.125–1 нг/мл | [319] |
| 13 бензодиа- зепинов | Моча | Ферментативный гидролиз, денатура- ция белка | Waters Ac- quity BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.2% р-р муравь- иной кислоты в мета- ноле (В) | QqQ (ЭРИ+) | 0.5-2 нг/мл | [320] |
| 43 бензодиа- зепина, зол- пиден, зопи- клон | Плазма | ТФЭ (Varian Focus) | Waters Ac- quity BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.05% р-р муравьи- ной кислоты в воде (А):0.05% р-р муравь- иной кислоты в мета- ноле (В) | Q (ЭРИ+) | 0.2-8 нг/мл | [321] |

| | | | | | | | |
|--|-----------------|---|---|---|------------|--------------|-------|
| Прегабалин, гамма-гидроксибутират, бетта-гидроксибутират, гамма-бутиралактон, 1,4-бутандиол | Кровь | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Waters Acquity HSS T3 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (А):метанол (В) | QqQ (ЭРИ+) | 4–1100 нг/мл | [325] |
| | Моча | Разбавление | | | | | |
| Габапентин | Сыворотка крови | Денатурация белка ацетонитрилом, дериватизация NBD-Cl | Shimadzu Shimpack CLC-C18 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) | Метанол:0.05 М фосфатный буферный раствор в воде (65:35, v:v) | ФЛД | 2 нг/мл | [326] |
| Трамадол, о-дезметилтрамадол, п-дезметилтрамадол | Моча | ЖЖЭ | Agilent HP-5MS (30 м × 0.25 мм, 0.5 мкм) | ГХ-МС | Q (ЭИ) | 5–10 нг/мл | [327] |

1.2.3 Определение синтетических наркотических средств

Одной из наиболее сложных задач является определение НС и их метаболитов в биологических объектах. В этом случае выбор объекта для анализа и целевых соединений определяется задачами, поставленными перед аналитиком. Синтетические каннабимиметики и катиноны в неизменном состоянии можно обнаружить в волосах [328–333], слюне [333–341] и препаратах крови (сыворотка или цельная кровь) [342–351].

Отбор волос или слюны является неинвазивной процедурой, и с этой точки зрения анализ этих объектов кажется предпочтительным. Однако, анализ волос позволяет установить лишь хронический характер употребления НС, а достоверность анализа слюны представляется не слишком высокой. Вследствие малого содержания НС анализ объектов требует применения методов, позволяющих достигать низких пределов обнаружения, например, ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций). Процедура подготовки проб определяется характером объекта: для волос она включает длительную (около 3 ч) экстракцию этанолом при обработке ультразвуком [328] или гидролиз матрицы в присутствии NaOH [330, 333]; для слюны – твердофазную экстракцию [335] или осаждение белков [340]. Анализ препаратов крови пригоден для установления острого характера отравления, поскольку концентрация ксенобиотиков (и особенно, синтетических каннабимиметиков) в крови быстро снижается со временем [343].

При проведении количественного анализа необходимо применение внутреннего стандарта, позволяющего учесть матричные влияния. Для этого пригодны дейтерированные аналиты, гомологи аналитов или иные вещества, близкие им по строению [352]. Для извлечения НС из биологических матриц проводится также экстракция в микроволновом поле [353–355]. Несмотря на то, что работ, посвященных подобному способу подготовки проб, мало, это направление стремительно набирает популярность.

Подобно волосам или слюне, отбор мочи также не является инвазивным; кроме того, моча обладает более простой матрицей, что облегчает

пробоподготовку. Эти преимущества, а также длительность присутствия НС и их метаболитов в моче, возможность применения сравнительно доступного метода анализа (ГХ-МС) делают эту среду в удобной для установления фактов употребления НС [99, 100]. Существенным недостатком мочи следует считать то, что в неизменном состоянии выделяется лишь часть НС (как правило, наиболее гидрофильные соединения [356]), в то время как значительная доля катинонов [357–365] и все синтетические каннабимиметики подвержены метаболизму. Для последних (кроме бензоиндольного производного АМ-2233) присутствие исходных соединений в моче практически исключено. Поскольку метаболиты НС, как правило, представляют собой неизвестные ранее соединения, а их содержание в биологических объектах невелико, то разработка методик их определения представляет собой составной процесс, причем отдельные стадии выполняются разными исследовательскими группами. В общей схеме этого процесса можно выделить три стадии:

1. Обнаружение и предположительная идентификация метаболитов. Как правило, неопределенность структурной идентификации касается положения функциональных групп в молекуле метаболита [366–400].

2. Синтез соединений-кандидатов на роль метаболитов. В настоящее время лидером в области синтеза подобных соединений является фирма Sauman Chemical [95].

3. Сопоставление хроматографических и масс-спектрометрических характеристик синтезированных соединений и обнаруженных метаболитов, окончательная идентификация метаболитов и разработка методик [401–411].

Для идентификации метаболитов на первой стадии могут быть использованы:

- биологические материалы людей [357, 358, 360, 362–364, 371–400];
- биологические материалы лабораторных животных [359, 361, 362, 364, 366, 367, 368–373, 375, 376];
- ферментные (*in vitro*) системы животных и человека [359, 364, 366, 367, 386, 389, 390, 393, 399, 400].

Применение животных (крыс) для получения метаболитов ограничено различием метаболических путей у крыс и человека [367, 372]. В последнее время получил распространение вариант работы *in vitro*, поскольку он позволяет выбирать нужные направления при поиске метаболитов в объектах *in vivo*.

В целом метаболический процесс разделяют на две (иногда три) последовательные фазы [412, 413]. Для рассматриваемых соединений при протекании процессов фазы I возможно как упрощение (N- или O-дезалкилирование, гидролиз), так и усложнение исходной структуры, заключающиеся в разнообразных вариантах окисления (моно- и поли-гидроксилирование, карбоксилирование, эпоксилирование и образование карбонильных групп). Обычно метаболиты фазы I более гидрофильны, чем исходное соединение и, следовательно, более пригодны для выделения с мочой. Фаза II представляет собой конъюгирование исходных соединений или метаболитов фазы I с мочевыми кислотами (глюкуроновая и сульфоновая), аминокислотами (глицин), пептидами (глутатион). Для моногидроксилированных метаболитов JWH-018 и JWH-073 этот процесс возможен с участием глюкуронилтрансфераз [400]. Очевидный рост гидрофильности при протекании фазы II способствует упрощению выделения метаболитов с мочой.

Вероятность обнаружения тех или иных соединений в моче (крови) определяется спецификой метаболизма исходного ксенобиотика; в целом же более гидрофобные соединения (синтетические каннабимиметики) подвержены более глубокому метаболизму, а менее гидрофобные (катиноны) могут выделяться с мочой в неизмененном состоянии. Для большинства синтетических каннабимиметиков (в том числе нафтоиндолов, фенилацетилиндолов, алканоилиндолов, индол- и индазол-карбоксамидов) наиболее вероятными процессами фазы I являются гидроксилирование и N-дезалкилирование. Наличие метоксигруппы в *n*-положении метоксифенильного остатка (RCS-4) приводит к ее деметилированию [380]. Для соединений с атомом фтора на конце боковых N-алкильных цепей характерно окислительное дефторирование, в

результате которого получается карбоксилированный метаболит [379, 386]. Сложноэфирная связь в структуре синтетического каннабимиметика (индол- и индазол-карбоксилаты) практически полностью омыляется, причем продукты подвержены дальнейшему окислению [396, 398]. Аналогичный процесс характерен и для концевой амидной связи [397].

Из-за высокой гидрофильности метаболитов фазы II для их определения в моче можно применять только метод ВЭЖХ-МС/МС [401], при этом подготовка пробы сводится к разбавлению образцов компонентами подвижной фазы и фильтрованию. Такой подход отличается экспрессностью, но характеризуется рядом затруднений, связанных с высокой гидрофильностью аналитов, значительной неопределенностью в определении их структур (при поиске) и отсутствием стандартных образцов (при количественном определении). В большинстве случаев эти затруднения заставляют выбирать в качестве аналитов метаболиты фазы I. Учитывая возможность конъюгирования, важной стадией пробоподготовки образцов мочи является гидролиз конъюгатов. Эта процедура проводится минеральным (кислотным или основным) или ферментативным способом и определяется характером связи между метаболитом фазы I и остальной структурой конъюгата.

При минеральном деконъюгировании для простой эфирной связи (гидроксилированные метаболиты фазы I) предпочтителен кислотный гидролиз, для сложноэфирной (карбоксилированные метаболиты фазы I) – основной. При кислотном гидролизе образцы мочи нагревают в присутствии HCl (30%) около часа при температуре 90–95°C [372], при основном – при температуре 60°C в течение 20 мин в присутствии NaOH. Достоинствами минерального деконъюгирования являются малая стоимость, недостатками – возможность модификации структур метаболитов фазы I.

При ферментативном деконъюгировании к образцу добавляют раствор β -глюкуронидазы определенного типа при контроле рН смеси [370, 386]. Условия инкубирования зависят от вида фермента, количества действующих единиц, температуры и рН пробы. Так, например, β -глюкуронидаза

E. coli обладает наибольшей активностью при pH 6–6.5 и температуре 40°C. Достоинством этого метода является мягкость условий, недостатком – селективность фермента, иногда приводящая к искажению метаболического профиля.

После деконъюгирования образец экстрагируют легкокипящим органическим растворителем, причем pH водной фазы определяется формой (молекулярная, анион или катион), в которой метаболит существует в растворе. Для незаряженной формы целесообразно экстрагировать основные растворы, что снижает содержание мочевых органических кислот в экстракте.

При использовании ГХ-МС необходимо получить производные деконъюгированных метаболитов. Наилучшим способом получения производных при определении метаболитов синтетических каннабимиметиков (гидроксилированные и карбоксилированные продукты) является силилирование; первичные и вторичные азотные группы удобно ацилировать. Алкилирование (метилирование) наиболее целесообразно при дериватизации индольного атома азота [382] и, в ряде случаев, при анализе кислот [396–398]. Получение производных метаболитов синтетических каннабимиметиков перфторацетилированием в подавляющем большинстве случаев непригодно из-за малой температурной стабильности производных [372–374]. В таблице 9 приведены изменения масс молекул или структурных остатков исходных соединений при описанных модификациях.

Таблица 9 – Изменение масс исходных соединений или их структурных остатков при метаболических процессах и способах получения производных

| Процесс | Изменение номинальной массы, Да |
|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Метаболизм, фаза I</i> | |
| Гидроксилирование | +16 |
| Образование карбонильной группы | +14 |
| Карбоксилирование | +40 |
| Дезметилирование | -14 |
| Дезпентилирование | -70 |
| Дефторирование и гидроксилирование | -2 |
| Дефторирование и карбоксилирование | +12 |
| <i>Метаболизм, фаза II</i> | |
| Сульфонирование | +80 |
| Глюкуронирование | +176 |
| <i>Получение производных</i> | |
| Ацетилирование | +42 |
| Трифторацетилирование | +96 |
| Триметилсилилирование | +72 |
| Метилирование | +14 |

При использовании ВЭЖХ-МС/МС производные обычно не получают, исключение составляют некоторые способы определения кислот [394]. В таблице 10 приведены условия определения ряда синтетических НС и их метаболитов в различных объектах.

Таблица 10 – Определение синтетических НС и их метаболитов в биологических объектах (дополненные данные [191])

| Аналит | Объект | Предел детектирования, нг/мл | Способ пробоподготовки | Колонка ГХ | ВЭЖХ | Тип масс-анализатора | Ссылка |
|--|-------------|--------------------------------|--|--|--|-----------------------------|------------|
| Метаболиты JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-210, JWH-250, RCS-4 | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | – | 150 × 2,1 мм Luna C18 (5 мкм) | Q-Trap (Скан) QqTOF | [387] |
| Метаболиты JWH-250 | Кровь, моча | – | Гидролиз (НСI), ЖЖЭ, ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) DB-17MS (15 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) EVDX 5MS (25 м × 0,20 мм × × 0,22 мкм) | 75 × 2,1 мм ProntoSIL-120-5- C8 AQ (5 мкм) | Q (Скан), с QqQ с MMP | [376, 377] |
| Метаболиты JWH-018, JWH-073 | Моча | 1,8–6 | Разбавление (неконъюгированная доля) или ферментативный гидролиз (общее содержание) | – | 150 × 4,6 мм Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 мкм) | Q-Trap (MBP) | [404] |
| JWH-018, JWH-073, JWH-200, JWH-250, | Волосы | (0,07– 10)·10 ⁻³ | Гидролиз (NaOH), ЖЖЭ | – | 30 × 2,1 мм Zorbax XDB-C18 | QQQ (MBP) | [329] |

| | | | | | | | |
|---|-------|-------|---------------------------------|---|--|---------------------------------------|-------|
| HU-210 | | | | | (1,8 мкм) | | |
| MDPV, фентанил, ме- федрон | Моча | 10 | Осаждение белка | – | 100 × 2,1 мм Hypersil GOLD C18 (1.9 мкм) | IT (МС) | [156] |
| Метаболиты JWH-018, JWH 073 | Моча | – | Гидролиз (HCl), ЖЖЭ, ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) EVDX-5MS (25 м × 0,20 мкм × 0,33 мкм) | 75 × 4,3 мм Zorbax 80SB-C18 (5 мкм) 75 × 2,1 мм ProntoSIL-120-5- C8 AQ (5 мкм) | Q (Скан), QqTOF, с QqQ с MMP | [372] |
| JWH-200, AM 694, JWH-250, JWH-073, JWH-018, JWH-019, JWH-122, HU-210, CP-47,497, 4-МЕС, MDPV, MBDB, мети- лон, мефедрон | Слюна | 1–20 | Разбавление | – | 100 × 2,1 мм Kinetex C18 (2,6 мкм) | QQQ (MMP) | [335] |
| Метаболиты JWH-018, JWH-073, JWH-398, JWH-250, JWH-122, JWH-019, JWH-200, RCS-4 | Моча | 0,1 | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | – | 100 × 2,1 мм AQUASIL C18 (5 мкм) | Q-Trap (MMP) | [405] |
| AM-694, AM-1241, WIN 55212-2, WIN 48.098 RCS-4, | Кровь | 0,5–5 | ЖЖЭ | – | 50 × 2,1 мм Eclipse C18 (5 мкм) | QQQ (MMP) | [348] |

| | | | | | | | |
|--|------|----------|---|--|---|-----------------|-------|
| С4-гомолог, RSC-8, JWH-030, JWH-015, JWH-302, JWH-073, JWH-250, JWH-203, JWH-081, JWH-019, JWH-210, JWH-018, JWH-007, JWH-398, CP-47,497 C7, CP-47,497 C8. HU-210, JWH-251 | | | | | | | |
| Метаболиты RSC-4 | Моча | – | Гидролиз (HCl), ЖЖЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [380] |
| Метаболиты JWH-018, JWH-073 | Моча | 0,1–0,19 | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | – | 150 × 4,6 мм Zorbax XDB-C18 (5 мкм) | Q-Trap (MBP) | [401] |
| Метаболиты AM-694 | Моча | – | Гидролиз (HCl), ЖЖЭ | VF-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | 150 × 4,6 мм Zorbax SB-C18 (5 мкм) | Q (Скан) | [379] |
| Метаболиты PB-22 | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [398] |
| Метаболиты PB-22, PB-22F | Моча | – | Гидролиз (NaOH, HCl, фермента- тивный), ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [396] |

| | | | | | | | |
|---|-------|-----------|---|---|--|---|-------|
| Метаболиты AB-PINACA | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [395] |
| Метаболиты AM-2201, UR-144 | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | HP-Ultra 1 (12 м × 0,2 мм × × 0,33 мкм) | 100 × 2,1 мм Waters Acquity BEH C18 (1.7 мкм) | Q (Скан) QQQ (Скан, MMP) Orbitrap | [386] |
| 30 Синтетических кан- набиноидов | Слюна | 0,015–0,9 | Разбавление | – | 50 × 2,1 мм Luna Phenyl Hexyl (5 мкм) | Q-Trap (MMP) | [339] |
| Метаболиты JWH-018 | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | TR-5MS (15 м × 0,25 мм × × 0,1 мкм) | 50 × 2,1 мм Hypersil Gold (1,9 мкм) | Q (Скан) QQQ (Скан) | [370] |
| Метаболиты JWH-203, JWH-251 | Моча | – | Гидролиз (HCl, ферментативный), ЖЖЭ | VF-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | 150 × 4,6 мм Zorbax SB-C18 (5 мкм) | Q (Скан), QqQ (MC/MC) | [384] |
| Метаболиты AB-001 | Моча | – | Гидролиз (HCl), ЖЖЭ | VF-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [378] |
| Метаболиты UR-144 и продукта его пиролиза | Моча | – | Гидролиз (HCl, ферментативный), ЖЖЭ | VF-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | 150 × 4,6 мм Zorbax SB-C18 (5 мкм) | Q (Скан), QqQ (MC/MC) | [381] |
| 3-Бромметкатинон, 3-фторметкатинон и метаболиты | Моча | – | ЖЖЭ с последую- щей ТФЭ | HP-1MS (12 м × 0,2 мм × × 0,33 мкм) | 150 × 4,6 мм Grace Davis Dis- covery Science | Q (Скан), Orbitrap | [359] |

| | | | | | С18/катионнооб- менная колонка (5 мкм) | | |
|--|--------|-------------------|---------------------------------|---|--|----------------------|-------|
| Мефедрон | Волосы | 0,2 нг/мг | ЖЖЭ | Неполярная (наименование отсутствует) (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | – | Q (МВИ) | [333] |
| Мефедрон, MDPV, мет- катинон | Кровь | 25 нг/мл | ЖЖЭ | DB-1 (12 м × 0,2 мм × × 0,33 мкм) | – | Q (Скан) | [351] |
| Амфетамин, метамфе- тамин, эфедрин, метка- тинон, норэфедрин | Моча | 1,5–6,25 нг/мл | ЖЖЭ | DB-5 (5 м × 0,1 мм × × 0,1 мкм) | – | Q (МВИ и Скан) | [356] |
| Пирролидинпропиофе- нон (PPP) и метаболиты | Моча | – | ТФЭ | HP-1MS (12 м × 0,2 мм × × 0,33 мкм) | – | Q (МВИ и Скан) | [365] |
| 25 Дизайнерских кати- нонов | Кровь | 10 нг/мл | ЖЖЭ | – | 150 × 4,6 мм Eclipse XDB-C18 (5 мкм) | QQQ (ММР) | [351] |
| Метилон | Кровь | 100 нг/мл | ЖЖЭ | RTX-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | – | Q (МВИ и Скан) | [413] |
| MDPV и метаболиты | Моча | – | Ферментативный гидролиз, ТФЭ | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | – | Q (Скан) | [358] |

1.2.4 Определение природных наркотических и психоактивных веществ

Основные подходы и пути протекания обмена веществ идентичны и природных, и для синтетических НС и ПВ, поэтому основной интерес представляет всегда определение метаболитов и нативных веществ (если это возможно) в биожидкостях.

Типичным липофильным соединением, практически полностью метаболизирующимся в организме, является Δ^9 -ТГК. Основным и наиболее часто определяемым маркером его употребления является 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота (ТНСА) (рисунок 13), которая может быть обнаружена как в свободном, так и в конъюгированном виде в моче.

Наиболее простым и экспрессным способом определения природных каннабиноидов в моче является метод ИФА, обладающий достаточно высокой чувствительностью, с последующим подтверждением хроматографическими методами анализа, что позволяет исключить возможные ложноположительные результаты.

Одной из особенностей Δ^9 -ТГК и других каннабиноидов является их депонирование в организме. Так, при эпизодическом употреблении каннабиноидов возможно их определение в течение 14–30 дней, а при хроническом – до двух месяцев [415]. Оптимальным объектом исследований в таких случаях являются волосы, поскольку процедура их отбора не является инвазивной. Выделение аналитов обычно проводят при использовании минерального гидролиза [414–416].

Другим распространенным представителем природных наркотических средств является морфин. Наступление наркотического опьянения при использовании опиатов происходит очень быстро. При внутривенном их введении максимальный эффект достигается уже через несколько минут, а период полувыведения составляет около 2 часов. Несмотря на это, следы морфина в моче могут быть обнаружены и через 3–4 суток после употребления [417]. Типичными метаболитами морфина и кодеина (основных представителей

опийных алкалоидов) являются продукты деметилирования и конъюгирования с глюкуроновой кислотой [417, 418] (рисунок 14). При определении опиатов в биологических материалах особое внимание необходимо уделять наличию в образце кодеина, с учетом того, что последний может использоваться и в лекарственных целях.

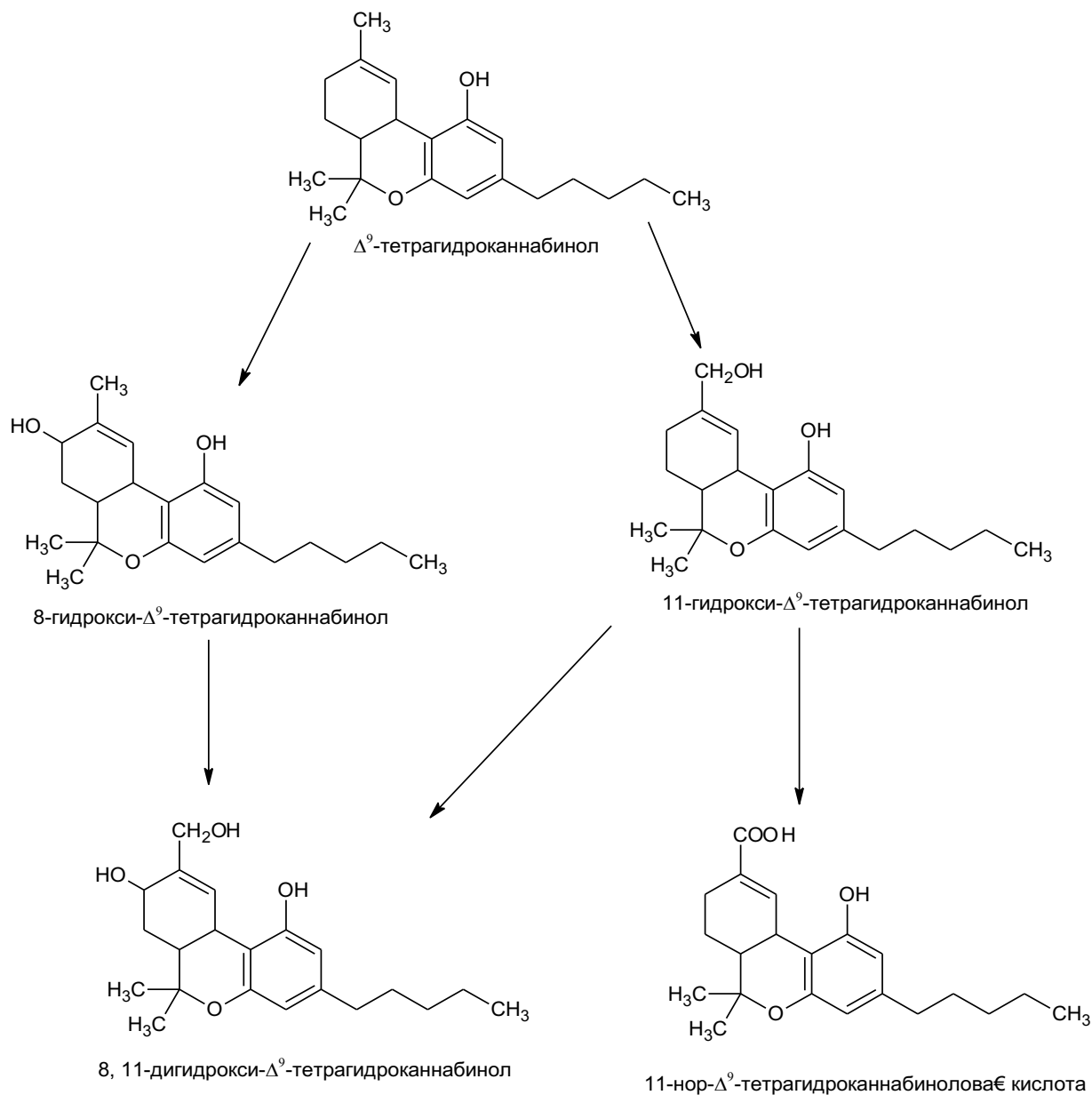


Рисунок 13 – Схема метаболизма Δ^9 -ТГК

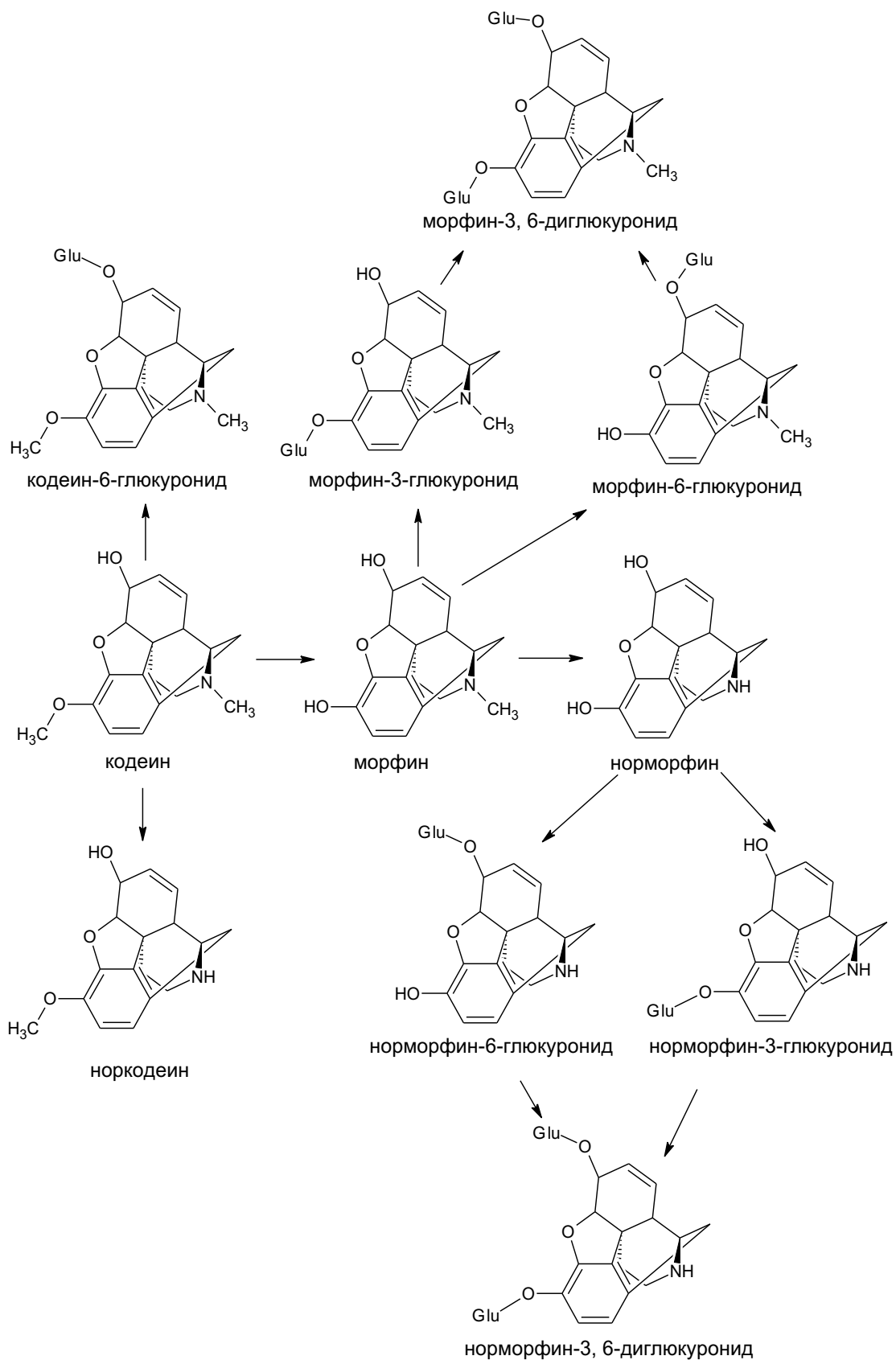


Рисунок 14 – Схема метаболизма кодеина и морфина

В случае обнаружения в биологических материалах морфина и/или его метаболитов, можно сделать вывод как об употреблении самого морфина, так и его производных, и, в первую очередь, кодеина или героина. Последний является диацетил-производным морфина, а одним из характерных метаболитов является общий для этих трех соединений морфин-3-глюкуронид. В этом случае, для установления типа НС, целесообразно провести поиск другого, более характеристичного метаболита героина – 6-моноацетилморфина (**6-МММ**) (рисунок 15) [419–424].

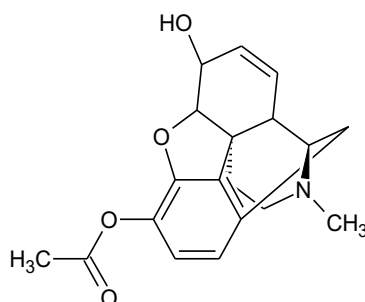


Рисунок 15 – Структурная формула 6-моноацетилморфина

Следует отметить, что при определении опиатов методом ИФА возможно установление только суммарного их содержания при учете разной чувствительности метода к соединениям этой группы.

Другим широко известным НС природного происхождения является кокаин, представитель ряда тропановых алкалоидов, таких, как атропин и скополамин, являющиеся сильнодействующими галлюциногенными веществами. Как и для рассмотренных выше соединений, для него характерно быстрое выведение из организма, при этом можно отметить 2 основных метаболита и, как минимум, 5 минорных (рисунок 16), хорошо описываемых основными путями метаболизма (гидролиз, деметилирование, гидроксигирование) [425].

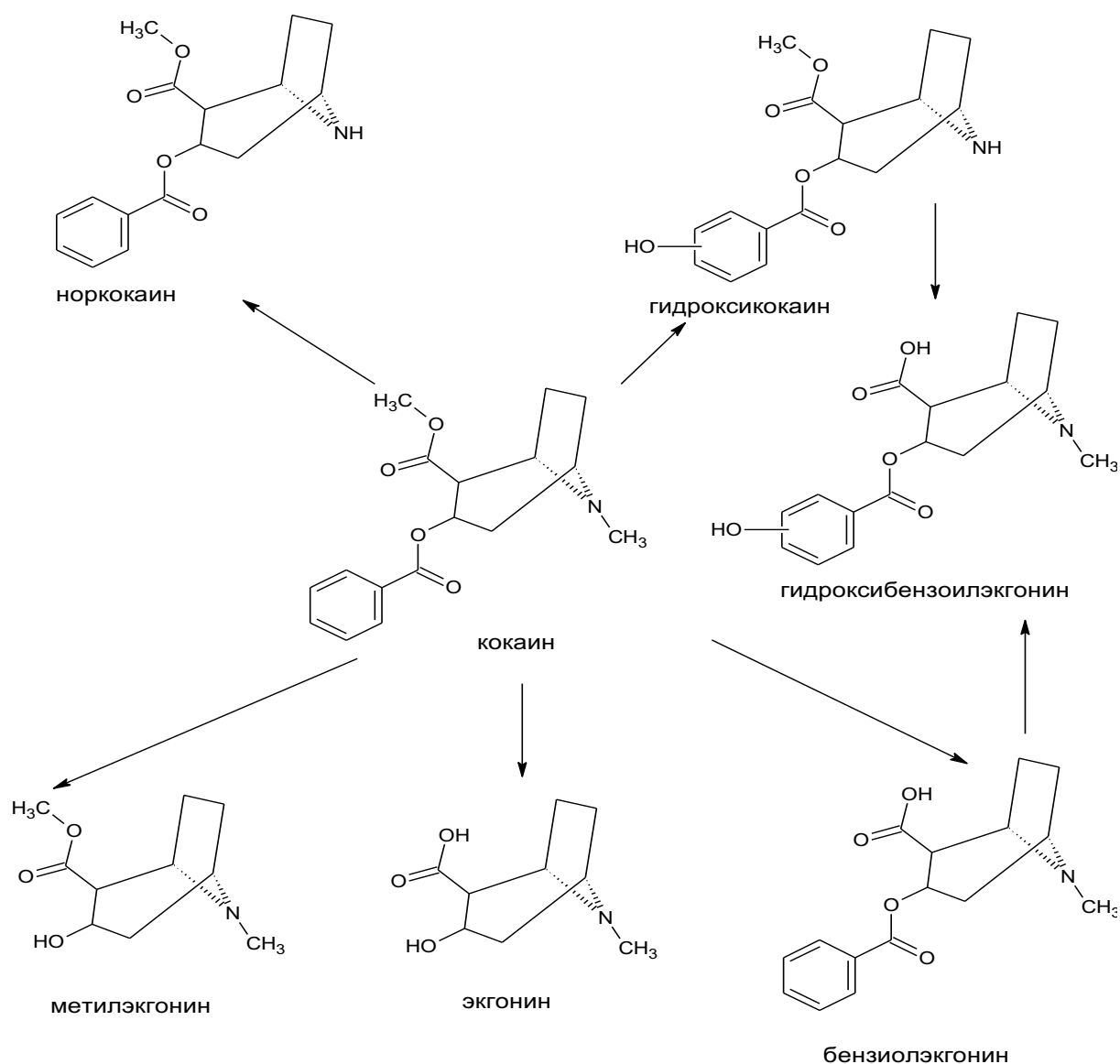


Рисунок 16 – Краткая схема метаболизма кокаина

При рассмотрении статистики отравлений тропановыми алкалоидами привлекают внимание необычные случаи интоксикации атропином и скополамином вследствие употребления «травяных чаев» или экзотических напитков, в составах которых могут оказаться растения, содержащие тропановые алкалоиды в больших количествах [426–428]. Ситуация усугубляется тем, что они легко всасываются через слизистую оболочку, а внутри организма быстро гидролизуются. Поэтому для установления степени передозировки тропановыми алкалоидами в трупном материале (печень, желудок, кровь), как правило, проводится определение не метаболитов, а нативных соединений.

Ввиду большого разнообразия объектов исследования, способов их анализа [414–458] рассмотреть все публикации по данному направлению практически невозможно. В таблице 11 приведена выборка из основных работ, посвященных способам определения наиболее распространенных НС природного происхождения и их производных в биологических материалах человека и лабораторных животных.

При анализе биологических материалов методами ГХ-МС и ГХ-МС/МС, как правило, требуется предварительная подготовка проб, в частности, деконъюгация и дериватизация метаболитов.

Наиболее распространенными способами дериватизации являются ацетилирование (перфторацетилирование), а также силилирование с использованием MSTFA или BSTFA [436, 438, 440, 442–444].

Таблица 11 – Способы определение наиболее распространенных НС природного происхождения и их производных в биологических материалах человека и лабораторных животных

| Аналит | Объект | Предел детектирования | Экстракция | Метод анализа | Колонка | Условия | Ссылка |
|---|--------|-----------------------|--|--|--|--|--------|
| ТГК, КБД, КБН, ТГК-СООН | Волосы | 5–50 пг/мг | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | 1: ГХ-МС (ЭИ, Q); 2: ГХ-МС (ХИ(-); Q) | НР Ultra 2 (12 м × 0.20 мм × 0.33 мкм) | 1: 150°C (1 мин) → 270°C (20°C/мин); 270°C (5 мин); 2: 150°C (2 мин) → 230°C (20°C/мин) → 270°C (10°C/мин); 270°C (1 мин) | [458] |
| КБН, КБД, ТГК | Волосы | 7–31 пг/мг | Щелочной гидролиз, ТФЭ–ТД | ГХ-МС (ЭИ, IT) | VF-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | 100°C → 280°C (15°C/мин); 280°C (6 мин) | [412] |
| Морфин, кодеин, гидрокодон, гидроморфон | Моча | 50 нг/мл | Кислотный гидролиз, ТФЭ, дериватизация | ГХ-МС (ЭИ, Q) | 10 м × 0.15 мм × 0.12 мкм | 150 (0.5 мин)°C → 300°C (40°C/мин) | [415] |
| Морфин, кодеин, метадон, бупренорфин | Моча | 0.05–1.5 нг/мл | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | ВЭЖХ-МС/МС (ЭРИ, QqQ) | Poroshell 120 EC-C18 (100 × 2.1 мм, 2.7 мкм) | 80% А → 50% А (2 мин); 50% А → 10% А (1 мин); 10% А : 90% В (1 мин); 10% А → 80% А (0.2 мин); 80% А : 20% В (1 мин); А – 0.1% HCOOH; | [416] |

| | | | | | | | |
|---|--------|----------------------|-------------------------------------|--------------------------|--|--|-------|
| | | | | | | В – 0.1% HCOOH + CH ₃ OH | |
| Морфин, ко- деин, метамфе- тамин, амфета- мин, MDA, MDMA, PMA, гидроморфон, гидрокодон, норкодеин, ок- сикодон, окси- морфон, этил- морфин, мепе- ридин, 6-МАМ, фентанил, нор- фентанил, тра- мадол, бупре- норфин, бен- зиолэксгонин, метадон, ко- каин, метилэк- гонин | Волосы | 0.006–0.063 нг/мг | у/з извлечение метанолом, ТФЭ | ВЭЖХ-МС/МС (ЭРИ, QqQ) | Acquity UPLC VEN Phenyl (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 95% А : 5% В (1.5 мин); 95% А → 75% А (2.5 мин); 75% А → 50% А (3 мин); 50% А → 5% А (1.5 мин); 5% А → 95% А; 95% А : 5% В (3.9 мин); А – 0.1% HCOOH; В – 0.1% HCOOH + CH ₃ OH | [420] |
| Морфин, ко- деин, 6-ацетил- морфин, ко- каин, бензилэк- гонин, метадон | Плазма | 10–55 нг/мл | ТФЭ | ВЭЖХ-ДМД | XTerra RP8 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | 90% А → 85% А (5 мин); 85% А → 80% А (2 мин); | [422] |

| | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------|---|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|-------|
| | | | | | | 80% А → 65% А (3 мин); 65% А → 50% А (5 мин); 50% А : 50% В (5 мин); 50% А → 90% А (2 мин); А – фосфатный буфер (рН 6.3); В – CH ₃ CN | |
| Атропин, скополамин | Желудок, печень | ВЭЖХ-ДМД: 1 мкг/мл ВЭЖХ-МС: 10–100 пг/мл | Экстракция фосфатным буфером, ТФЭ | ВЭЖХ-ДМД-МС (ЭРИ, Q) | XTerra Phenyl (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 10% А → 80% А (20 мин); 80% А : 20% В (4 мин); А – CH ₃ CN; В – 10 мМ CH ₃ COONH ₄ | [426] |
| Атропин, скополамин | Волосы | 2 пг/мг | Экстракция фосфатным буфером (рН 8.4), ЖЖЭ, упаривание и перерастворение сухого остатка | ВЭЖХ-МС/МС (ЭРИ, QqQ) | XTerra MS C18 (100 × 2.1 мм, 3.5 мкм) | 5% А → 60% А (3 мин); 60% А → 80% А (4 мин); 80% А : 20% В (3 мин); 80% А → 5% А (0.5 мин); 5% А : 95% В (9.5 мин); А – CH ₃ CN; В – 10 мМ HCOONH ₄ | [427] |
| Триптофан, серотонин, | Моча | 10–30 нг/мл | Разбавление, ТФЭ | ТСХ, спектрофлуориметр, ГХ-МС (ЭИ, Q) | Пластины C18, силикагель; DB-1MS | Пластины C18 – ацетонитрил: 28% аммиак (28:1.5, v:v); | [429] |

| | | | | | | | |
|--|----------------------------------|--------------|------------------------------------|-----------------------|--|--|-------|
| 5-MeO-DIPT, 5-MeO-DMT, 5-MeO-DPT, 5-MeO-MIPT, DIPT, DPT, 5-AcO-DIPT, АМТ | | | | | (12 м × × 0.20 мм × × 0.33 мкм) | Пластины с силикагелем – метанол: 28% аммиак (100:1.5, v:v); 50°C (2 мин) → 250°C (20°C/мин); 290°C (32 мин) | |
| Кокаин, бензоилэксгонин, метилэксгонин | Волосы | >10 нг | Кислотный гидролиз, ТФЭ | ГХ-МС (ЭИ, Q) | – | – | [430] |
| ТГК-СООН, ТГК-СООН-Glu | Моча | 10 нг/мл | Ферментативный гидролиз | ВЭЖХ-МС/МС (ЭРИ, QqQ) | RP-C8-select B (125 × 2.1 мм, 5 мкм) | 90% А → 70% А (6.6 мин); 70% А → 30% А (20 мин); 30% А → 10% А (6.7 мин); 10% А : 90% В (4 мин); А – 5 мМ НСООН ₄ + 0.1% НСООН (рН 3); В – СН ₃ CN + 0.1% НСООН | [431] |
| Аконтин, котинин, ибобаин, колхицин, анабасин, атропин, кодеин, никотин, | Сердечная кровь, сыворотка, моча | 0.3–94 нг/мл | ТФЭ, упаривание, перераспределение | ВЭЖХ-ДМД | EC 250/4 NUCLEODUR Sphinx RP-C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | 10% А : 90% В (15 мин); 10% А → 75% А (23.5 мин); 75% А : 25% В (9 мин); А – СН ₃ CN; | [432] |

| | | | | | | | |
|---|--------|-------------|--|---|--------------------------------------|---|-------|
| скополамин, стрихнин, йохимбин, гармин, бруцин | | | | | | В – 10 мМ фосфатный буфер (рН 6.5) | |
| Морфин, эфедрин, петидин | Моча | 20–50 нг/мл | микроЖЖЭ | ВЭЖХ-ДМД | Hypersil C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | 88% А : 12% В (6 мин); 10% А → 75% А (23.5 мин); 75% А : 25% В (9 мин); | [433] |
| Морфин, кодеин, тебаин, папаверин, носкапин, меконная кислота, морфин-3-глюкоронид, морфин-6-глюкоронид | Моча | 10 нг/мл | ТФЭ, упаривание, перераспределение | ВЭЖХ -МС (ХИАД, Q) | Inertsil ODS–3 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) | 5% А → 30% А (20 мин); 30% А : 70% В (10 мин); 30% А → 5% А (5 мин); 5% А : 95% В (10 мин); А – CH ₃ CN; В – 50 мМ HCOONH ₄ (рН 3) | [434] |
| Псилоцин, псилоцибин | Моча | 10 нг/мл | Ферментативный гидролиз | ВЭЖХ-ЭХД | Spherisorb RP-8 | 46% А : 54% В А – 0.3 М CH ₃ OONH ₄ (рН 8.3) В – CH ₃ OH | [435] |
| Морфин, кодеин, 6-ацетилморфин, амфетамин, метамфетамин, | Волосы | 2–80 пг/мг | Экстракция (метанол:ТФУ), ТФЭ, упаривание, дериватизация | 1: ГХ-МС (ЭИ, Q) 2: ГХ-МС (ХИ(–), Q) | HP-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | 150°C (1 мин); 150°C → 210°C (20°C/мин); 210°C (0.1 мин); | [436] |

| | | | | | | | |
|---|-------------------------|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|---|--|-------|
| кетамин, MDMA, MDA | | | | | | 210°C → 240°C (20°C/мин); 240°C (0.1 мин); 240°C → 250°C (10°C/мин); 240°C (1 мин); 250°C → 280°C (20°C/мин); 240°C (2 мин) | |
| ТГК, КБД | Кровь, мозг, моча | – | микроТФЭ на мембране | ВЭЖХ-МС (ХИАД, Q) | С18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | – | [437] |
| Атропин, ско- поламин | Плазма, моча | 5 нг/мл | ТФЭ, deriva- тизация | ГХ-МС (ЭИ, Q) | НР-5MS (30 м × 0,25 мм × × 0,25 мкм) | 50°C (1 мин); 50°C → 300°C (20°C/мин); 300°C (5 мин); | [438] |
| Морфин, ко- деин, кокаин, бензоилэкто- нин, амфета- мин, метамфе- тамин, MDMA, MDEA | Слюна | 0.22–1.07 нг/мл | ТФЭ | ВЭЖХ-МС/МС (ЭРИ, QqTOF) | Hypersil BDS phenyl (100 × 2.1 мм, 3 мкм) | 6% А → 41.2% А (20 мин); 41.2% А → 6% А (0.5 мин); 6% А : 94% В (7.5 мин); А – CH ₃ ОН + 10 мМ CH ₃ ООНН ₄ ; В – 10 мМ CH ₃ ООНН ₄ | [439] |
| Морфин, ко- деин, героин, 6- МАМ, кокаин, | Волосы | 0.01–0.05 нг/мг | Экстракция (метанол), упаривание, | ГХ-МС (ЭИ, Q); ИФА | НР-5MS (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) | 180°C (1 мин); | [440] |

| | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|-----------------|--|------------------------|--|--|-------|
| бензоилэкгонин | | | перерастворение, дериватизация | | | 180°C → 190°C (15°C/мин); 190°C (10 мин); 190°C → 250°C (5°C/мин); 250°C → 290°C (10°C/мин); | |
| Бензоилэкгонин, амфетамин, кокаин, кодеин, метамфетамин, MDA, MDEA, MDMA, 6-МAM, морфин | Волосы | 0.05–0.2 нг/мг | у/з извлечение метанолом, упаривание, перерастворение | ВЭЖХ-МС/МС (ХИАД, QqQ) | LiChroCART (125 × 3 мм, 5 мкм) | 5% А : 95% В (2 мин); 30% А → 70% А (30 мин); 30% А : 70% В (2 мин); 30% А → 5% А (8 мин); А – CH ₃ CN; В – 0.1% HCOOH | [441] |
| Метилэкгонин, бензоилэкгонин, кокаин, кодеин, морфин, 6-ацетилморфин, скополамин | 1: волосы; 2: моча | 0.02–0.09 нг/мг | 1: щелочной гидролиз, ТФЭ, упаривание, дериватизация; 2: разбавление, ТФЭ, упаривание, дериватизация; | ГХ-МС (ЭИ, Q); ИФА | HP Ultra 2 (12 м × 0.20 мм × 0.33 мкм) | 100°C (2.25 мин); 100°C → 180°C (40°C/мин); 180°C → 290°C (10°C/мин); 290°C (5 мин) | [442] |

В последнее время все большее применение в рассматриваемой области получает метод ВЭЖХ-МС/МС, который позволяет проводить определение НС и их метаболитов в виде конъюгатов и свободных соединений практически без предварительной подготовки проб биологических жидкостей («Dilute and Shoot») [456]. В то же время, необходимо учитывать то обстоятельство, что матричные эффекты сильнее всего выражены именно в ВЭЖХ-МС/МС, поэтому выбор метода напрямую зависит от диапазона определяемых концентраций и допустимой ошибки определения аналитов. Частично матричные эффекты в ВЭЖХ-МС/МС могут быть устранены за счет использования масс-спектрометрии высокого разрешения, получившей широкое распространение в последнее время благодаря квадруполь-времяпролетным системам и орбитальным ловушкам [457]. В ряде случаев они позволяют добиться большей чувствительности по сравнению с некоторыми QqQ-системами за счет точности определяемых масс и, как следствие, улучшения соотношения сигнал/шум. Однако, при проведении многокомпонентного количественного анализа в режиме ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии они могут проигрывать в чувствительности ионным ловушкам, тройным квадрупольным и тройным квадрупольным системам с функцией линейной ионной ловушки для третьего квадрупольного за счет более низких скоростей сканирования, что может стать критичным при уменьшении ширины пиков в УВЭЖХ [459]. Стоит отметить тенденцию к увеличению скоростей сканирования систем высокого разрешения, что, вероятно, может со временем полностью решить данную проблему.

1.2.5 Определение релизинг-пептидов гормона роста

Среди объектов допинг-контроля особое место занимает гормон роста и его синтетические аналоги, поскольку их употребление способствует росту мышечной и костной ткани, уменьшению жировой прослойки, ускорению

заживления ран и скорости восстановления [460]. Однако сам гормон роста имеет ряд серьезных недостатков, таких, как низкая биодоступность и нестабильность, что быстро привело к поискам его синтетических аналогов, обладающих к тому же более простой структурой. На сегодняшний день наибольшее распространение получили рилизинг-пептиды гормона роста класса (Growth Hormone Releasing Peptides, **GHRP**), механизм действия которых направлен на стимуляцию выработки гормона роста. Основная сложность при обнаружении подобных соединений заключается в том, что их окно обнаружения после употребления крайне мало. Зачастую, уже спустя 24 часа, обнаружить нативные пептиды не представляется возможным. Немного лучше обстоят дела с их метаболитами, позволяющими расширить окно обнаружения до нескольких дней, однако, если исследуемая проба подвергнется деградации, обнаружить в ней соединения пептидной природы практически невозможно.

Помимо соединений класса GHRP большой интерес со стороны антидопинговых лабораторий вызывают соединения, относящиеся к механическим факторам роста (**MGF**) и другие пептиды, оказывающие схожее воздействие, такие как ипаморелин, селанк, гонадорелин, ТВ-500 и другие, в том числе, ПЭГилированные формы пептидов, направленные на пролонгацию эффекта нативных соединений [461–466].

Огромный разброс молекулярных масс и свойств аналитов привел к появлению большого количества методов их обнаружения, среди которых стоит выделить электрофорез [467–469], ELISA [470–472] и ВЭЖХ-МС/МС [473–486]. Наилучшие результаты, сочетающие в себе высокую селективность и специфичность, удается добиться сочетанием хроматографических и масс-спектрометрических методов. Однако даже в этом случае возникает ряд серьезных проблем, в том числе и инструментальных.

В случае применения тройных квадрупольных масс-спектрометров необходимо учитывать доступный диапазон сканирования масс, поскольку ряд инструментов имеет ограничение до m/z 1250, хотя на данный момент на

рынке присутствуют инструменты, позволяющие работать с соединениями, имеющими m/z до 3000. Несколько облегчает ситуацию то обстоятельство, что большинство соединений пептидной природы склонны к образованию полизарядных ионов и таким образом ряд соединений пептидной природы может быть обнаружен даже с использованием приборов, имеющих очень узкий диапазон рабочих масс. В таблице 12 приведены некоторые известные работы, посвященные определению рилизинг-пептидов и подобных им соединений.

Таблица 12 – Методы определения релизинг-пептидов гормона роста в биологических жидкостях

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Условия разделения | Детектор | Предел обнаружения | Ссылка |
|--|---------------------|---|--|--|-----------------|--------------------|--------|
| GHRP-2 и его метаболит | Моча | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Waters Acquity BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% p-p ТФУ в воде (А):0.1% p-p ТФУ в метаноле (В) | QqQ (ЭРИ+) | 0.05 нг/мл | [471] |
| GHRP-2, гексарелин | Плазма | Денатурация белка ацетонитрилом | Hypersil Gold C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):ацетонитрил (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 10 нг/мл | [473] |
| GHRP-1, GHRP-2, GHRP-2 (1-3) ОН, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, александморелин, гексарелин, ипаморелин | Моча | ТФЭ (Phenomenex Strata-XCW) | Hypersil Gold C18 (50 × 1 мм, 1.9 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):ацетонитрил (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 0.2-1 нг/мл | [462] |
| GHRP-1, GHRP-2, GHRP-2 (1-3) ОН, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, александморелин, гексарелин, ипаморелин | Моча | Концентрирование на предколонке Waters Symmetry C18 (180 мкм × 20 мкм, 5 мкм) | Acquity nanoU-PLC BEH130 C18 (100 мкм × 20 мкм, 1.7 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):ацетонитрил (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 2-10 пг/мл | [474] |
| GHRP-6, GHRP-2, GHRP-1, гексарелин, ипаморелин | Плазма крови лошади | ТФЭ (Waters Oasis MAX) | Waters Acquity BEH300 C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):метанол (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 5 нг/мл | [475] |
| ARA-290 и 6 его метаболитов, GHRP-3, метаболит | Плазма | Денатурация белка ацетонитрилом | Thermo Accucore Phenyl/Hexyl (50 × 3 мм, 2.7 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):0.1% p-p | Orbitrap (ЭРИ+) | – | [476] |

| | | | | | | | |
|--|-------------------------|----------------------------|---|---|-----------------|---|-------|
| GHRP-3, пепторелин, метаболит пепторелина | | | | муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | | | |
| GHRP-1, метаболиты GHRP-1, GHRP-2, метаболит GHRP-2, GHRP-6, метаболиты GHRP-6, гексарелин, метаболит гексарелина, ипаморелин, метаболит ипаморелина | Моча | ТФЭ (Waters Oasis WCX) | Agilent Zorbax 300SB-C18 (50 × 1 мм, 3.5 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (A):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | Orbitrap (ЭРИ+) | 50–200 нг/мл | [477] |
| Бусерелин, анаморелин, десмопрессин, метаболит GHRP-1, метаболит GHRP-2, GHRP-3, GHRP-4, GHRP-5, леупролид, ТВ-500, LHRH | Моча | Без пробоподготовки | 2D-УВЭЖХ: Thermo Accucore Phenyl/Hexyl (10 × 3 мм, 2.7 мкм) и Macharey-Nagel Nucleoshell RP18plus (50 × 2 мм, 2.7 мкм) | 5 мМ ацетат аммония, содержащий 0.1% уксусной кислоты (A):ацетонитрил (B) | Orbitrap (ЭРИ+) | 0.1–2 нг/мл | [478] |
| ТВ-500 | Лошадиная плазма и моча | ТФЭ (Waters Oasis MCX) | Waters Acquity BEH C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% р-р уксусной кислоты в воде (A):метанол (B) | Orbitrap (ЭРИ+) | Моча: 0.01 нг/мл; Плазма: 0.02 нг/мл | [479] |
| GHRP-2 и его метаболит | Моча | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Waters Acquity BEH C18 (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% р-р ТФУ в воде (A):0.1% р-р ТФУ в ацетонитриле (B) | Q-TOF (ЭРИ+) | 0.5 нг/мл | [480] |
| Алексаморелин, десмопрессин, GHRP-6, пепторелин, гексарелин, LHRH, | Моча | Разбавление, дериватизация | Agilent Zorbax RX C8 (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде с добавкой 1% ДМСО (A):0.2% р-р муравьиной | Orbitrap (ЭРИ+) | 0.125–1 нг/мл | [481] |

| | | | | | | | |
|---|------------------------|--|--|---|-------------------------------|--------------|-------|
| ТВ-500, ипаморелин, GHRP-1, GHRP-2, GHRP-4, GHRP-5, госерилин, AOD9604, деслорелин | | ДМСО из подвижной фазы | | кислоты в ацетонитриле с добавкой 1% ДМСО | | | |
| LHRH, липрессин, бусерилин, пефорелин, госерилин, наферилин, GHRP-1, GHRP-2, GHRP-3, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, гексарелин, алексаморелин, ипаморелин | Моча | ТФЭ (Waters Oasis WCX) | Agilent Poroshell 120 EC-C18 (50 × 2.1 мм, 2.7 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.2% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) | Q-TOF (ЭРИ+) | 0.1–1 нг/мл | [482] |
| GHRP-1, GHRP-2, GHRP-3, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, гексарелин, ипаморелин, гонадорелин, дерморфин, дельторфин I, дельторфин II, бусерилин, 20 биологически активных пептидов | Лошадиная моча, плазма | ТФЭ (Waters Oasis MAX, Waters Oasis WCX) | Thermo Accucore C18 (50 × 2.1 мм, 2.6 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде с добавлением 1% ацетонитрила (А):0.2% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле с добавлением 5% воды (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 10-100 пг/мл | [483] |
| CJC-1295 | Лошадиная плазма | Иммуноаффинная очистка, трипсинолиз | Trajan Scientific Proteocol G203 C18 (150 × 2.1 мм, 3.5 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 180 пг/мл | [484] |
| АСЕ-011 | Плазма | Иммуноаффинная очистка, трипсинолиз | Agilent Poroshell 120 C18 (50 × 2.1 мм, 2.7 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) | Q-TOF (ЭРИ+), Orbitrap (ЭРИ+) | 10 нг/мл | [485] |

| | | | | | | | |
|-----------|------|------------------------------|--|---|-----------------|-----------|-------|
| Дерморфин | Моча | ТФЭ (Phenomenex Strata-X-CW) | Thermo Syncronis C8 (50 × 2.1 мм, 1.9 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты с добавлением 5 мМ формиата аммония в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в метаноле (В) | Orbitrap (ЭРИ+) | 2.5 нг/мл | [486] |
|-----------|------|------------------------------|--|---|-----------------|-----------|-------|

Как видно из представленных данных, основным методом определения рилизинг-пептидов гормона роста является масс-спектрометрия высокого разрешения, которую чаще всего сочетают с твердофазной экстракцией, как наиболее мягким и эффективным, хоть и недешевым методом пробоподготовки. Выбор метода детектирования обуславливается, в первую очередь, необходимостью высокой селективности и возможностью эффективной работы с полизарядными большими молекулами.

1.2.6 Определение стероидных гормонов

Анаболические стероиды до сих пор относятся к самым известному и распространенному виду допинга в мире. Согласно статистике ВАДА более 15% положительных результатов исследований приходится именно на них. На сегодняшний день, с учетом требований ВАДА, антидопинговые лаборатории проводят исследования, связанные со стероидами. К ним относятся не только установление факта употребления запрещенных экзогенных стероидов, но и установление природы происхождения стероидов (эндогенные или экзогенные), а также оценка стероидного профиля спортсмена, являющегося неотъемлемой частью биологического паспорта спортсмена.

Помимо допинг-контроля, содержание стероидных гормонов играет важную роль и в клинической диагностике. На сегодняшний день существует большое количество работ, посвященных применению ИФА и ИХА [487–492], как достаточно простых и экспрессных методов анализа, однако наличие перекрестных реакций с компонентами, имеющими подобные структуры, значительно снижают их точность и надежность. Известным примером подобной кросс-реакции является мешающее влияние 5 α -дигидротестостерона при определении эстрагенов [492]. Более того, применение ИФА и ИХА является оправданным при определении отдельных единичных показателей, но они практически непригодны для получения результатов, связанных со стероидным профилем, несмотря на постоянное развитие и совершенствование

данных методов анализа [493]. Это обстоятельство стало причиной повсеместного распространения методов газовой [494–497] и жидкостной [498–500] хромато-масс-спектрометрии не только в допинг-контроле, но и клинической диагностики. Отдельное место в этих исследованиях занимает газовая хроматография в сочетании с изотопной масс-спектрометрией (ГХ-С-ИМС), используемая для установления природы происхождения эндогенных стероидов по соотношениям $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ [501–504].

Анализируя публикации последних лет, можно обратить внимание на тенденцию установления форм нахождения стероидных гормонов в организме человека: сульфатных и глюкуронидных конъюгатов [505–508].

Большинство стероидных гормонов выводится в виде глюкуронидов [509–511], что легло в основу методов их определения. Методы основаны на использовании буферных систем, в состав которых входит β -глюкуронидаза *E. Coli*, приводящая к разрушению исключительно глюкуронидных конъюгатов, а глюкуронидаза *H. Pomatia* содержит в своем составе и арилсульфатазу, которая позволяет разрушать также и сульфатные конъюгаты [512]. Данная процедура относится к мягким подходам пробоподготовки и не приводит к деградации образца, а более известный и доступный подход, основанный на использовании минеральных кислот и щелочей, часто приводит к разрушению аналитов [509]. Подобная дискриминация пробы делает невозможным получение воспроизводимых данных, которые могут быть использованы для сопоставления результатов, полученных ранее.

Несмотря на то, что в большинстве лабораторий уже много лет успешно используются процедуры, основанные на применении глюкуронидазы кишечной палочки, в последние годы все чаще звучит мнение, согласно которому необходимо осуществлять также и мониторинг сульфатных форм метаболитов, поскольку в ряде случаев долгоживущие метаболиты, свидетельствующие об употреблении запрещенных веществ, образуются именно в сульфатной форме [513–515]. Введение такого, казалось бы, минорного изменения, может создать множество затруднений для антидопинговых лабораторий: все

текущие исследования и пределы допустимых содержаний были рассчитаны исходя из закрепившейся действующей методологии. И несмотря на то, что использование другого фермента вряд ли приведет к пересмотру парадигмы и логики мониторинга биологического паспорта, однозначно потребуются новые популяционные исследования и набор статистического массива данных в отношении каждого спортсмена.

К ключевым результатам, относящимся к мониторингу стероидного профиля, относится соотношение тестостерона к его эпимеру – эпитестостерону, установленному еще в 80-х годах Манфредом Доннике [509]. Изначально предлагаемый им порог соотношения Т/Е был равен 6, однако по мере накопления статистических данных и получении популяционной выборки результатов, было установлено, что более чем в 90% случаев корректным пороговым значением данного отношения является 4. Исключение составляют люди с африканским типом метаболизма, где природное значение соотношения Т/Е может быть больше 6, в то время, как для людей с азиатским типом метаболизма, нормальным может являться соотношение Т/Е, равное или даже менее 0.4.

В результате статистического анализа полученных данных было установлено [511], что в отношении данного соотношения популяционная выборка демонстрирует бимодальное распределение, представленное на рисунок 17.

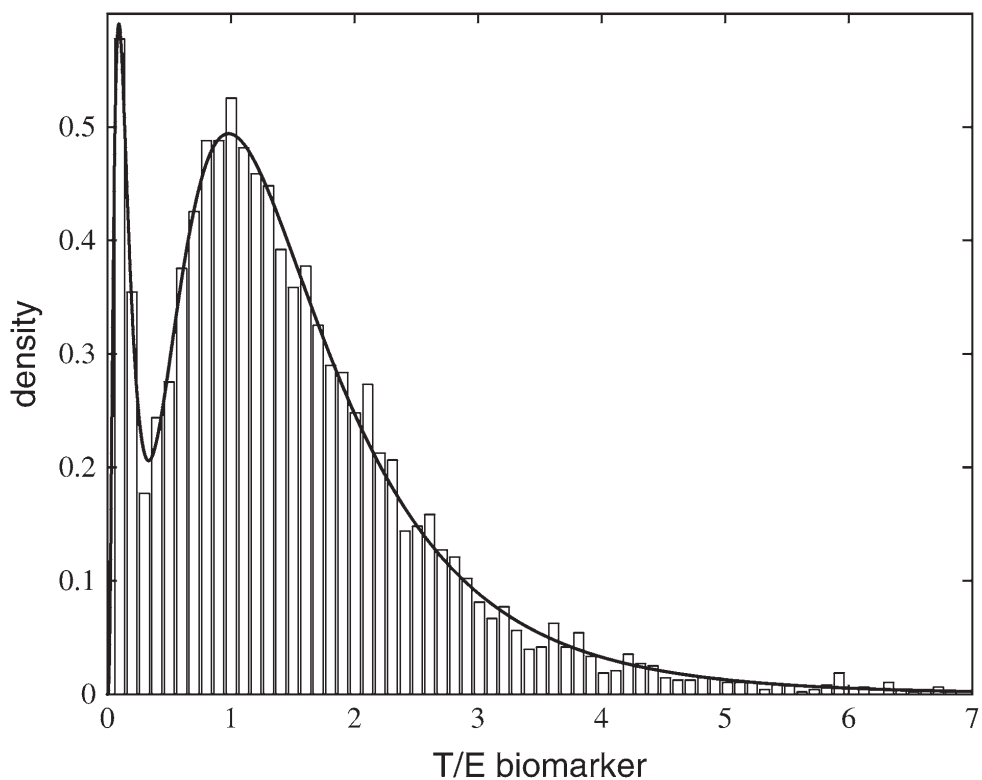
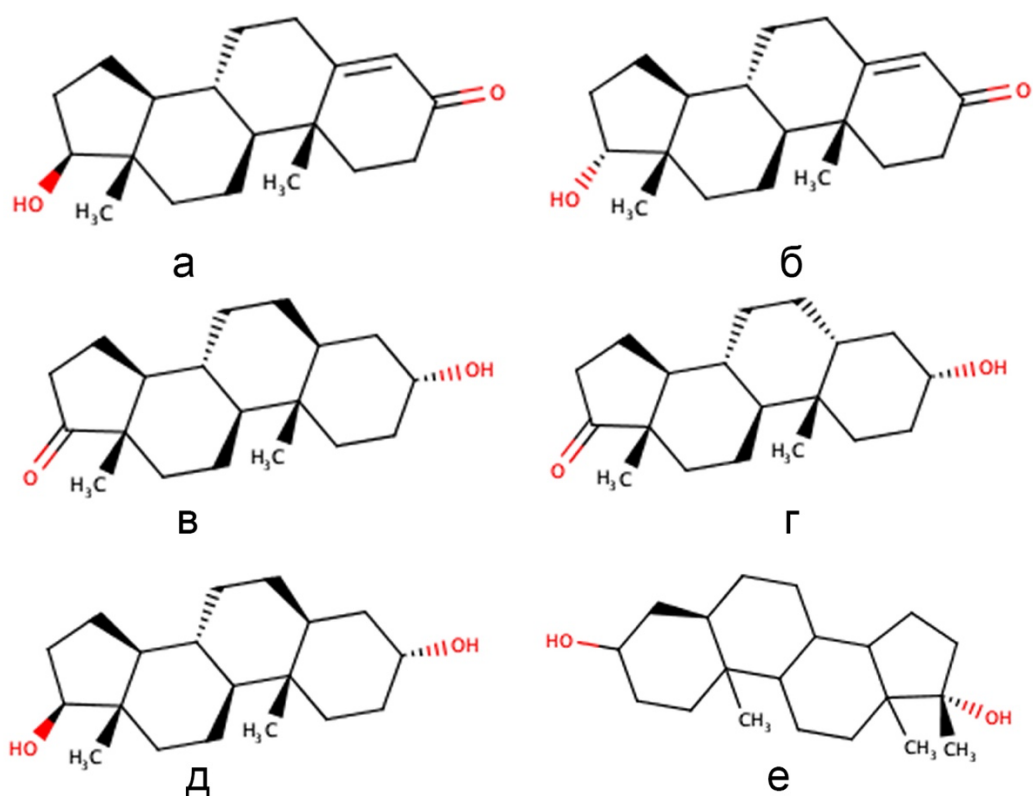


Рисунок 17 – Форма бимодального распределения для популяционного соотношения Т/Е [511]

Помимо соотношения и концентраций тестостерона и его эпитера в стероидный профиль входят такие показатели, как содержание андростерона, этиохоланолона, 5α -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диола и 5β -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диола (рисунок 18).



а – тестостерон, б – эпитестостерон, в – андростерон, г – этиохоланолон,
 д – 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол и е – 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол
 Рисунок 18 – Структурные формулы некоторых стероидных гормонов

Подобный комплексный подход обусловлен необходимостью установления факта манипуляций с пробами мочи, а для повышения его надежности вводится целый ряд критериев, направленных на установление причин отклонения от нормы. Так, при концентрации тестостерона >200 нг/мл, исследуемая проба в любом случае отправляется на дополнительное исследование с использованием метода ГХ-С-ИМС, вне зависимости от соотношения Т/Е. В то же время было установлено, что на содержание тестостерона в организме может оказывать даже наличие полиморфизма генов, и, в зависимости от вида полиморфизма, может отмечаться различная реакция организма на введение андрогенных стероидов, что также может затруднять их определение.

Такая поливариантность в отношении интерпретации данных и привела к появлению подходов, в которых авторы предлагают определять отдельно каждый вид конъюгатов и даже остаточные количества свободных форм стероидов (таблица 13). С одной стороны, применение подобного подхода может

позволить на основании одного анализа получить результат, который может быть интерпретирован с помощью различных методических и статистических подходов, с другой стороны – погрешность подобного анализа значительно выше.

Таблица 13 – Некоторые методы определения стероидных гормонов в биологических жидкостях

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Условия разделения | Детектор | Предел обнаружения | Ссылка |
|---|-----------------|-------------------------------------|---|---|------------------|--------------------|--------|
| 15 стероидных гормонов | Сыворотка крови | Онлайн ТФЭ (Spark-Holland HySphere) | Phenomenex Kinetex C18 (100 × 3 мм, 2.6 мкм) | 0.2 мМ раствор фотрида аммония в воде (А):метанол(В) | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | 1–25000 пг/мл | [513] |
| Метилтестостерон, тестостерон, 12 эфиров тестостерона | Плазма | ЖЖЭ | Agilent HP-5MS (12 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 110 °С до 315 °С | QqQ (ХИ) | 100–500 пг/мл | [514] |
| 17 стероидный гормон и их конъюгатов | Моча | ТФЭ (Interchim XAD-2) | Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 × 3 мм, 1.8 мкм) | 0.01% р-р муравьиной кислоты в воде с добавкой 5 мМ формиата аммония (А):0.01% р-р муравьиной кислоты в метаноле с добавкой 5 мМ формиата аммония | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | 1–50 нг/мл | [515] |

| | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------|---|---|---|-----------------------|--------------|-------|
| 41 стероидный гормон и конъюгаты | Семенная жидкость | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Phenomenex Kinetex C18 (150 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле | Orbitrap (ЭРИ+) | – | [516] |
| 27 стероидных гормонов | Сыворотка крови | Ферментативный гидролиз, ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Thermo Hypersil Gold C18 (50 × 2.1 мм, 1.9 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле | QqQ (ЭРИ+, ЭРИ-) | 0.1–2 нг/мл | [517] |
| 8 стероидных гормонов и конъюгаты | Моча | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Phenomenex Kinetex C18 (150 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде (А):0.1% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле | Orbitrap (ЭРИ+, ЭРИ-) | 0.4–30 нг/мл | [508] |
| 10 стероидных гормонов и конъюгаты | Моча | ТФЭ (Waters Sep-Pak C18, Waters WAX), Минеральный гидролиз (серная кислота), ферментативный гидролиз (<i>H. Pomatia</i>), | Agilent HP-1MS (17 м × 0.2 мм, 0.11 мкм) | Газ-носитель: гелий; Температурная программа: нагрев от 180 °С до 320 °С | QqQ (ЭИ) | – | [518] |

| | | | | | | | |
|------------------------|------------------------|--|--|---|------------------|---------------|-------|
| | | derivatization (MSTFA + DTT + йодид аммония) | | | | | |
| 19 стероидных гормонов | Слюна | ЖЖЭ | Waters Acquity VEN C18 (100 × 2.1 мм, 1.7 мкм) | 0.01% p-p муравьиной кислоты в воде с 1 мМ форматом аммония (А):0.01% p-p муравьиной кислоты в метаноле с 1 мМ форми- атом аммония | QqQ (ЭРИ+) | 0.03–30 нг/мл | [519] |
| | Грудное молоко | ЖЖЭ | | | | | |
| | Амниотическая жидкость | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ | | | | | |
| 12 стероидных гормонов | Сыворотка крови | Денатурация белка ацетонитрилом, ЖЖЭ, derivatization INC | Phenomenex Kinetex PFP (100 × 3 мм, 2.6 мкм) | Вода (А):метанол (В) | Q-Trap (ЭРИ+) | 0.05–1 нг/мл | [520] |
| 17 стероидных гормонов | Моча | Ферментативный гидролиз, ЖЖЭ, derivatization (MSTFA + DTT + йодид аммония) | Thermo TR-5MS (15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм), Thermo TR-50MS (15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) | Газ-носитель – гелий; Температурная программа: | QqQ (НФИ) | 0.05–2 нг/мл | [521] |

Стоит отметить, что объект исследования определяет не только подходы к подготовке проб, но и лимитирует информативность полученного результата. В частности, определение стероидов одинаково успешно может проводиться как в крови, так и в моче и слюне [522–525]. Кровь и слюна преимущественно отражают состояние и концентрации в момент отбора пробы, а пробы мочи являются более усредненными и имеют более широкие окна обнаружения запрещенных веществ [515, 523] и их метаболитов. Это же относится и к стероидным гормонам. Как видно из работ [510], именно такой подход лег в основу исследования с целью выявления долгоживущих метаболитов. Методология подобных работ существенно осложняется тем, что во время его проведения, участники эксперимента должны строго контролировать качество потребляемых продуктов, чтобы избежать возникновения ложных результатов. На сегодняшний день, наиболее известным примером обнаружения долгоживущих метаболитов является работа [523], в которой были обнаружены несколько долгоживущих метаболитов дегидрохлорметилтестостерона (**ДНСМТ**).

Однако, вне зависимости от методологии, невозможно игнорировать рост популярности применения ВЭЖХ-МС/МС в целях оценки стероидного профиля. Это обусловлено тем, что жидкостная хромато-масс-спектрометрия позволяет в один аналитический цикл определять не только андрогенные стероиды и эстрогены, но и глюкокортикостероиды, а также целый ряд других компонентов, существенно сокращая время, затрачиваемое на анализ одной пробы. С другой стороны, газовая хромато-масс-спектрометрия по-прежнему обладает большей эффективностью разделения по сравнению с УВЭЖХ. Таким образом, на сегодняшний день, газовая хромато-масс-спектрометрия все чаще используется в качестве не основного, а подтверждающего метода анализа. Помимо большего времени анализа, ГХ-МС/МС требует также проведения дериватизации образца. Причем для достижения необходимой чувствительности необходимо применение комплексного дериватирующего агента, состоящего из дитиотреитола в йодиде аммония и

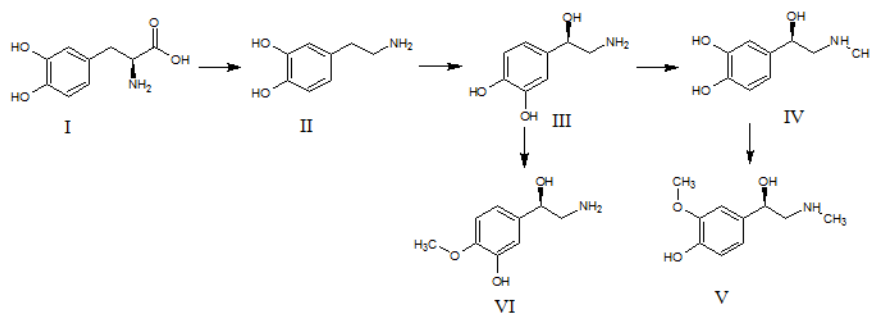
MSTFA. Это позволяет восстановить кето-группу, присутствующую в андрогенных стероидах до гидроксильной и, как следствие, силанизировать и её. Такой подход позволяет получить, например, ди-ТМС-производное тестостерона, имеющее интенсивный молекулярный ион и сохранить информативный масс-спектр, что значительно повышает чувствительность в режиме МС/МС. Преимущества данного подхода были достаточно полно описаны в работах [509, 523].

Вне зависимости от используемого метода анализа перед проведением исследования необходимо удостовериться в отсутствии признаков деградации образца [524–526]. Для этого используются такие показатели, как плотность и рН образца, а также соотношения некоторых эндогенных стероидов, описанные в технических документах ВАДА и работах [527–531].

1.2.7 Определение катехоламинов

Содержание катехоламинов в биологических жидкостях имеет важное клинико-диагностическое значение и нередко используется в целях ранней диагностики болезни Паркинсона и болезней надпочечников. Помимо этого, концентрации катехоламинов представляют интерес и в допинг-контроле. В последнем случае речь идет о больших концентрациях (например, значимым является обнаружение октопамина с концентрацией более 1000 нг/мл). Обнаружение столь значимых концентраций аналитов, как правило, не представляет больших сложностей, но в случае с катехоламинами речь идет о малых полярных молекулах, слабо удерживающихся в режиме обращено-фазовой жидкостной хроматографии. Кроме того, для катехоламинов характерна относительно небольшая молекулярная масса, что создает ряд затруднений при их масс-спектрометрическом определении ввиду наличия химического шума.

В то же время нативные катехоламины (рисунок 19) являются очень удобными аналитами при использовании электрохимического детектора, что привело к распространению метода HPLC в сочетании с ЭХД [532, 533] для их определения в клинической практике. Однако при проведении рутинных исследований необходим регулярный контроль за состоянием электрода детектора, что несколько затрудняет применение этого метода.



I – 3,4-дигидроксифенилаланин, II – дофамин, III – норадреналин, IV – адреналин, V – метанефрин, VI – норметанефрин

Рисунок 19 – Схема биосинтеза катехоламинов в организме человека

Подобный недостаток может быть устранен с применением флуориметрического и спектрофотометрического детекторов, где проседание светимости лампы происходит намного медленнее и гораздо более предсказуемо. Это обстоятельство привело к распространению подхода, основанного на дериватизации катехоламинов различными агентами, среди которых наибольшее распространение получили дансилхлорид и FMOC-Cl [534, 535]. Данные вещества являются классическими флуорисцентными метками и фактически являются основными «якорями», играющими роль в удерживании дериватов при обращено-фазовом детектировании. К сожалению, подобные реагенты являются неселективными, поэтому перед их применением желательно проведение предварительного твердофазного концентрирования и очистки пробы или применение иного метода очистки пробы с последующим подбором состава подвижной фазы и градиента.

В случае применения масс-спектрометрического детектирования [536–542] вероятность интерференций становится существенно меньше, но оценка матричных влияний по-прежнему остается актуальной.

Таким образом, существует несколько стратегий, позволяющих оценить содержание катехоламинов в биологических жидкостях с использованием хроматографических методов, наиболее интересные из них представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Некоторые методы определения катехоламинов в биологических жидкостях

| Аналит | Матрица | Пробоподготовка | Колонка | Условия разделения | Детектор | Предел обнаружения | Ссылка |
|---|---|--|--|---|---------------|--|--------|
| Адреналин, октопамин, допамин и 25 нейротрансмиттеров | Моча, спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость | Разбавление и денатурация белка | Waters Atlantis C18 (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):ацетонитрил (В) | QqQ (ЭРИ+) | 10 ⁻⁷ – 10 ⁻¹⁰ М | [540] |
| Адреналин, допамин, метанфрин | Моча | ТФЭ (Waters Oasis HLB, Varian Bond Elut Plexa) | Phenomenex Synergi Hydro C18 (150 × 2.1 мм, 5 мкм), Waters Atlantis T3 (150 × 2.1 мм, 5 мкм) | 50 мМ водный раствор муравьиной кислоты в воде с 2% добавкой метанола | QqQ (ЭРИ+) | 0.05–0.22 мкМ | [541] |
| | | | | | ЭХД | 0.005–0.01 мкМ | |
| Адреналин, норадреналин, допамин | Моча | ТФЭ (Waters Oasis HLB) | Restek Ultra PFPP (150 × 2.1 мм, 3 мкм) | 0.1% p-p муравьиной кислоты в воде (А):метанол (В) | QqQ (ЭРИ+) | 0.25–2.5 нг/мл | [538] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, 13 биогенных аминов | Моча | Разбавление и денатурация белка водным раствором ТФУ | Thermo Acclaim Mixed Mode WCX (150 × 2.1 мм, 3 мкм) | 0.1% p-p уксусной кислоты в водно-метанольной смеси (80:20, v:v) (А):2% p-p уксусной кислоты в водно- | Q-Trap (ЭРИ+) | 1–21.9 нг/мл | [536] |

| | | | | | | | |
|--|--------|--|--|---|---------------|--------------|-------|
| | | | | метанольной смеси (80:20, v:v) (B) | | | |
| Адреналин, норадреналин, допамин, 7 биогенных аминов | Моча | Разбавление | Waters Acquity HSS PFP (150 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (A):метанол (B) | QqQ (ЭРИ+) | 2–250 нг/мл | [539] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, метанифрин | Моча | Солянокислый гидролиз, ТФЭ (Waters Oasis WCX) | Waters Acquity HSS T3 (150 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (A):0.2% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | Q-Trap (ЭРИ+) | 506–3264 нМ | [542] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, норметанифрин | Плазма | ТФЭ (Waters Oasis WCX) | Waters Acquity HSS T3 (150 × 2.1 мм, 1.8 мкм) | 0.2% р-р муравьиной кислоты в воде (A):0.2% р-р муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) | Q-Trap (ЭРИ+) | 0.02–0.15 нМ | [537] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, метанифрин | Моча | ТФЭ (Waters Oasis MCX) и дериватизация MSTFA/HMDS/MBHFBA | J&W Scientific DB-5MS (15 м × 0.25 мм, 0.25 мкм) | Газ-носитель: гелий, температурная программа: от 120 °С до 280 °С | Q (ЭИ) | 1–20 нг/мл | [543] |

| | | | | | | | |
|---|------|---|--|---|----------------|--------------------------------|-------|
| Адреналин, норадреналин, допамин | Моча | Онлайн ТФЭ (Varian Bond Elut PBA) | Restek Allure PFP (150 × 4.6 мм, 5 мкм) | 25 мМ р-р формиата аммония в воде (рН = 3) (А):10% р-р метанола в воде | QqQ (ЭРИ+) | 1.47–15.8 нМ | [544] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, 10 биогенных аминов | Моча | DLLME (диспергент – этанол, экстрагент – дихлорметан) | Waters XBridge Amide BEH (100 × 3 мм, 3.5 мкм) | 10 мМ формиат аммония в воде (А):10 мМ формиат аммония в ацетонитриле (В) | Q (ЭРИ+, ЭРИ-) | 10–20 нг/мл | [545] |
| Адреналин, допамин, метанифрин, норадреналин | Моча | ЖЖЭ, дериватизация FMOC-Cl | Phenomenex Spherisorb C8 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) | 32% р-р уксусной кислоты в воде (А):68% р-р ацетонитрила в воде (В) | IT (ХИАД+) | 1.2–4 пкМ (100 мкл ввод пробы) | [534] |
| Адреналин, норадреналин, допамин, 6 биогенных аминов | Моча | Разбавление, дериватизация о-фталевым альдегидом | YMC YMC-Pack ODS-AQ (250 × 4.6 мм, 5 мкм) | Смесь ацетонитрила, метанола и водного раствора 0.1 М ацетата натрия | ФЛД | 12–200 фмМ | [546] |

Существуют также альтернативные подходы, основанные на электрохимическом и спектрофотометрическом детектировании, а также методах ИФА и ИХА [547–550]. Но, несмотря на их экспрессность, остро встает вопрос кросс-селективности и ложных результатов, избежать которые можно с помощью применения методов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Несмотря на такое обилие методов определения катехоламинов в биологических жидкостях в различных биологических жидкостях, задача их надежного и быстрого определения остается по-прежнему актуальной.

1.3 Применение масс-спектрометрии высокого разрешения при проведении скрининга в анализе биологических жидкостей и растительного сырья

Современные методы хроматографии и хромато-масс-спектрометрии позволяют существенно сократить время анализа и повысить информативность получаемых результатов. В этом отношении эталонным методом можно назвать масс-спектрометрию высокого разрешения, позволяющую не только регистрировать точные массы, но и полноценно реализовывать применение изотопного распределения в целях идентификации.

До недавнего времени применение МСВР было затруднено ввиду чрезвычайно высокой стоимости приборов высокого разрешения, невысокой скорости сканирования и даже искажения изотопного распределения (что было характерно для ранних версий орбитальной ловушки).

В последние годы масс-спектрометры высокого разрешения стали более доступны, демонстрируя при этом высокие аналитические характеристики. Наблюдается рост доступности инструментов высокого разрешения и значительное улучшение их характеристик, что приводит к их постепенному распространению в практике аналитических лабораторий. Все чаще можно встретить работы, в которых с использованием масс-спектрометрии высокого

разрешения проводится не только качественный, но и количественный анализ, а демонстрируемая чувствительность сопоставима с тройными квадрупольями среднего сегмента, что достаточно для большинства современных аналитических задач [551–553].

Причиной тому является большая селективность инструментов высокого разрешения, а максимальную чувствительность они демонстрируют, как правило, в режиме регистрации ионов-прекурсоров, поскольку при образовании ионов-продуктов выход ионизации уменьшается в среднем от 2 до 10 раз. В случае образцов, поступивших для токсикологического скрининга, это допустимо, поскольку концентрации аналитов как правило достаточно велики и не требуют проведения анализа на уровне следовых и ультраследовых концентраций.

Наиболее распространенный подход, применяемый в данном случае, заключается в использовании режима информационно-зависимого сканирования с динамическим исключением ионов-прекурсоров [554–560]. В этом случае прибор делает сканирование полного ионного тока ионов-прекурсоров, определяет наиболее интенсивные ионы в заданном спектре и далее последовательно получает спектр ионов-продуктов из выбранных прекурсоров. В этом случае оператор прибора задает такие основные параметры, как число ионов-прекурсоров и количество снятия спектров данных ионов до их динамического исключения, минимальную значимую интенсивность иона, частоту сканирования и перечень мешающих, фоновых ионов, которые априори исключаются из перечня кандидатов для МС/МС-экспериментов [559, 560].

Стоит помнить, что подобный режим пригоден только для качественного анализа, поскольку зачастую не позволяет получить достаточное количество информации для описания хроматографического пика. Таким образом, для проведения качественного и количественного анализа требуется проведение двух анализов, что делает оправданным и целесообразным применение

такого подхода для работы с ограниченным объемом образца и невозможностью или существенными сложностями его повторного анализа.

Значительные разночтения в трактовке нецелевого скрининга можно увидеть в области анализа растительного сырья [561–566]. В отличие от токсикологической интерпретации, в фитологическом направлении под нецелевым скринингом понимают анализ без использования стандартных образцов, направленный на обнаружение какого-то конкретного класса соединений. Например, полифенолов или фитостероидов. Целью данного подхода нередко является классификация на основании региона происхождения растительного сырья с использованием статистического анализа данных [561–563]. Как правило, для этого используют дискриминантный анализ без предварительной нормализации результатов (с целью недопущения искажения исходных данных). В этом случае применение описанного выше алгоритма становится невозможным, поскольку построение модели ведется не только от наличия какого-то конкретного значения m/z , но и интенсивности сигнала. В этом случае целесообразным представляется регистрация спектра веществ, имеющих или какую-то характерную нейтральную потерю (что открывает возможность применения и масс-спектрометрии низкого разрешения), или широкополосное пропускание в ячейку соударений и последующий поиск характерных для отдельных классов веществ, значений m/z .

В последнем случае основная сложность заключается в том, что установить ион-прекурсор не представляется возможным, поскольку аналитический квадруполь работает на полное пропускание, однако для подобных классификационных задач вопрос идентификации зачастую является второстепенным.

Вне зависимости от того, какой вариант выбран для проведения исследований, применение хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения накладывает ряд требований к получаемым результатам, среди которых не только классические хроматографические требования в отношении стабильности параметров удерживания, но и точность определения масс. Так, в

соответствии с рекомендациями FDA [567], для большинства МСВР-систем максимально допустимой ошибкой определения масс в режиме сканирования ионов-прекурсоров, является 5 ppm, в то время как для ионов-продуктов допускается погрешность до 10 ppm. Для большинства современных систем данные требования не являются проблематичными и требуют лишь контроля микроклимата в помещении и калибровки шкалы масс в начале анализа.

Существенно повысить точность определения масс может подход, основанный на применении метода «Lock-mass», когда вместе с подвижной фазой непрерывно подается также и калибрانت, который используется для корректировки шкалы масс в реальном времени [568]. Основная сложность заключается в том, что его концентрация должна быть достаточно значимой и, таким образом, он будет присутствовать в каждом сканировании, уменьшая фактическое число сканирований пробы в единицу времени, поэтому для приложений нецелевого скрининга подобный подход не применяется.

1.4 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Существующие подходы качественного и количественного анализа наиболее распространенных наркотических, психоактивных веществ и современных допинг-агентов, базирующиеся на методологии нецелевого и направленного скрининга, отвечают требованиям высокой чувствительности. Развитие современного аналитического оборудования и методического обеспечения стимулируют развитие новых, более экспрессных способов, отвечающих требованиям высокой точности и надежности выявления и определения наркотических и психоактивных средств, а также их метаболитов [569–579]. Такое сочетание значительно расширит возможности исследователей для детального изучения и поиска новых соединений, находящихся в растительном сырье, идентификации синтетических наркотических средств. Кроме того, представляется возможным проведение идентификации новых метаболитов уже известных веществ, изучение динамики и путей их выведения из организма.

Важным моментом при построении схем анализа являются развитие, упрощение, оптимизация и автоматизация процедур подготовки проб, выбор подходящего аналитического оборудования и условий детектирования анализов.

Анализ научных публикаций последних лет показывает, что методы хроматографии и хроматомасс-спектрометрии являются доминирующими в области аналитической токсикологии, допинг-контроле и криминалистике [14, 93, 105–110, 158, 411, 419]. Помимо доступности базовых систем для хроматографии и хроматомасс-спектрометрии, которая обусловлена высокой надежностью хроматографических методов и их разнообразием, возможно проведение подтверждающих исследований в различных вариантах разделения и детектирования, меняя не только эффективность систем, но и их селективность, что положительно скажется на достоверности конечного результата. Наличие

выявленных критериев качественного и количественного анализа [79, 81] в совокупности с библиотеками масс-спектров для электронной ионизации существенно облегчит работу при использовании метода газовой хромато-масс-спектрометрии в рутинных исследованиях. Кроме того, благодаря режимам селективного мониторинга ионов (SIM) и множественного мониторинга реакций (MRM), и относительно низким значениям фонового сигнала, хромато-масс-спектрометрия позволит определять малые количества веществ в различных типах проб – начиная от лекарственных форм и до биологических жидкостей.

Исходя из вышеизложенного, сформулированы цели диссертационной работы:

1. Разработка методологии комплексного анализа объектов биологического, растительного и синтетического происхождения с целью выявления и определения наркотических и психоактивных средств, а также их метаболитов.

2. Обоснование и реализация методов целевого и нецелевого скрининга, новых подходов пробоподготовки и мониторинга при изучении стероидного и катехоламинового профиля, метаболизма новых ксенобиотиков в организме человека.

3. Разработка подходов к анализу наркотических средств природного и синтетического происхождения в биологических жидкостях человека с использованием подходов целевого и нецелевого скрининга

Для достижения поставленных целей необходимо решить следующие задачи:

- возможности и ограничения методологии нецелевого скрининга в аналитической токсикологии и проведении исследований метаболизма новых ксенобиотиков;

- оценка возможности применения методологии нецелевого скрининга для контроля качества спортивного питания, биологически активных добавок и продуктов питания;

- возможности твердофазной аналитической дериватизации при разработке пробоподготовки биологических жидкостей;

- возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для извлечения веществ различных классов соединений на примере селективных модуляторов андрогенных рецепторов и стероидов;

- изучение проблем идентификации основных классов наркотических, психоактивных средств и новых допинг-агентов, а также подходов их определения в различных объектах;

- анализ подходов и решений скрининга и количественного определения наркотических средств, оптимизация условий пробоподготовки при их определении, изучение матричных эффектов.

2 Экспериментальная часть и обсуждение результатов

2.1 Материалы, реактивы и использованное оборудование

Для поведения экспериментальных исследований использовали следующий перечень научного и вспомогательного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского госуниверситета:

- жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 с диодно-матричным детектором, «Shimadzu», Япония;
- Масс-спектрометр и источником электрораспылительной ионизации Shimadzu LCMS-2010EV, «Shimadzu», Япония;
- Газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 с пламенно-ионизационным детектором, «Shimadzu», Япония;
- Газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 с масс-спектрометрическим детектором Shimadzu QP-2010 Ultra, «Shimadzu», Япония;
- Газовый хроматограф Thermo Trace 1310 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Quantum XLS, «Thermo Scientific», США;
- Жидкостный хроматограф Thermo Ultimate-3000 с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo TSQ Quantum Access Max с источником электрораспылительной ионизации, «Thermo Scientific», США;
- Жидкостный хроматограф Agilent 1200 (Agilent, США) с масс-спектрометрическим квадруполь-времяпролетным детектором Agilent 6540 (Agilent, США);
- Жидкостный хроматограф Bruker Elute (Bruker Daltonics, Германия) с масс-спектрометрическим квадруполь-времяпролетным детектором Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics, Германия);
- Генератор азота Peak NM32LA, «Peak Scientific», США;
- Микроцентрифуга Eppendorf MiniSpin, «Eppendorf», Германия;

- Ультразвуковая ванна «Сапфир 5,7», 35 кГц, «Сапфир», Россия;
- Центрифуга Hettich Universal, «Hettich», Германия;
- Криостат Haake F3, «Haake», Германия;
- Ионномер «Эксперт-002», Россия;
- Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83;
- Весы аналитические лабораторные, ГОСТ 24104-80, класс точности 1, Ohaus Adventure, США;
- Система очистки воды Milli-Q Simplicity, «Millipore», Германия;
- Сушильный шкаф «Mettmert», Германия.

В качестве вспомогательных и расходных материалов использовались:

- Капиллярная колонка Agilent HP Ultra-1 (50 м × 0.2 мм × 0.33 мкм), «Agilent Technologies», США;
- Капиллярная колонка Quadrex 007-1 (30 м × 0.25 мм × 0.5 мкм), «Supelco», США;
- Капиллярная колонка Thermo TG-SQC (15 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), «Thermo Scientific», США;
- Капиллярная колонка Phenomenex Zebron ZB-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), «Phenomenex», США;
- Аналитическая колонка Phenomenex Luna C18(2) (250 × 2 мм, 5 мкм) с предохранительной колонкой C18 4 × 2 мм, 5 мкм (Phenomenex), «Phenomenex», США;
- Аналитическая колонка Separon SGX C18 (75 × 2.1 мм, 5 мкм).
- Аналитическая колонка Phenomenex Kinetex C18 (75 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм), «Phenomenex», США;
- Аналитическая колонка Bruker Intensity Solo-2 C18 (100 мм × 2.1 мм, 2.6 мкм), «Bruker Daltonics», Германия;
- Аналитическая колонка Waters Acquity BEH C18 (75 мм × 2.1 мм, 1.7 мкм), «Waters», США;

- Дозаторы переменного объема Biohit 5–50, 50–200, 100–1000 мкл, 1–5 мл, «Biohit», Sartorius, США;
- Дозаторы постоянного объема Biohit 25, 50, 100, 250, 500, 1000 мкл, «Biohit», Sartorius, США;
- Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2, ГОСТ 1770-74;
- Пипетки 1-1-2-1, 1-2-2-1, 1-2-2-5, 1-2-2-10, 2-2-2-5, 2-2-2-10, 2-2-2-25, 3-1-2-1, 3-1-2-2, 3-2-2-5, 3-2-2-20, ГОСТ 29227-91;
- Воронка стеклянная типа В, ГОСТ 25336;
- Кислота соляная о.с.ч., ГОСТ 14261-77;
- Этанол перегнанный, ГОСТ 18300-72;
- Ацетонитрил LC-MS grade, «Biosolve», Израиль;
- Муравьиная кислота 99,9%, Acros Organics, «Acros», Бельгия;
- Метанол HPLC grade, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Ацетон, х.ч., «Вектон», Россия;
- Хлористый метилен, о.с.ч., «Вектон», Россия;
- Хлороформ, х.ч., «Вектон», Россия;
- N,O-(бистриметилсилил)трифторацетамид (BSTFA), «Macharey-Nagel», Германия;
- Дитиотриетол 99.5%, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- N-метил,N-(триметилсилил)трифторацетамид (MSTFA), «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартные образцы селективных модуляторов андрогенных рецепторов 99%, Shanghai Soyoung Biotech. Inc., Китай;
- Стандартные образцы пептидного допинга (GHRP-2, GHRP-6, Ipramorelin, Hexarelin, Melanotan 2, Selank, DSIP, CJC-1295, HGH frag 176-191, MGF, PEG-MGF, Long-R3-IGF-1, TB-500, PT-141) 99%, Bioorganika, Китай;
- Унифирам, 99%, Shanghai Soyoung Biotech. Inc., Китай;
- Стандартный образец прегабалина «Pfizer»;

- Стандартный образец габапентина «Pfizer»;
- Стандартный образец тропикамида «Pfizer»;
- Стандартный образец циклопентолата «Pfizer»;
- Стандартный образец аминофенилмасляной кислоты «Pfizer»;
- Стандартный образец атропина, «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- Стандартный образец скополамина, «Sigma-Aldrich», Sigma, Германия;
- Стандартный образец мельдония, «Гриндекс», Россия;
- Стандартный образец дофамина «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартный образец адреналина «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартный образец октопамина «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартный образец кофеина ($\geq 99\%$) «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартный образец теобромина ($\geq 98\%$) «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- 9-фторенилметил хлорформат (FMOС-Cl), «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Гидроксид натрия, х.ч., «Вектон», Россия;
- Тетраборат натрия 10-водный, х.ч., «Вектон», Россия;
- Диэтиловый эфир, ч.д.а., «Медхимпром», Россия;
- Аммиак ч.д.а., «Вектон», Россия;
- Хлорид калия, х.ч., «Вектон», Россия;
- Хлорид натрия, х.ч., «Вектон», Россия;
- Хлорид аммония, х.ч., «Вектон», Россия;
- Мочевина, о.с.ч., «Нева-Реактив», Россия;
- Уксусная кислота, о.с.ч., «Вектон», Россия;
- Глюкуронидаза *E.Coli*, Roche, Швейцария;
- Глюкуронидаза *H.Pomatia*, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Тестостерон-d3, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Эпитестостерон-d3, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Метилтестостерон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;

- Тестостерон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Дигидротестостерон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Кортизон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Кортизол, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Эстрон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- 17 α -эстрадиол, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Эстриол, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Прогестерон, «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- 11 α -прогестерон «Sigma-Aldrich», Merck, Германия;
- Стандартные образцы НС и ПВ, предоставленные РУ ФСКН России по Краснодарскому краю и ГУ ЭКЦ МВД России по Краснодарскому краю;
- Гелий «Марка А», «Кубаньтехгаз», Россия;
- Гелий 6.0, «Linde газ», Линде газ Рус, Россия;
- Патроны для твердофазной экстракции «Диапак С18», Биохиммак-СТ, Россия;
- Патроны для твердофазной экстракции «Waters SCX», Waters, США;
- Патроны для твердофазной экстракции «Waters Oasis HLB», Waters, США;
- Патроны для твердофазной экстракции «Strata WCX», Phenomenex, США;
- Патроны для твердофазной экстракции «Isolute SCX», Biotage, Швеция;
- Патроны для твердофазной экстракции «Isolute C18», Biotage, Швеция;
- Патроны для твердофазной экстракции «Isolute NH₂», Biotage, Швеция.

2.2 Определение опийных алкалоидов на семенах мака пищевого

Основным источником наркотических опиатов является опий-сырец, который представляет собой свернувшийся млечный сок растения мака масличного [54, 580–583], который попадает на семена при обмолоте, протекающим в стадии технической зрелости мака. Большая часть млечного сока остается в маковой соломе, но он также попадает на поверхность семян и остается на них

в виде наслоений. На сегодняшний день данные о количестве опийных алкалоидов, остающиеся на семенах мака, отсутствуют. С другой стороны, относительно невысокая стоимость сырья, простота извлечения опийных алкалоидов, распространенность – делали мак объектом пристального внимания как со стороны людей с наркотической зависимостью, так и наркоконтроля [580, 581].

Существующие методики определения опийных алкалоидов включают предварительное их извлечение, концентрирование с использованием экстрагентов и дальнейшее детектирование различными методами. При этом извлечены алкалоиды могут быть как в виде оснований, так и в виде солей. При извлечении алкалоидов в виде оснований сырьё обрабатывается щелочными растворами для перевода солей алкалоидов в основания, после чего основания алкалоидов извлекаются органическими растворителями (1,2-дихлорэтан, хлороформ, диэтиловый эфир, бензол). Затем для очистки от примесей полученный раствор оснований алкалоидов обрабатывается слабым раствором кислоты, при этом алкалоиды образуют соли, нерастворимые в органических растворителях и переходящие в воду. При необходимости водный раствор солей алкалоидов снова подщелачивают и обрабатывают органическим растворителем до получения раствора смеси алкалоидов достаточной чистоты [581].

При извлечении алкалоидов в виде солей сырьё обрабатывается слабым раствором кислоты (например, уксусной) в воде, этаноле или метаноле. Полученный раствор подщелачивают для перевода солей алкалоидов в основания, которые извлекаются органическим растворителем (если экстракция производилась с помощью спирта, его предварительно необходимо отогнать, а остаток растворить в воде) [580, 584]. Раствор оснований алкалоидов в органическом растворителе подвергается очистке по вышеописанной схеме.

Последнее время детектирование алкалоидов чаще всего проводят методом ВЭЖХ [580, 581]. Авторы [583] предложили способ определения тебаина и орипавина на семенах мака, включающий пробоподготовку (экстракция

алкалоидов буферным раствором с рН 4.5, содержащим 0.2 М фосфат аммония, 20% этанола) с последующим анализом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детекторованием при опорной длине волны 254 нм. Подвижная фаза при этом включает 30% метанола и фосфатный буфер с рН 4.5, однако в этих условиях не удастся определить содержания морфина и кодеина.

При определении опийных алкалоидов на семенах мака авторы [584] изменили процесс пробоподготовки, в котором к навеске семян мака добавляют органический экстрагент (толуол:ацетон:этанол:раствор аммиака) и проводят трехкратную экстракцию при встряхивании. Полученный экстракт упаривают, и проводят реэкстракцию в водный слой, используя 0.3% раствор соляной кислоты. Водный экстракт упаривают до образования сухого остатка, который растворяют в 10 мл элюента состава: ацетонитрил-фосфатный буфер (3:7, v:v), фосфатный буферный раствор: 0,04 М K_2HPO_4 , подкисленный H_3PO_4 рН = 3,5. Полученные растворы отстаивают и фильтруют, затем анализируют методом ВЭЖХ. В этом случае необходимо проводить отдельную стадию определения меконовой кислоты, природного спутника опия, методом капельной реакции. Данный способ пробоподготовки очень трудоемкий и длительный, однако, он обеспечивает высокую степень экстракции алкалоидов опия. При анализе проб с внесением морфина было установлено, что его потери при экстракции составляют не более 5%. При таком способе удастся проанализировать шесть образцов в течение двух рабочих дней.

Описанные выше методики предназначены для узкого диапазона концентраций [581] или позволяют определять отдельные алкалоиды [584].

Нами была разработана новая аналитическая схема для определения низких содержаний опийных алкалоидов на семенах мака масличного пищевого [582].

Растворы и реагенты. Исходный раствор кодеина готовили растворением навески основания кодеина в дистиллированной воде ($c = 10$ мг/мл),

морфин был получен в виде раствора гидрохлорида морфина ($c = 10$ мг/мл). Определение содержания опиатов проводилось на семенах мака, приобретенных в розничной продаже и конфискованных в ходе оперативных действий.

Подготовка проб к анализу. Навеску семян (10 г) помещали в коническую колбу объемом 100 мл и добавляли экстракционную смесь. Экстракция опиатов с семян мака проводилась с использованием электромеханического встряхивателя в течение 10–15 мин. Экстракция проводится трехкратно.

В качестве экстрагентов использовали метанол (96%), этанол (96%), изопропиловый спирт (хч) и ацетонитрил (хч).

Оптимизация состава экстрагента. При подборе экстрагента для определения опиатов методом ВЭЖХ подбирали оптимальное соотношение вода:ацетонитрил:о-фосфорная кислота, которое позволило извлекать максимальное количество алкалоидов путем перевода их из основной в солевую форму, растворимую в воде. В качестве органического модификатора был выбран ацетонитрил, так как он входит в состав подвижной фазы, оптически прозрачен при выбранной аналитической длине волны 220 нм и при этом обеспечивает полноту извлечения опиатов с поверхности семян мака.

Использование избытка ацетонитрила могло привести к ухудшению разрешения пиков меконовой кислоты и морфина, что сделало бы невозможным проведение количественного анализа, а большого объема экстрагента – к занижению предела обнаружения алкалоидов. Варьируя соотношение вода:ацетонитрил, нами устанавливался объем ацетонитрила, при котором степень извлечения алкалоидов максимальна. В этих условиях концентрация о-фосфорной кислоты было постоянно (рисунки 20–22, таблица 15).

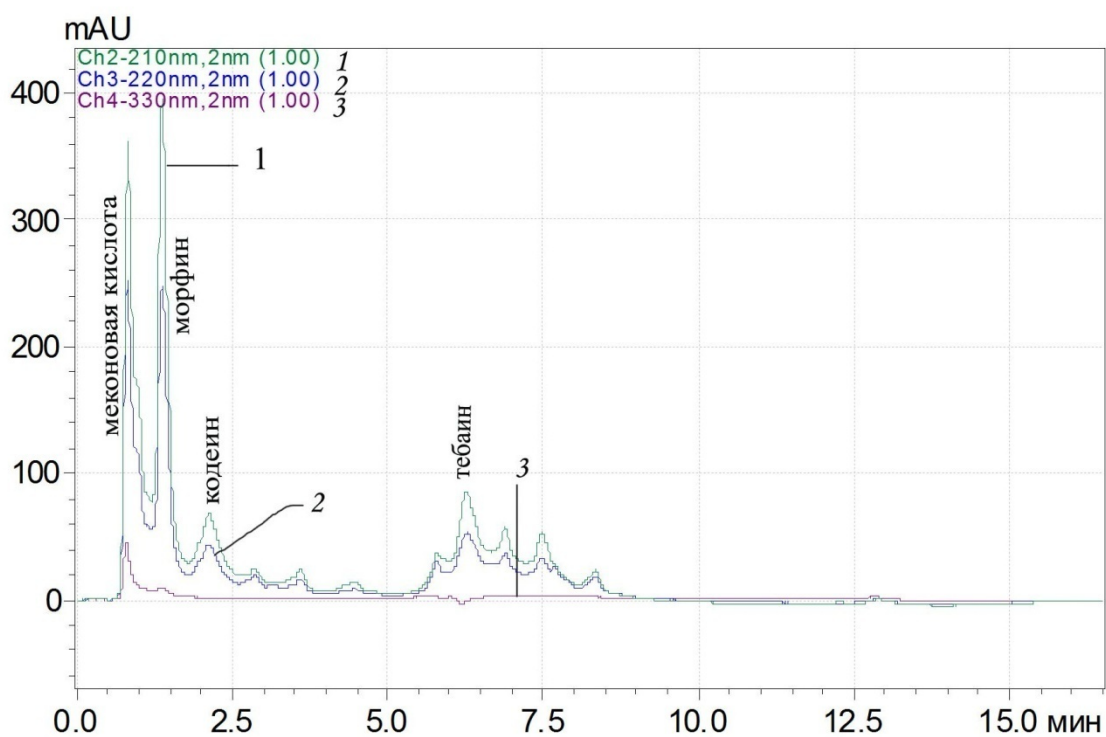


Рисунок 20– Хроматограмма опия (состав экстрагента 35:15:0,05)

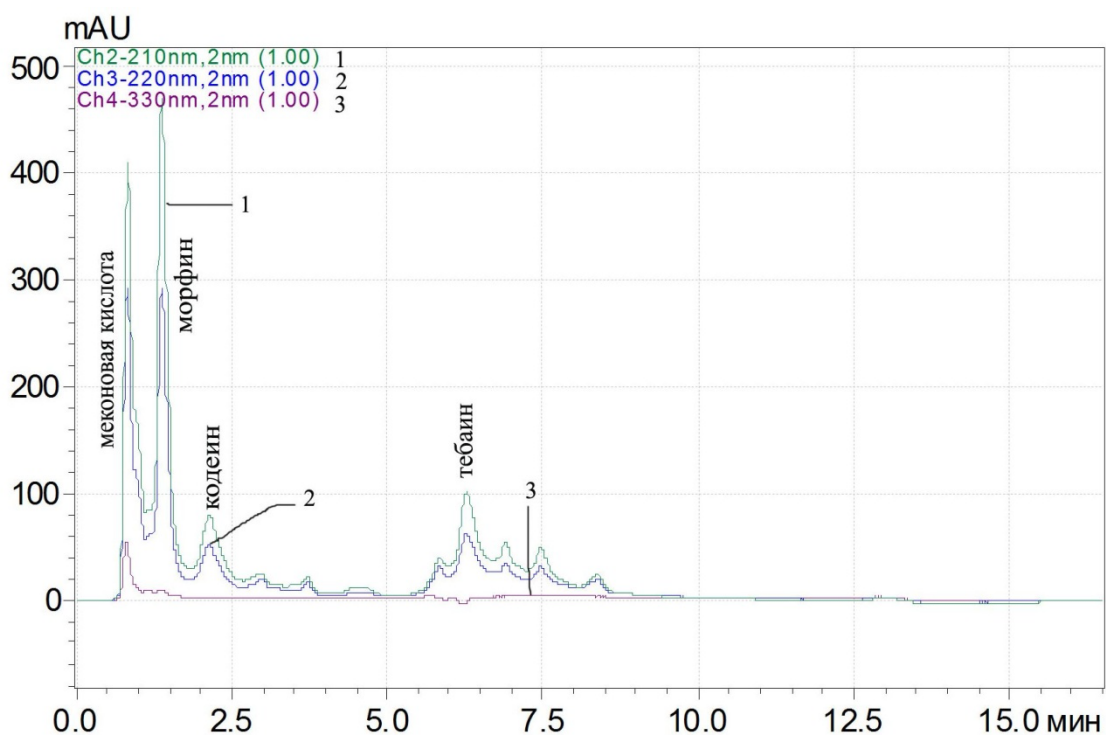


Рисунок 21 – Хроматограмма опия (состав экстрагента 40:10:0,05)

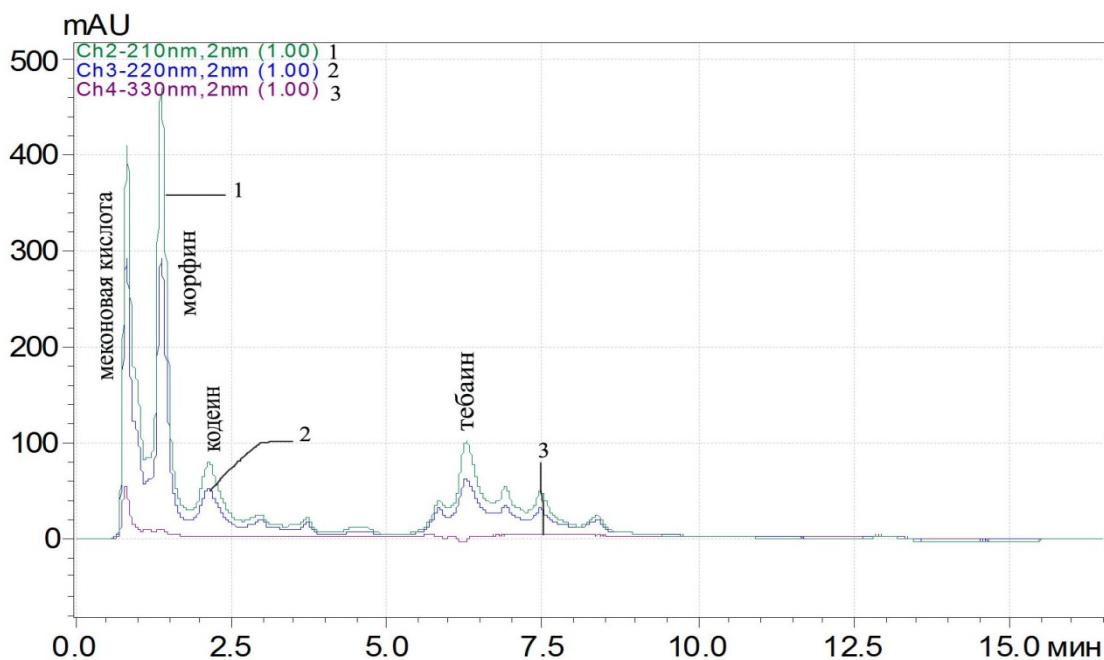


Рисунок 22 – Хроматограмма опия (состав экстрагента 45:5:0,05)

Таблица 15 – Оптимизация условий экстракционного извлечения алкалоидов

| Объем ацетонитрила, мл | Морфин, мг/г семян | Кодеин, мг/г семян |
|------------------------|--------------------|--------------------|
| 5 | 0.341±0.035 | 0.075±0.008 |
| 10 | 0.465±0.048 | 0.090±0.009 |
| 15 | 0.369±0.039 | 0.071±0.007 |

Как видно, наибольшая степень извлечения достигается при соотношении вода:ацетонитрил:кислота 40:10:0.05 соответственно. Проводилась также оптимизация по количеству добавленной о-фосфорной кислоты, т.к. избыток кислоты приведет к увеличению объема экстрагента, а значит к снижению предела обнаружения. Поэтому нами была выбрана о-фосфорная кислота высокой концентрации (85%). Как видно из представленных ниже хроматограммах (рисунки 23–26) и данных количественного анализа (таблица 16), оптимальным объемом кислоты является 0.05 мл, дальнейшее его увеличение не приводит к увеличению степени извлечения алкалоидов [583].

Таблица 16 – Зависимость степени извлечения алкалоидов от объема 85%-ой о-фосфорной кислоты

| Объем кислоты, мл | Морфин, мг/г семян | Кодеин, мг/г семян |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| 0,01 | 0.371±0.039 | 0.064±0.007 |
| 0,03 | 0.433±0.044 | 0.068±0.007 |
| 0,05 | 0.465±0.0048 | 0.090±0.009 |
| 0,07 | 0.465±0.0048 | 0.090±0.009 |

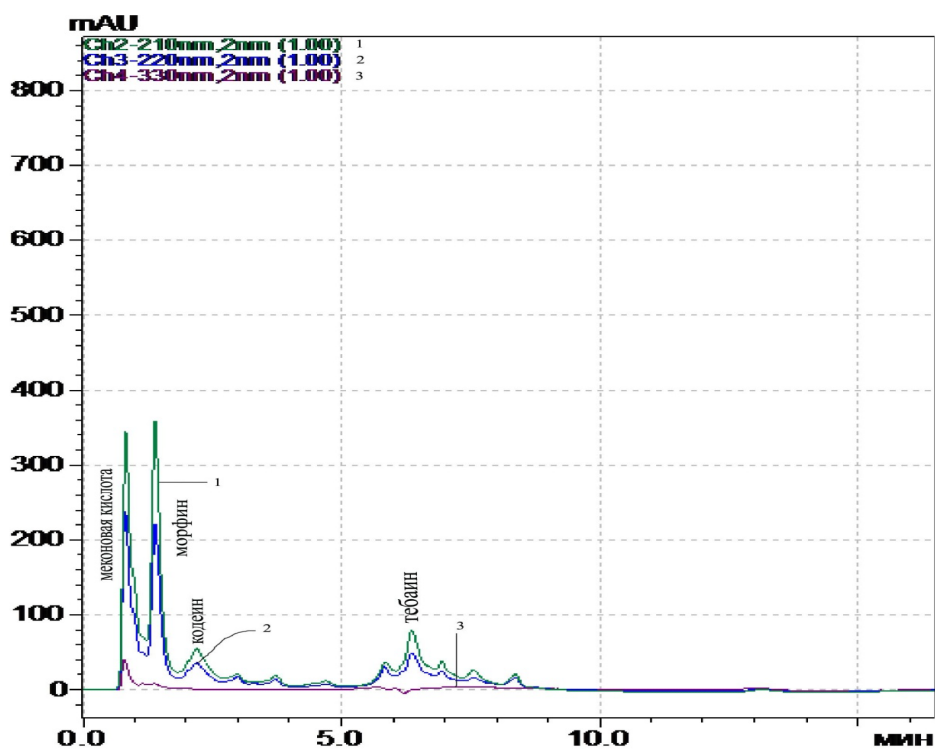


Рисунок 23– Хроматограмма опия (состав экстрагента 40:10:0,01)

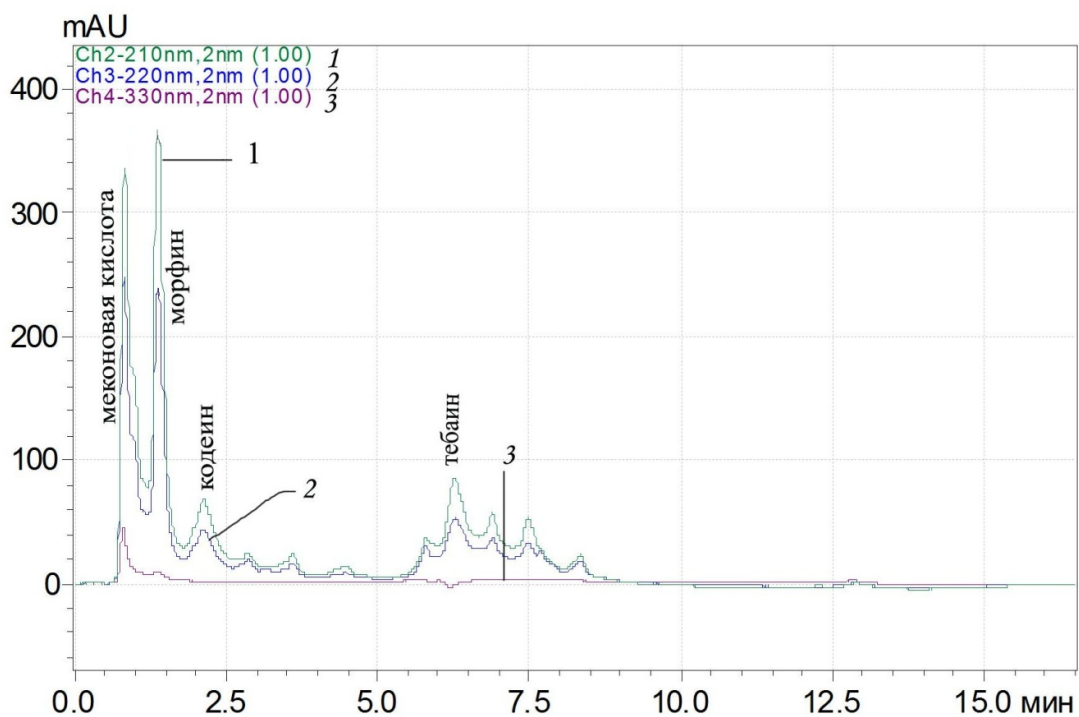


Рисунок 24 – Хроматограмма опия (состав экстрагента 40:10:0,03)

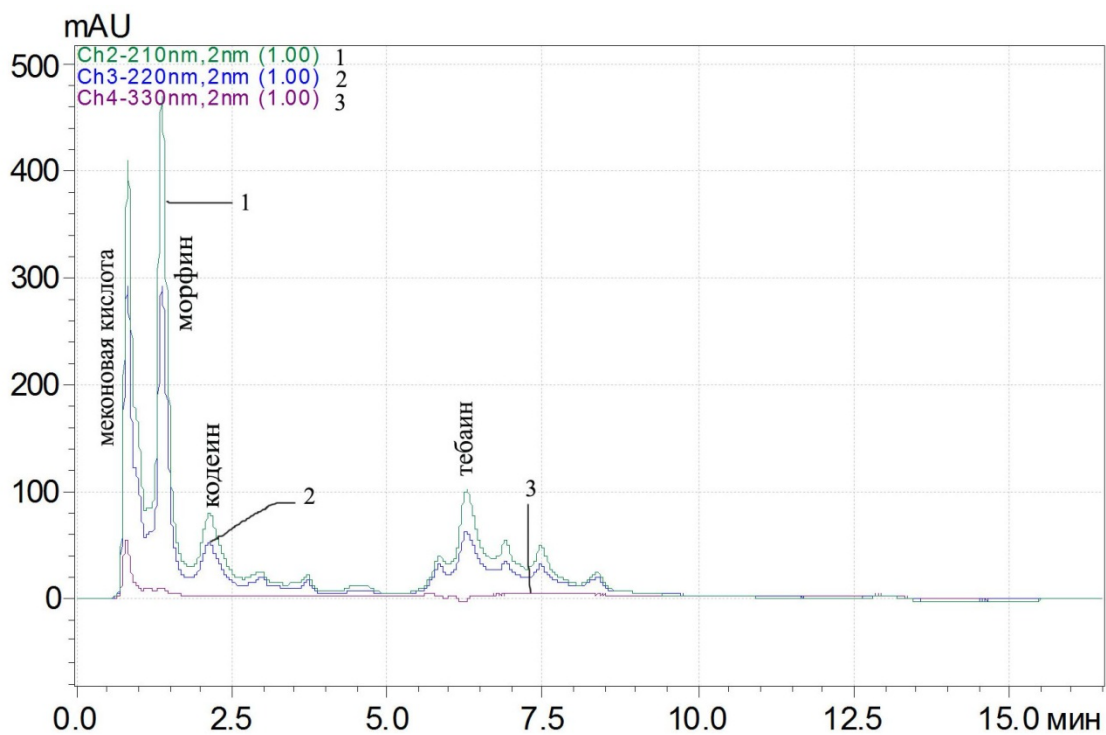


Рисунок 25 – Хроматограмма опия (состав экстрагента 40:10:0,05)

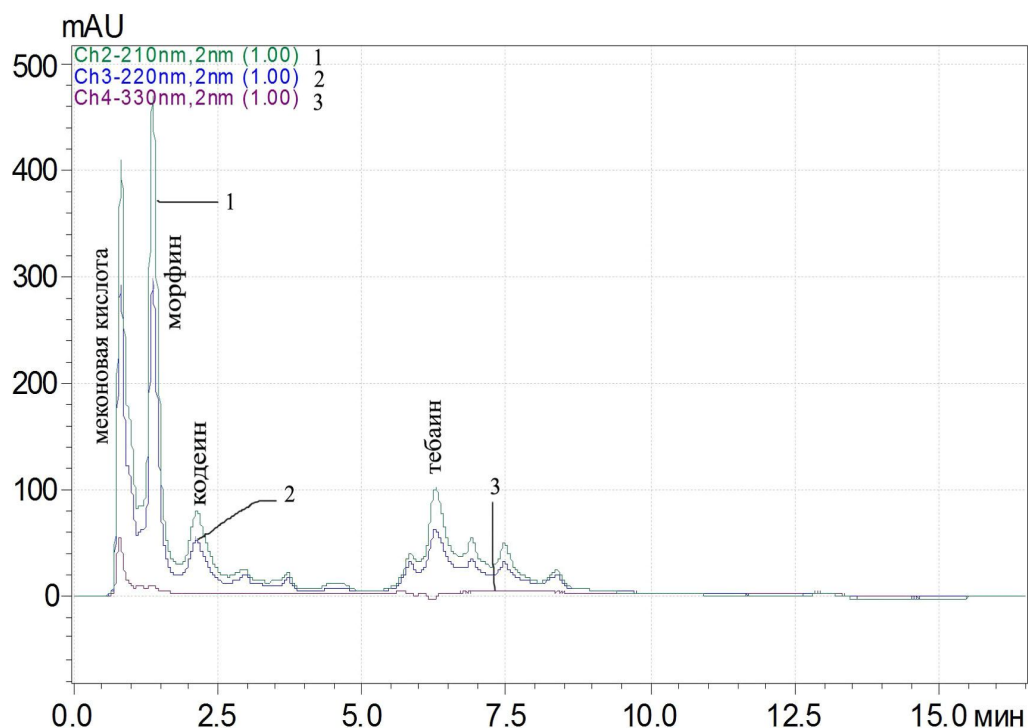


Рисунок 26 – Хроматограмма опия (состав экстрагента 40:10:0,07)

Следует отметить, что данный состав экстрагента позволяет определять меконовую кислоту, которая является природным спутником опия. Идентификация меконовой кислоты проводилась по параметрам удерживания, а также по УФ-спектрам определяемых веществ.

С учетом полученных данных можно утверждать, что для определения опийных алкалоидов на семенах мака пищевого методом ВЭЖХ, возможно применение следующей схемы анализа:

- Экстракция смесью вода:ацетонитрил:о-фосфорная кислота (40:10:0,05) в течение 15 мин.

- Декантация, повторная экстракция.

- Промывка семян и объединение экстрактов, фильтрация.

Условия анализа методом ВЭЖХ:

- Аналитическая колонка Separon SGX C18 (75 × 2.1 мм, 5 мкм).

- Температура термостата 35°C.

– Градиентное двухступенчатое элюирование осуществлялось по программе, приведенной в таблице 17.

– Аналитическая длина волны – 220 нм.

– Объем вводимой пробы 2 мкл.

Таблица 17 – Условия градиентного элюирования опиийных алкалоидов

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.04 М К ₂ НРО ₄ , 10 мМ SDS), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|---|-------------------------|
| 0 | 30 | 70 | 0.35 |
| 4 | 30 | 70 | |
| 6 | 60 | 40 | |
| 9 | 60 | 40 | |
| 10 | 30 | 70 | |
| 16 | 30 | 70 | |

Для определения опиийных алкалоидов на семенах мака пищевого методом ГХ необходимо предварительно избавиться от воды, т.е. перевести аналиты в органическую фазу, так как водный экстракт может привести к гидролизу НЖФ в колонке, кроме того, в этих условиях невозможно проводить дериватизацию водного экстракта, так как будет происходить также гидролиз силилирующего агента (BSTFA).

В отличие от солевых форм опиатов, хорошо растворимых в водных растворах, основные формы эффективно извлекаются органическими растворителями, поэтому перед проведением ЖЖЭ, в пробу добавляли аммиак. Для этого полученный экстракт переносился в круглодонную колбу объемом 100 мл, которая устанавливалась в ротационный испаритель для удаления водно-ацетонитрильной фазы. Полученный сухой остаток перерастворялся в 5 мл хлороформа, затем переносился в термостойкую виалу на 10 мл и упаривался при 50°C до 1 мл в токе азота.

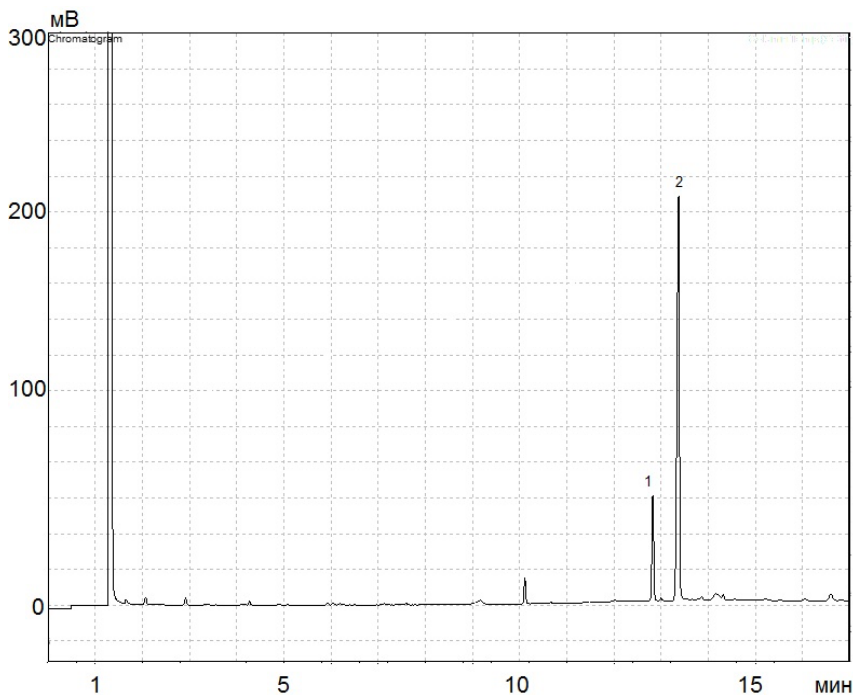
Полученные экстракты анализировались методами ГХ. Для анализа методом ГХ-ПВД применялись следующие условия: температурная программа: 180 °С (2 мин), нагревание до 280 °С со скоростью 10 °С/мин. Общее время

анализа – 18 мин, разделение аналитов осуществлялось на капиллярной колонке Quadrex 007–1, длина 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, газ-носитель – азот, ввод пробы без деления потока, скорость потока через колонку – 1.2 мл/мин.

Для повышения надежности определения опиатов полученные экстракты также анализировались методом ГХ-МС при следующих условиях: температурная программа: 180 °С (2 мин), нагревание до 280 °С со скоростью 10°С в мин.

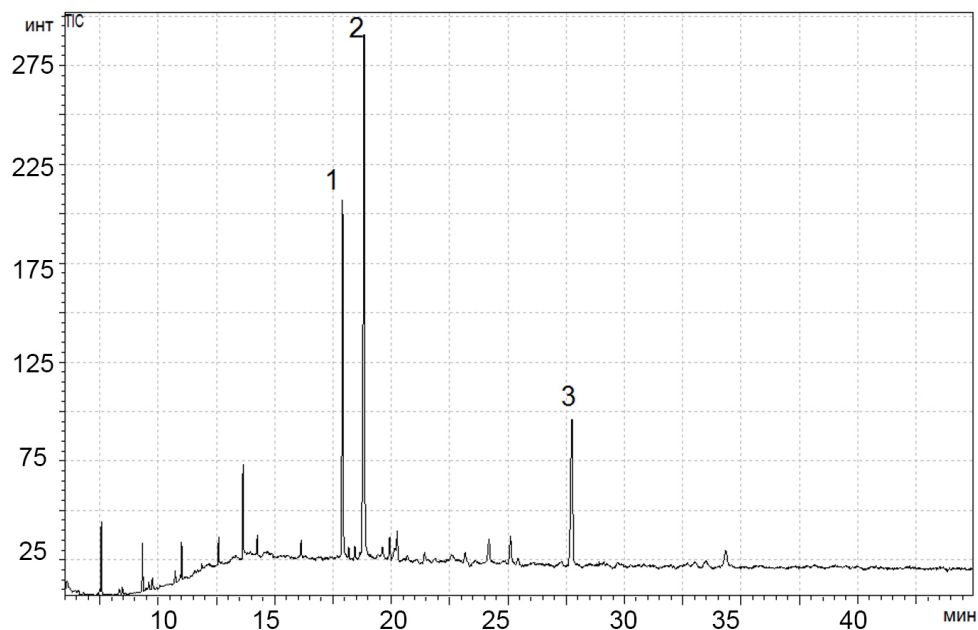
Общее время анализа – 50 мин, разделение на капиллярной колонке Agilent HP-Ultra 1, длина 50 м × 0.5 мм × 0.33 мкм, газ-носитель – гелий, деление потока 1:4, скорость потока через колонку – 1.2 мл/мин.

Идентификация веществ в полученных пробах осуществлялась с использованием параметров удерживания (путем сравнения их с параметрами удерживания стандартных образцов) и библиотечного поиска (ГХ-МС) (рисунки 27, 28).



1 – кодеин; 2 – морфин

Рисунок 27 – ПИД-хроматограмма экстракта опия



1 – морфин; 2 – кодеин; 3 – тебаин

Рисунок 28 – Хроматограмма экстракта опия по полному ионному току

Определение морфина и кодеина в исследуемых образцах также возможно с предварительной дериватизацией конечного экстракта. Наиболее распространенным способом дериватизации в этом случае является силилирование. Нами была рассмотрена и реализована данная схема, поскольку конечный экстракт позволял проводить дериватизацию (рисунок 29). Однако при использовании этого подхода стоит помнить, что в данном случае дериватирующий агент добавляется с большим избытком и существенно снижает срок эксплуатации хроматографической колонки.

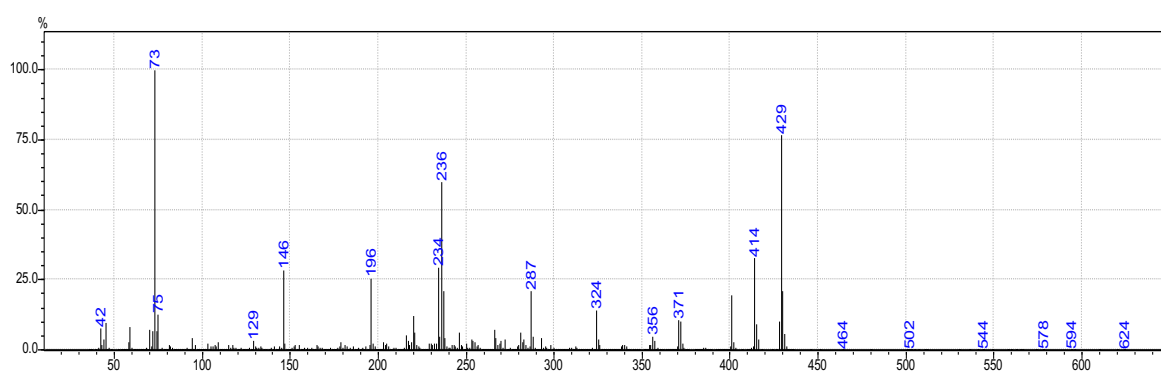
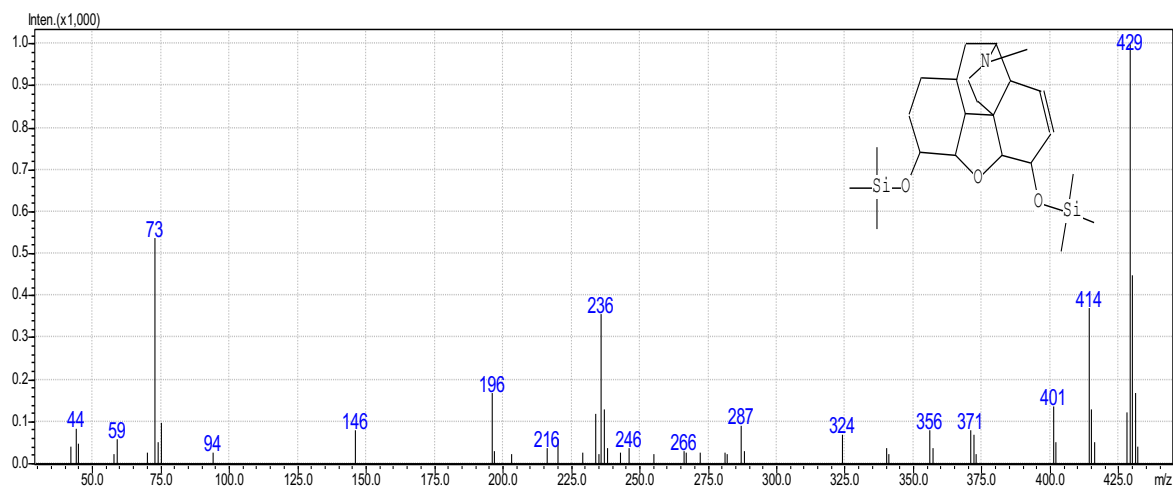


Рисунок 29 – TMS-производное морфина. Библиотечный спектр и спектр образца

Дериватизация проводилась с использованием BSTFA в течение 20 минут при 60°C.

2.3 Определение атропина и скополамина в дурмане индийском

Тропановые алкалоиды, которые содержатся во всех частях растения дурман (известного как дьявольское яблоко, яблоко Тора, дьявольская труба), а также в красавке, извлекаются и применяются при производстве фармацевтических препаратов, обладающих антихолинергическими свойствами [57, 585–589]. С другой стороны, известны и описаны случаи отравления тропановыми алкалоидами, содержащимися в семенах дурмана [587]. Основными представителями тропановых алкалоидов в дурмане являются атропин и скополамин, входящие в список сильнодействующих и ядовитых веществ, разрешенные к обороту на территории России, но подлежащие строгому контролю. Существующие методики идентификации и определения этих алкалоидов не отличаются высокой экспрессностью и селективностью [1, 2, 587].

Государственная фармакопея [586] предусматривает перманганатометрическую методику определения алкалоидов в анализируемом материале с пробоподготовкой, включающую экстракцию алкалоидов диэтиловым эфиром с добавлением аммиака (для перевода алкалоидов в основную форму) и последующую их реэкстракцию в водную среду 0.1 М солянокислым раствором. Существенным недостатком данной методики является то, что таким образом определяются не только общее содержание алкалоидов, но и другие вещества, способные окисляться в условиях перманганатометрического титрования [586]. Например, наличие соединений фенольной природы в анализируемом экстракте может приводить к существенному завышению результатов [587]. Перманганатометрическая методика применяется также в фармакопее Европы и Великобритании [2, 3], при этом во всех вышеописанных способах пробоподготовка занимает в среднем 2 часа.

Известна методика хроматомасс-спектрометрического определения атропина и скополамина в дурмане обыкновенном [588, 589]. Существенным недостатком методики является продолжительность пробоподготовки (24

часа), которая, помимо этого, позволяет оценить содержание в данном материале только атропина и скополамина. В [426] рассматривается случай летального отравления тропановыми алкалоидами, содержащимися в дурмане, а также описывается способ их извлечения и определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ/МС). Данный способ предложен для определения атропина и скополамина в биологических жидкостях человека, методика позволяет обнаружить следовые количества вышеперечисленных алкалоидов. Известны также способы ВЭЖХ-определения атропина и скополамина в красавке с использованием электрохимического детектора [590], в скополии и некоторых других растениях семейства пасленовых – методом капиллярного электрофореза [591, 592]. Представленные выше методики, несмотря на приемлемые метрологические характеристики, не всегда могут быть реализованы ввиду специфичности способов детектирования алкалоидов или из-за существенной разницы в матрицах растительного объекта и биологической жидкости человека. Так, одним из приемов, примененных авторами [593], при разделении атропина и гиосциамина в растительном сырье являлось использование циклодекстрина в качестве хирального селектора, однако при этом не достигается полного разделения компонентов.

Японская фармакопея [1] при пробоподготовке анализируемого объекта предусматривает стадию упаривания органического экстракта и его дальнейшее растворение в этаноле. Такой подход взят за основу при определении алкалоидов и другими авторами [594, 595]. Авторами [595] предложена методика определения атропина и скополамина в скополии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ). В данной работе рассматривается другой объект анализа – порошок скополии, приготовленный в соответствии с требованиями японской фармакопеи, но представляет интерес подход, применяющийся для определения атропина и скополамина. В этом случае в качестве экстрагента

применялась смесь 0,1 М HCl и метанола (8:2) (v:v), а подвижной фазы - ацетатный буфер (pH = 5.0) и ацетонитрил при градиентном элюировании, аналитическая длина волны – 210 нм при скорости потока – 2 мл/мин. При проведении анализа авторами использовалась специфическая колонка, которая несколько затрудняла проведение анализа.

Известен способ идентификации тропановых алкалоидов с применением метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), расшифровку спектров при этом осуществляли с использованием электронных библиотек, интегрированных в программно-аппаратный комплекс прибора, однако такой подход не является в полной мере достоверным [81, 589].

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что известные на сегодняшний день методики идентификации и определения тропановых алкалоидов в растительных материалах не являются в достаточной мере достоверными и представительными.

Нами изучалась возможность разработки экспрессной методики определения некоторых тропановых алкалоидов в дурмане индийском [57].

Растворы и реагенты. Исходные растворы готовили растворением навесок атропина ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) и скополамина гидрохлорида ($\geq 90\%$, Sigma-Aldrich) в дистиллированной воде (30 мг/мл). Для газохроматографического определения атропин и скополамин растворяли в 96.8% этаноле. Дериватизацию проб осуществляли бис-(триметилсилил)-трифторацетамидом (BSTFA). Идентификация фенольных соединений проводилась с применением стандартных образцов ванилиновой, кофейной, транс-феруловой, 4-гидроксибензойной, кумаровой кислот и ванилина («Сигмабиосинтез», Россия). Определение тропановых алкалоидов проводилось в дурмане индийском, собранном на территории г. Краснодара.

Оптимизация условий извлечения. Для определения тропановых алкалоидов в растительном сырье нами были рассмотрены несколько вариантов

пробоподготовки с целью оптимизации условий их извлечения и определения. Исходя из того, что концентрация тропановых алкалоидов в дурмане достаточно велика, для проведения количественного анализа нами использовался метод ВЭЖХ-ДМД.

Состав экстрагента оптимизировали по эффективности извлечения тропановых алкалоидов путем перевода их в органическую фазу с последующей реэкстракцией в водную среду или экстракцией аналитов подкисленными соляной кислотой водными растворами. При этом учитывали тот факт, что атропин и скополамин, представляющие наибольший интерес для медицинских целей, являются эфирами, и нагревание экстракта выше 60 °С вызывает их гидролиз [596].

Экстракцию алкалоидов осуществляли 0.1 М раствором соляной кислоты или смесью диэтилового эфира (чда) и аммиака (25%) с их последующей реэкстракцией в водную среду 0.1 М HCl (рисунок 24). При экстракции алкалоидов по второй схеме возможны потери аналитов за счет стадии реэкстракции, поэтому наибольший интерес представляла экстракция 0.1 М раствором соляной кислоты. Оптимизация проводилась путем варьирования условий извлечения при встряхивании, под действием ультразвука, нагреве на водяной бане при 60 °С.

В ходе экспериментов было установлено, что наибольшая степень извлечения алкалоидов обеспечивается при нагреве на водяной бане и введении этанола в состав экстрагента (рисунок 30), а полнота экстракции обеспечивается при использовании смеси 0.1 М соляной кислоты и спирта (70%) в соотношении 1:1 (v:v).

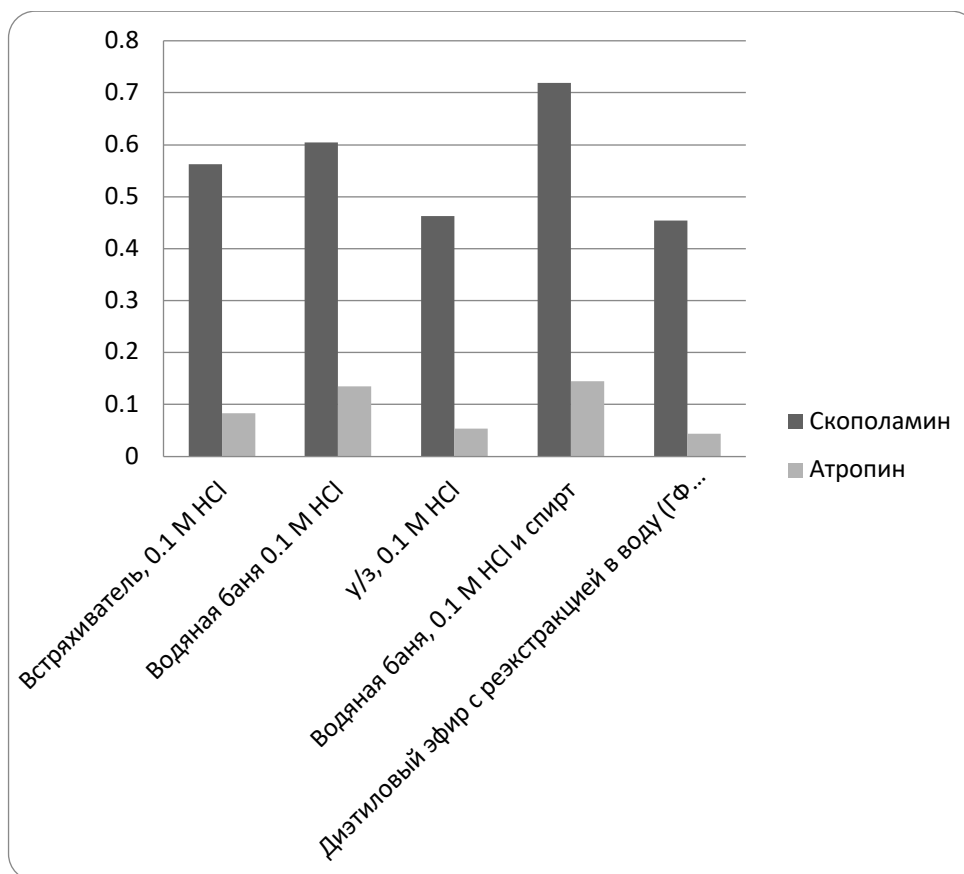
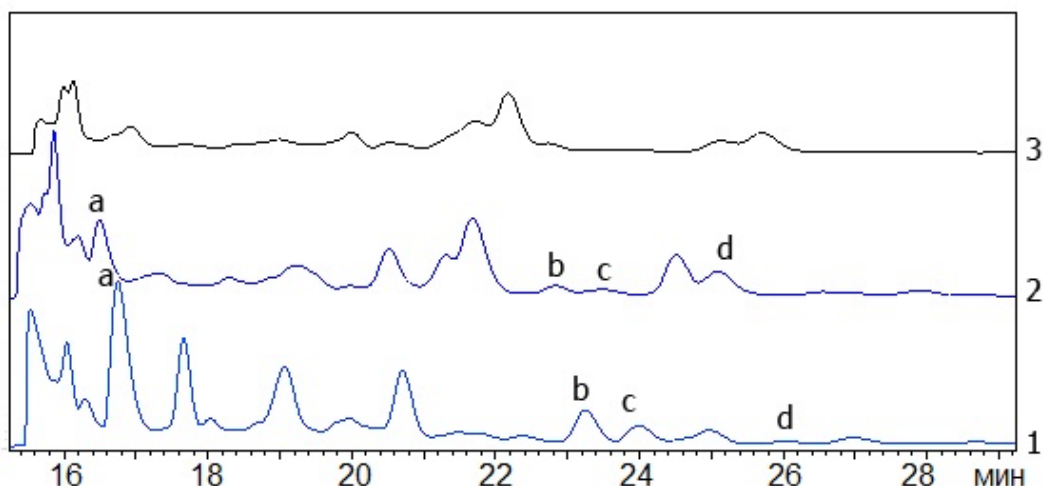


Рисунок 30 – Сравнительная оценка эффективности извлечения алкалоидов при различных условиях пробоподготовки (30 мин) и по фармакопейной методике

По результатам проведенных исследований были оптимизированы условия пробоподготовки. Навеску растения (дурман индийский) массой 2 г, предварительно высушенного в сухом, темном и проветриваемом месте, помещали в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляли 25 мл экстрагента (0.1 М НСІ:70%-ный этанол, 1:1), нагревали на водяной бане при 60 °С в течение 30 мин, после чего фильтровали в колбу объемом 25 мл и доводили дистиллированной водой до метки. Затем 5 мл фильтрата пропускали через патрон для твердофазной экстракции (ТФЭ) (Диapak C₁₈). В этих условиях происходит концентрирование анализа и очистка пробы от необратимо сорбирующихся компонентов.

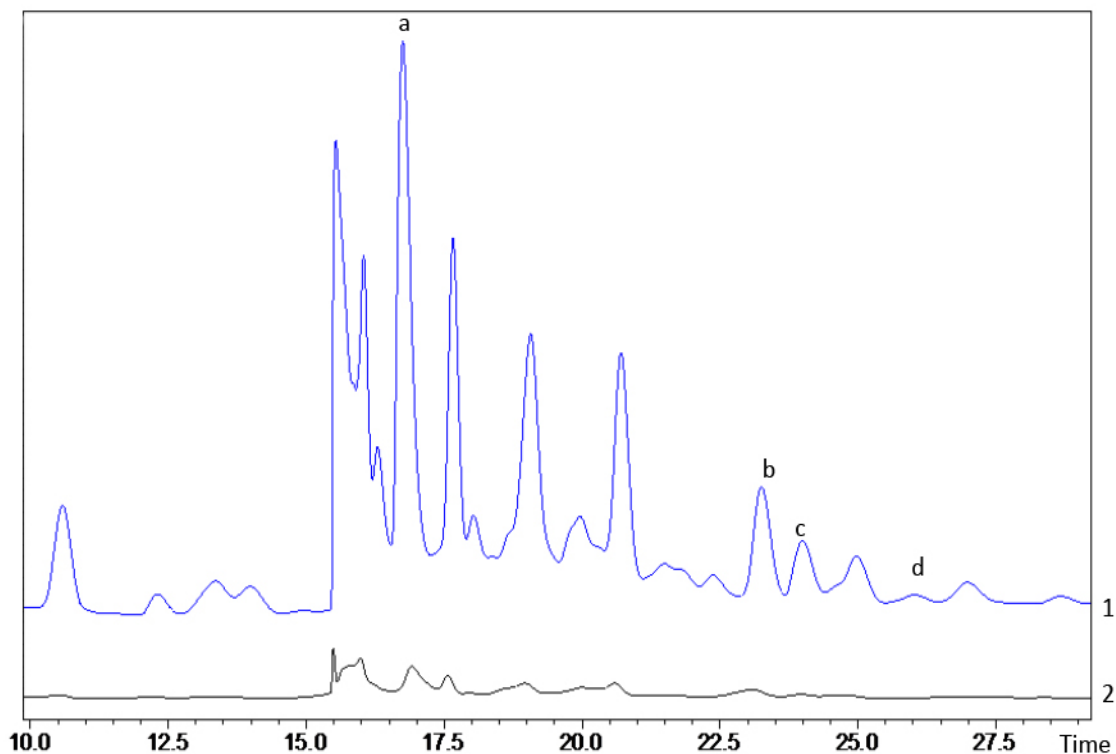
Необходимость и целесообразность проведения стадии ТФЭ при дальнейшем хроматографическом определении алкалоидов проиллюстрирована на рисунке 31. Как видно, эффективность колонки и воспроизводимость

результатов определений алкалоидов в отсутствие стадии ТФЭ существенно ухудшаются при последующих измерениях, даже с использованием предколонки. Так, уже после 20 вколов эффективность разделения существенно ухудшается (число теоретических тарелок уменьшается на 15%), а через 30 вколов разделения не происходит вовсе.



а – скополамин, б – ванилиновая кислота, с – атропин, d – кофейная кислота
Рисунок 31 – Сравнение эффективности работы хроматографической колонки после первого (1), двадцатого (2) и тридцатого ввода пробы (3) без ТФЭ

Для извлечения аналита с концентрирующего патрона проводили его высушивание в токе азота, затем пропускали 1 мл ацетонитрила. Полноту десорбции контролировали по содержанию аналитов в последующих порциях элюата (рисунок 32), степень извлечения составила для скополамина 96%, для атропина – 89%.



а – скополамин, b – ванилиновая кислота, с – атропин, d – кофейная кислота
 Рисунок 32 – Хроматограмма смыва с патрона первой порцией (1 мл) (1) и второй порциями (1 мл) ацетонитрила (2)

Положительным моментом предлагаемой схемы пробоподготовки является то, что она пригодна для исследований различными хроматографическими методами (ВЭЖХ и ГХ). Отдельно следует отметить, что полученная проба деградирует в течение 24 часов.

Газохроматографический анализ. При определении тропановых алкалоидов методом ГХ-МС отсутствует необходимость в предварительной дериватизации ввиду их термической устойчивости. С другой стороны, по данным [597], содержание тропановых алкалоидов в дурмане индийском может достигать 0.6% в пересчете на сухое сырье, а по данным [598] содержание фенольных соединений и флаваноидов в нем составляет до 30% от содержания алкалоидов. С учетом этого можно предположить, что эти компоненты (фенольные соединения, флаваноиды и др.) могут вносить существенный вклад в погрешность определения алкалоидов титриметрическим методом. Представляла научный интерес также возможность установления наличия фенольных

соединений в экстракте дурмана, которые термически неустойчивы, но могут вносить вклад в ошибку определения при перманганатометрическом титровании алкалоидов. Для идентификации и определения фенольных соединений [599] в экстракте проводилась предварительная дериватизация (силилирование) экстрактов разных частей растения с помощью 20 мкл BSTFA при 60 °С в течение 30 мин. В этом случае, наряду с фенольными соединениями, дериватизируются также и некоторые тропановые алкалоиды (атропин, скополамин, анисодамин). Для определения этих компонентов нами применялась температурная программа с программируемым нагревом от 90 до 300 °С со скоростью 10 °С/мин, время анализа – 50 мин, объем вводимой пробы – 1 мкл, деление потока 1:10. Идентификация компонентов проводилась с использованием библиотечного поиска (NIST 05, Wiley) и растворов стандартных образцов (таблица 18).

Апоатропин и апоскополамин, которые были идентифицированы в ходе исследования, являются продуктами деградации атропина и скополамина [489], анисодамин был идентифицирован с учетом литературных данных [489, 490], индексов удерживания и применением библиотеки NIST (рисунок 33).

Таблица 18 – Результаты ГХ-МС-идентификации компонентов дериватизированных экстрактов, полученных из разных частей растения

| Часть растения | Соединение | | | | | | | | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|------------|---------|---------------------|-------------------------|------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------|---------------|
| | Атропин | Скополамин | Апоатропин | Анисодамин | Ванилин | Ванилиновая кислота | транс-феруловая кислота | Кофейная кислота | Салициловая кислота | 4-гидроксibenзойная кислота | Кумаровая кислота | Апоскополамин |
| Стебель | - | + | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + |
| Лист | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Коробочка | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + |
| Семена | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + |

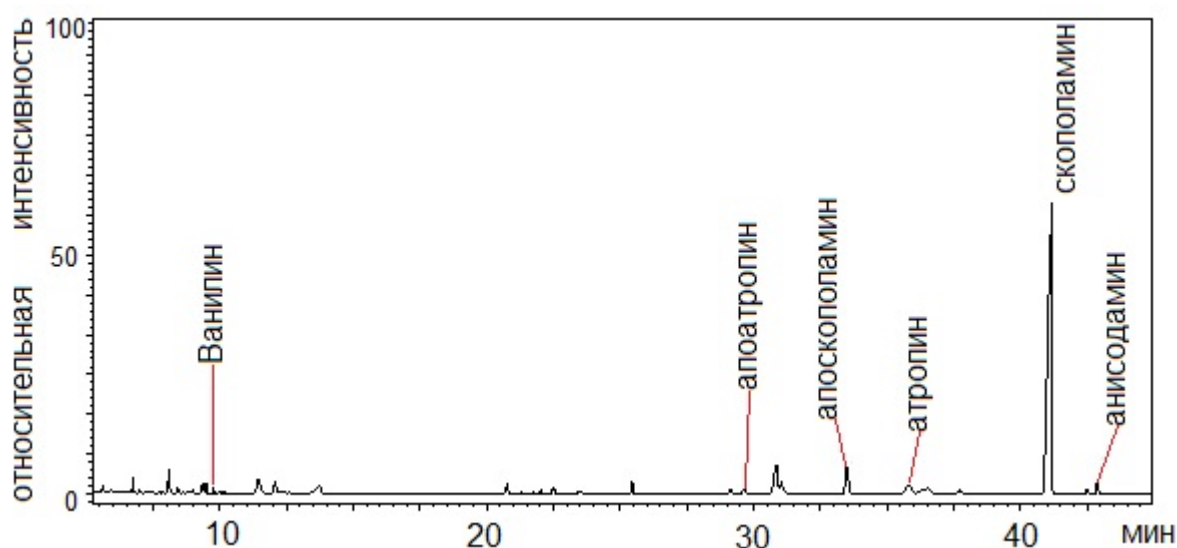


Рисунок 33 – ТИС-хроматограмма экстракта семян дурмана индийского

ВЭЖХ-определение тропановых алкалоидов

Полученный по предложенной схеме пробоподготовки экстракт можно анализировать методом ВЭЖХ, что особенно важно при количественной оценке содержания атропина и скополамина в растительном сырье.

Описанные выше условия элюирования не могут быть использованы для определения тропановых алкалоидов из-за невысокой эффективности их разделения, необходимо было разработать новую программу элюирования с использованием более эффективной и длинной колонки, что привело к увеличению продолжительности анализа. Несомненным преимуществом применения новой колонки стала возможность отказаться от применения ион-парного реагента для повышения эффективности разделения.

Для ВЭЖХ-ДМД определения алкалоидов применяли подвижную фазу, состоящую из фосфатного буфера с рН = 3.5, модифицированную изопропанолом (1%) (v:v) (А), и ацетонитрила (В) в следующих условиях:

- температура термостата – 35°C;
- объем вводимой пробы – 2 мкл;
- аналитическая длина волны – 220 нм;
- элюирование градиентное, трехступенчатое (таблица 19).

Таблица 19 – условия градиентного элюирования тропановых алкалоидов

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.02 М К ₂ НРО ₄ , 1% i-PrOH), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|---|-------------------------|
| 0 | 0 | 100 | 0.3 |
| 10 | 0 | 100 | |
| 10.2 | 10 | 90 | |
| 25 | 10 | 90 | |
| 28 | 70 | 30 | |
| 38 | 70 | 30 | |
| 42 | 0 | 100 | |
| 48 | 0 | 100 | |

Согласно литературным данным [595–597], рН 7–10 атропин и скополамин сильнее удерживаются на колонке, чем при рН = 3.5. Но, как показали исследования [594], более эффективное разделение и определение некоторых соединений фенольной природы, входящих в состав растения, обеспечивается с использованием системы с рН = 3.5. При этом тропановые алкалоиды достаточно слабо удерживаются, что и обуславливает необходимость

использования данной программы элюирования. Идентификация определяемых веществ проводилась по спектральным данным и параметрам удерживания аналитов в стандартных растворах и экстрактах. Линейный диапазон определяемых концентраций атропина и скополамина составил от 10 до 30 мг/мл, а предел детектирования - 3 мкг/мл для обоих веществ (таблица 20).

Таблица 20 – Аналитические характеристики методики ВЭЖХ-УФ определения атропина и скополамина ($P = 0.95$, $n = 6$)

| Компонент | C, мг/мл | Уравнение регрессии | <i>r</i> |
|------------|----------|------------------------|----------|
| Атропин | 0.01–30 | $Y = 3802016 \times c$ | 0.99 |
| Скополамин | 0.01–30 | $Y = 3202303 \times c$ | 0.99 |

С использованием данной схемы проводилось ВЭЖХ-УФ определение атропина и скополамина в различных частях растения, результаты сведены в таблице 21.

Таблица 21 – Содержание атропина и скополамина в различных частях дурмана индийского

| Часть растения | Атропин | Скополамин |
|----------------|-------------|-------------|
| Стебель | 0.010±0.001 | 0.199±0.016 |
| Коробочка | 0.105±0.009 | 0.627±0.050 |
| Лист | 0.897±0.072 | 0.330±0.026 |
| Семена | 0.233±0.019 | 1.66±0.13 |

Для ВЭЖХ-МС определения алкалоидов применение фосфатного буфера неприемлемо, поэтому в качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил (А) и воду, подкисленную муравьиной кислотой до рН = 3 (В), элюирование градиентное, двухступенчатое (таблица 22).

Таблица 22 – условия градиентного элюирования тропановых алкалоидов

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% HCOOH), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 | 10 | 90 | 0.3 |
| 10 | 10 | 90 | |
| 12 | 80 | 20 | |
| 27 | 80 | 20 | |
| 28 | 10 | 90 | |
| 35 | 10 | 90 | |

При ВЭЖХ-МС анализе данная система элюирования позволяет проводить экспрессное определение тропановых алкалоидов. При этом не обязательно добиваться полного разрешения пиков или проводить предварительную дериватизацию пробы, поскольку все исследуемые вещества имеют разные значения m/z . Учитывая, что исследуемые вещества являются достаточно полярными, оптимальным представлялось применение электрораспылительной ионизации. Условия детектирования алкалоидов приведены в таблице 23.

Таблица 23 – условия детектирования тропановых алкалоидов

| Параметр | Значение |
|---------------------------------|---------------|
| Температура распылителя | 300°C |
| Температура линии десольватации | 270°C |
| Напряжение на капилляре | 3500 V |
| Полярность | положительная |
| Поток газа-распылителя | 1.5 л/мин |
| Потока газа-осушителя | 20 л/мин |

В этих же условиях возможно определение соединений, ионизирующихся в разной полярности в ходе одного измерения за счет её последовательного переключения, в случае необходимости. Это позволяет проводить

экспрессное определение большего количества компонентов с высокой чувствительностью, особенно в режиме SIM.

В ходе ВЭЖХ-МС исследований в режиме регистрации положительных ионов в экстракте дурмана индийского идентифицировали и определили помимо скополамина и атропина, гоматропин, апоскополамин, апоатропин (рисунок 34).

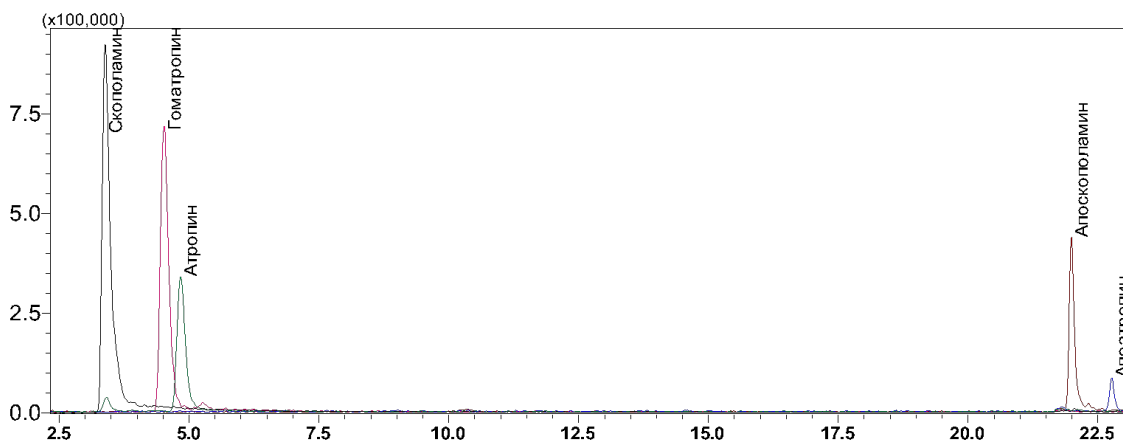


Рисунок 34 – ESI+ хроматограмма экстракта дурмана индийского

Предложенные схемы анализа являются экспрессными и обеспечивают полноту извлечения аналитов, а также возможность идентификации и определения тропановых алкалоидов в растительном сырье различными хроматографическими методами. При этом линейный диапазон определяемых концентраций атропина и скополамина составил от 10 до 30 мкг/мл, предел детектирования составляет 3 мкг/мл для обоих веществ.

2.4 Определение некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения

В последние годы спектр наркотических средств существенно расширился, в первую очередь, за счет синтетических каннабиноидов, широко применяемых в курительных смесях типа «Спайс», а также стимуляторов, являющихся производными α -аминоарилкетонов и продающиеся под видом солей для ванн и удобрений. Несмотря на предпринимаемые государственными и контрольными органами усилия, список запрещенных к обороту веществ постоянно пополняется, особенно наркотических средств синтетического происхождения. Среди этих веществ наиболее распространены соединения серии JWH, которые входят в группу так называемых синтетических каннабиноидов, однако не имеющие ничего общего с природными каннабиноидами за исключением того, что они также являются агонистами каннабиноидных рецепторов (CB₁ и CB₂). При этом новые соединения, как правило, не уступают, а порой превосходят своих предшественников по степени воздействия на эти рецепторы. Носителем данных соединений, как показала практика служб наркоконтроля, может выступать практически любое предварительно высушенное растение [115].

Популярность и распространенность синтетических каннабиноидов не уменьшается поскольку на смену уже запрещенным соединениям приходят новые. Как показали исследования [14], вышедшие на рынок соединения (JWH-018, CP 47,497 и JWH-073), а также ряд других соединений могут являться потенциальными наркотическими средствами, т.к. обладают высокой аффинностью по отношению к CB₁ и CB₂ рецепторам. Авторами [132] предложен способ определения ряда соединений, входящих в состав курительных смесей, однако в данных условиях возможно определение весьма ограниченного перечня веществ.

Использование аналитических методов идентификации веществ, приведенных в вышеперечисленных работах, весьма проблематично из-за большой продолжительности и трудоемкости стадии пробоподготовки, особенно для практических целей. Проблемным и сложным остается также установление структур определяемых компонентов методом ЯМР из-за сложности и влияния матричного состава. Реализация на практике таких схем идентификации весьма затруднена и не всегда возможна, так как в одной пробе могут содержаться несколько действующих компонентов, среди которых могут быть также стимуляторы и анестетики. В большинстве случаев это очень трудоемкий и материалоемкий процесс, при этом количества полученного образца зачастую недостаточно для препаративного выделения чистых соединений.

Помимо синтетических наркотических средств в экспертно-криминалистической практике часто встречается источник каннабиноидов растительного происхождения – конопля. Для количественной оценки содержания каннабиноидов в соответствии с методическими рекомендациями ООН [87] рекомендуется газохроматографическое определение этих веществ с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД), а также использование ГХ-МС для проведения качественного анализа и подтверждения. Оценка содержания каннабиноидов ведется по каннабидиолу (СВD), тетрагидроканнабинолу (ТНС) и каннабинолу (СВN). Для ГХ-определения кислотных форм тетрагидроканнабинола и каннабидиола проводится их предварительная дериватизация с целью получения триметилсилильных производных, устойчивых к температурному воздействию. Как показали исследования [5], содержание ТНС и других каннабиноидов в растении варьируется в зависимости от взятой части растения, условий произрастания, наличия факта культивирования. На практике определение ТНС в конопле для целей криминалистических экспертиз проводится согласно методической рекомендации [54], в которой в ходе пробоподготовки предполагается кипячение пробы в этаноле, а метилстеарат вносится в качестве внутреннего стандарта для количественной оценки их содержания.

Такая схема может приводить в некоторых случаях к существенному искажению результатов анализа, поскольку форма нахождения каннабиноидов существенно зависит от условий хранения и определения испытуемого образца, при этом следует также отметить, что пробоподготовка, описанная в рекомендациях, занимает около часа.

Интересен подход [63], позволяющий оценить содержание не только тетрагидроканнабинола, но и других компонентов, таких, как каннабигерол, каннабидиол, каннабинол, в конопле. Однако предложенная ими схема пробоподготовки является также весьма продолжительной.

В качестве объектов исследования нами были выбраны и изучены вещества, изъятые в ходе оперативных действий МВД России по Краснодарскому краю. Образцы были представлены в виде курительных смесей «Спайс», порошков, продававшихся под видом солей для ванн и удобрений для растений, а также в виде измельченных частей растения (конопли). Для подтверждения наличия синтетических каннабиноидов в пробах использовали образцы курительных смесей из экспертных коллекций с известными действующими агентами. В качестве растворителя использовали 96.8%-ый этанол, определение проводилось с использованием методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС. Для расчета индексов удерживания веществ использовали раствор парафинов в октане (Sigma-Aldrich). Определение действующих веществ в анализируемых объектах проводили с использованием жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии [600].

Предварительная подготовка анализируемых образцов осуществляли следующим образом. Навеску образцов курительных смесей и конопки, массой 0.050 г, предварительно высушенных при 80 °С, помещали в эппендорф, добавляли 1 мл 96.8% этилового спирта и проводили ультразвуковое извлечение веществ в течение 10 мин, затем пробу центрифугировали (4 мин) на микроцентрифуге (3000 об/мин) и отбирали супернатант. При анализе курительных смесей целесообразно его предварительное разбавление этанолом (в 200

раз) ввиду высокой концентрации определяемых веществ в полученном экстракте.

Газохроматографический анализ

Для определения содержания ТНС в конопле с помощью ГХ-ПИД были использованы следующие условия: температурная программа с программируемым нагревом от 90 до 280°C со скоростью 10°C/мин, скорость потока через колонку – 1.5 мл/мин, объем вводимой пробы – 1 мкл, ввод пробы без деления потока.

Оптимизацию условий извлечения каннабиноидов из конопли проводили с помощью ультразвукового воздействия и методики, применяемой в криминалистической практике [55]. Полученный супернатант упаривали в токе азота, после чего растворяли в 500 мкл этанола. Оценку содержания ТНС проводили методом ГХ-ПИД с использованием метилстеарата, вносимого в качестве внутреннего стандарта на стадии экстракции из растительного сырья. Содержание ТНС оценивали по метилстеарату с учетом относительного массового коэффициента пересчета, равного 1 [54].

Проведенные исследования по оптимизации условий пробоподготовки показали (рисунок 35), что применение ультразвука (в течение 10 мин) с последующим центрифугированием обеспечивает большую степень извлечения каннабиноидов (на 10%), чем при кипячении. Предлагаемая схема пробоподготовки анализируемых объектов с применением ультразвуковой экстракции пригодна для исследований различными хроматографическими методами (ВЭЖХ и ГХ), а также позволяет повысить экспрессность анализа.

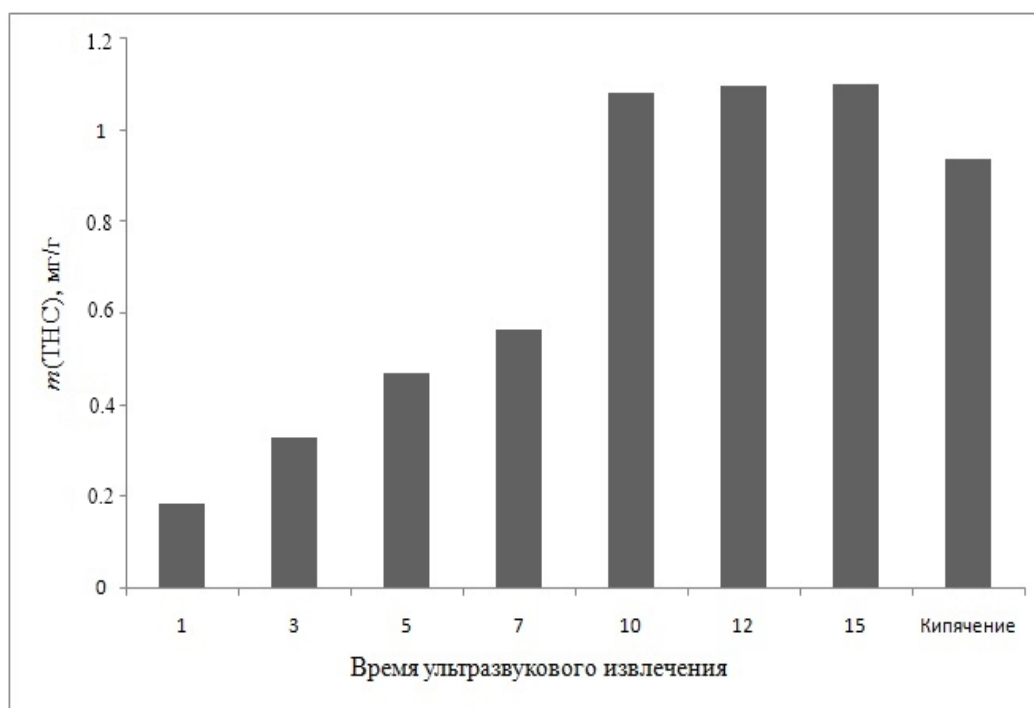


Рисунок 35 – Оптимизация условий извлечения ТНС из конопли (n = 3)

Для проведения скрининга с использованием газовой хроматомасс-спектрометрии использовали следующие условия: программируемый нагрев колонки от 200 до 290°C со скоростью 5°C/мин, время анализа 50 мин, объем вводимой пробы 1 мкл, деление потока 1:10, поток газа-носителя через колонку – 0.8 мл/мин.

Поскольку используемый способ экстракции не является селективным, целесообразным представлялась оценка количества соэкстрактивных веществ для установления возможных матричных влияний. Из рисунка 36 видно, что в данных условиях количество соэкстрактивных веществ достаточно мало и не может оказывать существенное мешающее влияние.

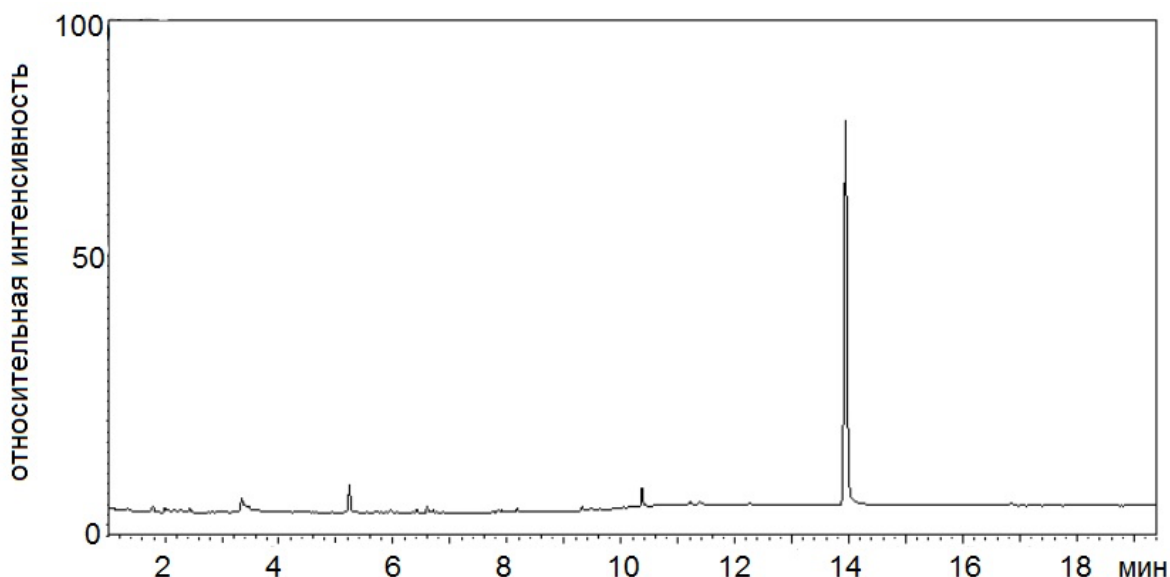


Рисунок 36 – Хроматограмма экстракта курительной смеси по полному ионному току (ТIC)

Для повышения точности и надежности определения использовали критерии ВАДА, согласно которым для подтверждения наличия определяемого соединения в пробе необходимо использовать не менее 3 характеристичных ионов, а время удерживания стандартного образца и компонента пробы не должно отличаться более чем на 2% или 0.1 минуты. Также рекомендуется использовать как минимум один подтверждающий метод, особенно для соединений, дающих малоинформативные спектры ЭИ. Так, например, MDPV и α -PVP дают единственный характеристичный ион со значением m/z 126, но они имеют существенно отличающиеся индексы удерживания, по значениям которых их можно дифференцировать.

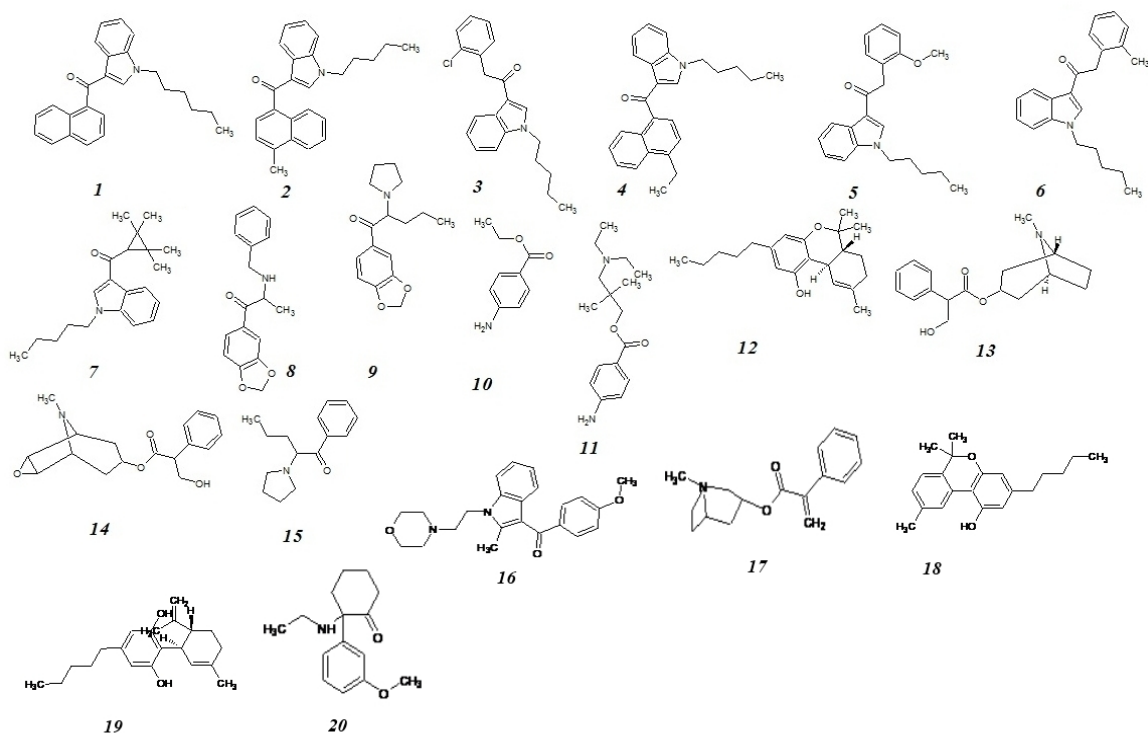
Для оптимизации условий одновременного хроматографического определения аналитов полученные пробы объединяли, результаты представлены в таблице 24, из которой видно, что THC и UR-144 не разделены хроматографически, однако могут быть различены с использованием характеристичных ионов. Структурные формулы основных идентифицированных компонентов представлены на рисунке 37.

Таблица 24 – Индексы удерживания и характеристичные ионы компонентов, рассчитанные по результатам ГХ-МС-анализа

| Название | Индексы удерживания (ИУ) | Характеристичные ионы (m/z) |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| Бензокаин | 1551 | 120 (100), 92 (34), 65 (32), 165 (28), 137 (19) |
| α -PVP | 1768 | 126 (100) |
| Метокситамин | 1895 | 190 (100), 219 (36), 134 (27), 91 (17), 176 (16) |
| Апоатропин | 2068 | 124 (100), 96 (52), 82 (51), 67 (24), 103 (20), 77 (17), 271 (14) |
| MDPV (метилендиоксипировалерон) | 2131 | 126 (100) |
| Ларокаин | 2203 | 86 (100), 120 (65), 58 (64) |
| Атропин | 2210 | 124 (100), 82 (28), 94 (22), 67 (15), 289 (8) |
| Каннабипинол | 2267 | 231 (100), 314 (19), 174 (10) |
| Тетрагидроканнабиварин | 2284 | 271 (100), 203 (80), 243 (70), 286 (69), 91 (47) |
| BMDP (метилендиоксибензилкатинон) | 2328 | 91 (100), 134 (41), 65 (23) |
| Скополамин | 2329 | 94 (100), 138 (58), 108 (41), 136 (26), 154 (22), 97 (21), 81 (20) |
| Каннабихром | 2343 | 231 (100), 174 (12), 314 (6) |
| Каннабидиол | 2389 | 231 (100), 246 (11), 174 (10), 121 (99), 314 (8) |
| UR-144 | 2482 | 214 (100), 144 (32), 311 (16), 296 (14), 116 (10), 238 (8), 252 (8), 229 (8) |
| Дельта-9-тетрагидроканнабинол | 2483 | 299 (100), 314 (81), 231 (75), 271 (47), 243 (41), 91 (27) |
| Каннабинол | 2550 | 295 (100), 296 (22), 238 (16), 310 (12), 223 (6) |
| JWH-251 | 2817 | 214 (100), 144 (33), 215 (16), 116 (12), 319 (6) |

| | | |
|------------|------|--|
| JWH-203 | 2899 | 214 (100), 144 (33), 215 (16), 116 (12), 339 (4) |
| JWH-250 | 2908 | 214 (100), 144 (32), 215 (16), 116 (11), 91 (8), 335 (6) |
| AKB48 | 3133 | 215 (100), 145 (84), 337 (49), 294 (45), 365 (40), 280 (29), 135 (22), 93 (22), 320 (21) |
| JWH-019 | 3159 | 355 (100), 284 (90), 127 (80), 144 (56), 338 (56), 228 (55), 155 (45), 354 (41), 270 (35), 356 (25) |
| JWH-122 | 3178 | 355 (100), 298 (72), 338 (57), 214 (55), 144 (45), 284 (31), 354 (30), 141 (28), 169 (28) |
| JWH-210 | 3221 | 369 (100), 312 (69), 144 (62), 352 (61), 214 (46), 368 (40), 340 (33), 195 (33), 370 (26) |
| Правадолин | 3246 | 100 (100) |

В образцах, продававшихся под торговыми названиями «АКВ48» и «ЛТИ-258», было обнаружено новое соединение, предположительная структура, фрагментация, а также масс-спектр которого представлены на рисунке 38. Стоит отметить, что для этого вещества (предположительно N-адамантиламид-1-пентил-1-Н-индазолтрикарбоновой кислоты) характерен переход m/z 365 к m/z 337, обусловленный потерей карбонильной группы. Данное соединение не относилось к числу известных синтетических каннабиноидов на момент его обнаружения, но в скором времени были опубликованы публикации [154], посвященные идентификации данного соединения, согласно которым структура соединения была установлена верно.



1 – JWH-019; 2 – JWH-122; 3 – JWH-203; 4 – JWH-210; 5 – JWH-250;
 6 – JWH-251; 7 – UR-144; 8 – BMDP; 9 – MDPV; 10 – бензокаин;
 11 – ларокаин; 12 – THC; 13 – атропин; 14 – скополамин; 15 – α-PVP;
 16 – правадолин; 17 – апоатропин; 18 – каннабинол; 19 – каннабидиол;
 20 – метокситамин

Рисунок 37 – Основные идентифицированные компоненты

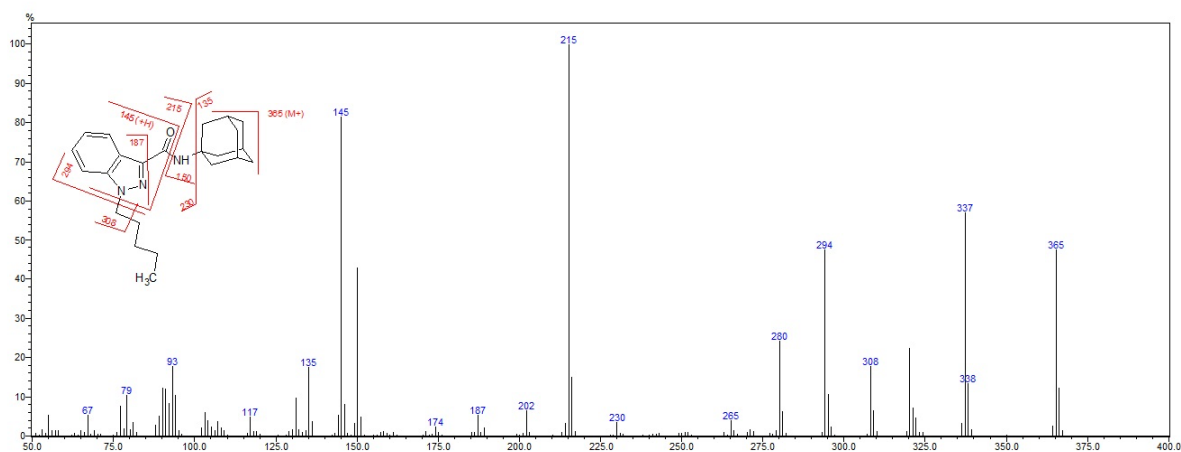


Рисунок 38 – Масс-спектр (ЭИ) синтетического каннабиоида, обнаруженного в курительных смесях «АКВ48» и «ЛТИ-258» (N-адамантиламид-1-пентил-1-Н-индазолтрикарбоновой кислоты)

ВЭЖХ-определение соединений. Для изучения возможности идентификации различных соединений при их совместном присутствии с использованием метода ВЭЖХ-МС проводили анализ смеси экстрактов, полученных в ходе пробоподготовки курительных смесей, конопли, солей для ванн. Анализ экстрактов проводили в следующих условиях:

- температура термостата – 35°C;
- объем вводимой пробы – 1 мкл;
- градиентное трехступенчатое элюирование осуществляли по следующей программе (таблица 25);
- условия детектирования с использованием электрораспылительной ионизации приведены в таблице 26.
- разделение осуществлялось на аналитической колонке Luna C18(2) 250 × 2 мм, 5 мкм (Phenomenex) с предохранительной колонкой C₁₈ 4 2 мм, 5 мкм (Phenomenex).

Общее время определения испытуемых веществ составляло 30 мин (рисунок 39).

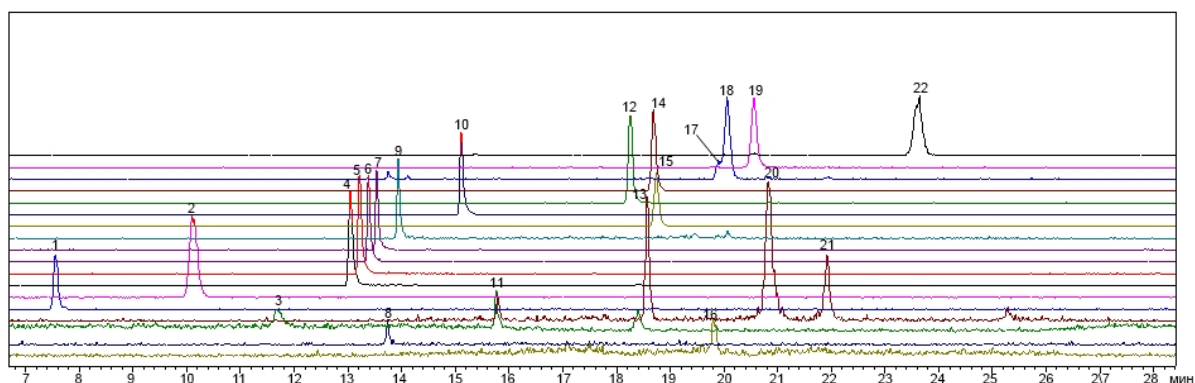
Таблица 25 – Условия градиентного элюирования аналитов

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% HCOOH), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 100 | 0.45 |
| 1.5 | 0 | 100 | |
| 2.5 | 10 | 90 | |
| 8.5 | 10 | 90 | |
| 10 | 85 | 15 | |
| 19 | 85 | 15 | |
| 20 | 0 | 100 | |
| 30 | 0 | 100 | |

Таблица 26 – Условия детектирования аналитов

| Параметр | Значение |
|---------------------------------|---------------|
| Температура распылителя | 300°C |
| Температура линии десольватации | 270°C |
| Напряжение на капилляре | 4500 V |
| Полярность | положительная |
| Поток газа-распылителя | 1.5 л/мин |
| Потока газа-осушителя | 20 л/мин |

В ходе ВЭЖХ-МС анализа смеси были идентифицированы 22 соединения (таблица 27). Следует отметить, что в данных условиях не удалось разделить JWH-122 и JWH-019, они элюируются совместно, при этом m/z для иона $[M+H]^+$ совпадают, поскольку имеют одинаковые молекулярные массы.



- 1 – скополамин; 2 – атропин; 3 – ларокаин; 4 – метокситамин; 5 – α -PVP;
 6 – MDPV; 7 – BMDP; 8 – апоатропин; 9 – правадолин; 10 – бензокаин;
 11 – каннабидиол; 12 – JWH-250; 13 – CBD-COON; 14 – JWH-251; 15 – JWH-203;
 16 – каннабинол; 17 – JWH-019; 18 – JWH-122; 19 – UR-144; 20 – THC;
 21 – THC-COON; 22 – АКВ48

Рисунок 39 – ESI(+) – хроматограмма смеси, приготовленной из экстрактов различных объектов анализа

Таблица 27 – Соединения, определяемые в ходе ВЭЖХ-МС анализа

| Соединение | Время удерживания | m/z | Молекулярная масса |
|----------------------|-------------------|---|--------------------|
| Скополамин | 7.55 | 304 [M+H] ⁺ | 303 |
| Атропин | 10.12 | 290 [M+H] ⁺ | 289 |
| Ларокаин | 11.71 | 279 [M + H] ⁺ | 278 |
| Метокситамин | 13.05 | 248 [M+H] ⁺ | 247 |
| α-PVP | 13.24 | 232 [M+H] ⁺ | 231 |
| MDPV | 13.39 | 276 [M+H] ⁺ | 275 |
| BMDP | 13.54 | 284 [M+H] ⁺ | 283 |
| Апоатропин | 13.74 | 272 [M+H] ⁺ | 272 |
| Правадолин | 13.94 | 379 [M+H] ⁺ | 378 |
| Бензокаин | 15.11 | 166 [M+H] ⁺ | 165 |
| JWH-250 | 18.25 | 336 [M+H] ⁺ ; 358 [M+ Na] ⁺ ; 399 [M + CH ₃ CN + Na] ⁺ | 335 |
| JWH-251 | 18.69 | 320 [M+ H] ⁺ ; 383 [M + CH ₃ CN + Na] ⁺ | 319 |
| JWH-203 | 18.74 | 340 [M + H] ⁺ | 339 |
| JWH-019 | 19.90 | 356 [M + H] ⁺ | 355 |
| JWH-122 | 20.10 | 356 [M + H] ⁺ | 355 |
| UR-144 (TMCP-018) | 20.57 | 312 [M + H] ⁺ | 312 |
| АКВ48 | 23.64 | 366 [M + H] ⁺ ; 388 [M + Na] ⁺ ; 429 [M + CH ₃ CN + Na] ⁺ | 365 |
| Каннабинол | 19.80 | 311 [M + H] ⁺ | 310 |
| Каннабидиол | 15.80 | 315 [M + H] ⁺ | 314 |
| THC | 20.85 | 315 [M + H] ⁺ | 314 |
| THC-COOH | 21.91 | 315 [M (-COOH) + H] ⁺ | 359 |
| CBD-COOH | 18.58 | 315 [M (-COOH) + H] ⁺ | 359 |

Помимо этого, как видно из таблицы 27, для некоторых определяемых соединений возможно образование аддуктов [M+AcN+Na]⁺ и [M+Na]⁺. Кроме того, при определении каннабиноидов методом ВЭЖХ-МС возможно определение кислотных форм каннабиноидов, однако при нагревании

происходит их декарбоксилирование, поэтому для определения целесообразно выбирать ионы, соответствующие THC и CBD.

2.5 Оптимизация условий скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения

Ввиду того, что описанный выше способ скрининга может применяться для ограниченного числа соединений, целесообразным представлялась его оптимизация для расширения числа и спектра определяемых компонентов и сокращения времени анализа. Для достижения поставленной задачи использовали методы быстрой газовой хроматографии и ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, что обеспечило большую точность и надежность определения. Применимость этой схемы проверяли путем анализа реальных объектов криминалистической экспертизы – курительных смесей, «солей» и ряда неизвестных образцов: “Eclipse moon”, “Eclipse sun”, “Turbo”, “Box-up”, “Hydro zero”, “Hydro fire”, “888”, “GOAmoon”, “shirsh”, “power”, “Jah Riigh”, “Zeus”, “Harvest”, “Rill”, “Agro”, “z-03” и 7 пакетов без этикеток. Стандартные образцы наркотических средств (чистота $\geq 90\%$) были предоставлены ЭКЦ МВД Краснодарского края.

Газохроматографическое определение. Образцы анализировали с использованием газового хроматографа Trace 1310, соединенного с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum XLS (Термо) под управлением ПО XCalibur 2.2. Для определения веществ использовали следующие условия:

- ввод пробы с делением потока (1:40);
- колонка Thermo TG-SQC capillary (15 м × 0.25 мм × 0.25 мкм);
- температура инжектора 250°C;
- газ-носитель – гелий;
- скорость газа через колонку – 1.2 мл/мин;
- температурная программа: плато 1 мин при 150°C, нагрев до 280 со скоростью 10°C/мин, плато при 280°C в течение 10 мин.

Для регистрации аналитических сигналов использовали следующие параметры масс-спектрометра:

- температура переходной линии – 260°C;
- температура источника ионов – 250°C;
- электронная ионизация (ЭИ).

Подготовку проб к анализу проводили по ранее описанной схеме, которая обеспечивает полноту извлечения целевых соединений при минимальном количестве соэкстрактивных веществ [600].

При анализе испытуемых образцов использовали критерии ВАДА, согласно которым разница между временем удерживания стандарта и исследуемого вещества не должна превышать 0.1 мин, а для идентификации использовать как минимум 3 характеристичных иона, абсолютные отношения относительных интенсивностей которых должны укладываться в установленные ими погрешности. Полученные индексы удерживания изученных наркотических веществ, а также основные характеристичные ионы представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Индексы удерживания и характеристичные ионы наркотических веществ, рассчитанные по результатам ГХ-МС-анализа

| Соединение № | Название соединения | Индекс удерживания | m/z (интенсивность) |
|--------------|-----------------------|--------------------|--|
| 1 | Амфетамин | 1165 | 44 (100), 91 (16) |
| 2 | 4-фторамфетамин | 1182 | 44 (100), 109 (12), 83 (9) |
| 3 | Метиопропиламин (МРА) | 1215 | 58 (100) |
| 4 | 4-метиламфетамин | 1264 | 44 (100) |
| 5 | Бенизацетамид | 1439 | 43 (100), 106 (62), 149 (45), 91 (22), 77 (19) |
| 6 | PMMA | 1457 | 58 (100) |
| 7 | Мефедрон | 1467 | 58 (100) |
| 8 | Пентедрон | 1502 | 86 (100), 44 (75), 77 (50), 105 (15) |
| 9 | Пирацетам | 1517 | 41 (100), 98 (56), 70 (46), 84 (38) |

| | | | |
|----|-----------------------|------|---|
| 10 | 4-МЕС | 1522 | 72 (100), 44 (46), 91 (21) |
| 11 | Бензокаин | 1584 | 120 (100), 65 (51), 165 (36), 92 (33), 137 (22) |
| 12 | Метилон | 1719 | 58 (100) |
| 13 | СРР | 1755 | 154 (100), 56 (45), 196 (33), 111 (29), 138 (26) |
| 14 | Гелиамин | 1756 | 164 (100), 193 (70), 121 (42), 77 (40), 149 (25) |
| 15 | МРРР | 1758 | 98 (100), 91 (27), 56 (21) |
| 16 | АМТ | 1775 | 44 (100), 131 (51), 174 (7) |
| 17 | Этилон | 1775 | 72 (100), 44 (40) |
| 18 | α -РVP | 1780 | 126 (100) |
| 19 | бк-МВDB (бутилон) | 1788 | 72 (100) |
| 20 | 2С-В | 1814 | 230 (100), 77 (48), 91 (26), 105 (24), 215 (21), 259 (17) |
| 21 | Пентилон (бк-МВDP) | 1838 | 86 (100), 44 (57), 121 (10), 149 (10) |
| 22 | Димедрол | 1850 | 58 (100), 73 (17), 165 (18) |
| 23 | МХЕ | 1869 | 190 (100), 219 (33), 134 (30) |
| 24 | МDPBP | 2102 | 112 (100) |
| 25 | МDPV | 2176 | 126 (100) |
| 26 | Метадон | 2202 | 72 (100) |
| 27 | Атропин | 2253 | 124 (100), 82 (31), 94 (29), 67 (18), 103 (10), 289 (10) |
| 28 | Кокаин | 2265 | 77 (100), 82 (77), 105 (65), 94 (48), 182 (38), 303 (20) |
| 29 | Апрофен | 2281 | 86 (100), 99 (15), 165 (12), 181 (10) |
| 30 | Нафирон | 2321 | 126 (100) |
| 31 | Скополамин | 2331 | 94 (100), 138 (54), 108 (43), 303 (20) |

| | | | |
|----|------------------|------|---|
| 32 | bk-MDBZA | 2332 | 91 (100), 134 (55), 65 (31) |
| 33 | Кодеин | 2352 | 299 (100), 32 (87), 115 (28), 162 (18), 280 (17), 214 (17) |
| 34 | Морфин | 2369 | 42 (100), 285 (91), 115 (31), 162 (20), 215 (17) |
| 35 | UR-144 | 2381 | 214 (100), 311 (40), 296 (19) 144 (18), 252 (12), |
| 36 | Моноацетилморфин | 2602 | 43 (100), 327 (45), 268 (12), 215 (9) |
| 37 | Тебаин | 2606 | 311 (100), 296 (72), 42 (54) |
| 38 | Героин | 2723 | 43 (100), 369 (27), 327 (21), 310 (8), 268 (10) |
| 39 | JWH-251 | 2905 | 214 (100), 133 (30), 105 (25), 319 (18) |
| 40 | Папаверин | 2927 | 338 (100), 324 (96), 293 (13), 308 (11) |
| 41 | JWH-203 | 2991 | 214 (100), 125 (30), 339 (15), 116 (12) |
| 42 | JWH-250 | 3004 | 214 (100), 91 (50), 144 (18), 335 (17) |
| 43 | AM-694 | 3086 | 232 (100), 220 (97), 435 (90), 144 (34), 165 (29), 204 (26), 308 (26) |
| 44 | AKB48 (APINACA) | 3205 | 365 (100), 337 (68), 215 (53), 145 (52), 294 (41), 320 (29) |
| 45 | JWH-018 | 3255 | 341 (100), 127 (58), 324 (39), 284 (32), 270 (19), 214 (18) |
| 46 | 5-F-AKB48 | 3315 | 41 (100), 383 (92), 233 (86), 355 (85), 145 (80), 294 (50) |
| 47 | AM-2201 | 3375 | 359 (100), 342 (42), 127 (41), 284 (25), 232 (15) |

| | | | |
|----|---------|------|---|
| 48 | JWH-122 | 3391 | 355 (100), 338 (50), 298 (32), 115(29), 144 (25), 214 (20) |
| 49 | PB-22 | 3444 | 214 (100), 144 (40), 116 (33), 89 (20), 358 (10) |
| 50 | JWH-210 | 3462 | 369 (100), 352 (49), 312 (25), 340 (21), 214 (13), 144 (11) |
| 51 | AM-1220 | 3622 | 98 (100) |
| 52 | NNEI | 3623 | 214 (100), 115 (54), 144 (30), 356 (20) |

Ранее нами описывались соединения с малоинформативными спектрами электронной ионизации, такие как MDPV и α -PVP [571], однако в ходе данного исследования для проверки работоспособности предлагаемого способа был дополнительно введен еще один катинон, имеющий такой же характеристичный ион (m/z 126) – нафирон. Большинство идентифицированных соединений можно отнести к нескольким классам: алкалоидам (тропановые, опийные), α -аминоарилкетоны, а также производным N-алкилиндолилкетонов, N-алкилиндазолилкетонов. Кроме того, стоит отметить, что для амфетамина и его производных характерно образование наиболее интенсивного иона с m/z 44, что существенно осложняет проведение анализа следовых количеств подобных НС, поскольку обычные режимы съемки подразумевают работу в диапазоне от 50 Да, чтобы исключить влияние и вклад углекислого газа в масс-спектр.

Для повышения информативности спектра приняли решение использовать предварительную дериватизацию пробы. В этом случае для дериватизации аналитов не могут быть использованы наиболее распространенные, классические дериватизирующие агенты, используемые для силилирования или ацетилирования, поскольку при проведении анализа они будут давать ионы, характерные для подобных дериватов (например, m/z 73 для TMS-

производных), поэтому для дериватизации использовали циклогексанон, который является основанием Шиффа по следующей реакции (рисунок 40).

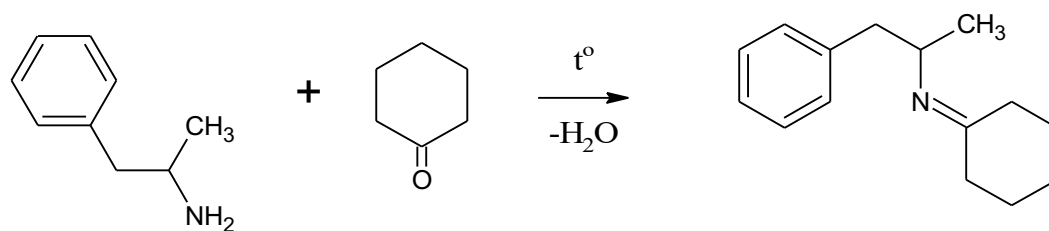


Рисунок 40 – Дериватизация амфетамина с использованием циклогексанона

Данный подход является достаточно удобным, поскольку не требует дополнительного дорогостоящего оборудования, позволяет получить достаточно информативный спектр ЭИ (рисунки 41 и 42), но не лишен ряда недостатков. Выход данной реакции будет максимальным в сильнокислой среде, поэтому кислоту необходимо предварительно нейтрализовать перед вводом пробы в хроматограф. А если говорить о возможности использования данного способа для определения амфетамина в биологических жидкостях, то стоит помнить о возможности протекания ряда побочных реакций, в ходе которых выход искомого вещества может быть непостоянным. Кроме того, для ряда α -аминоарилкетонов эта реакция вообще не протекает (даже в кислой среде), а сам циклогексанон со временем образует перекисные соединения, что существенно затрудняет использование режима сканирования по полному ионному току (в том случае, когда требуется проведение качественного анализа достаточно высоких концентраций аналита).

Таким образом, для скрининга наркотических средств природного и синтетического происхождения оптимальным является использование других способов определения, таких, как ВЭЖХ-МС/МС, позволяющие получить необходимую структурную информацию без предварительной дериватизации (рисунок 43).

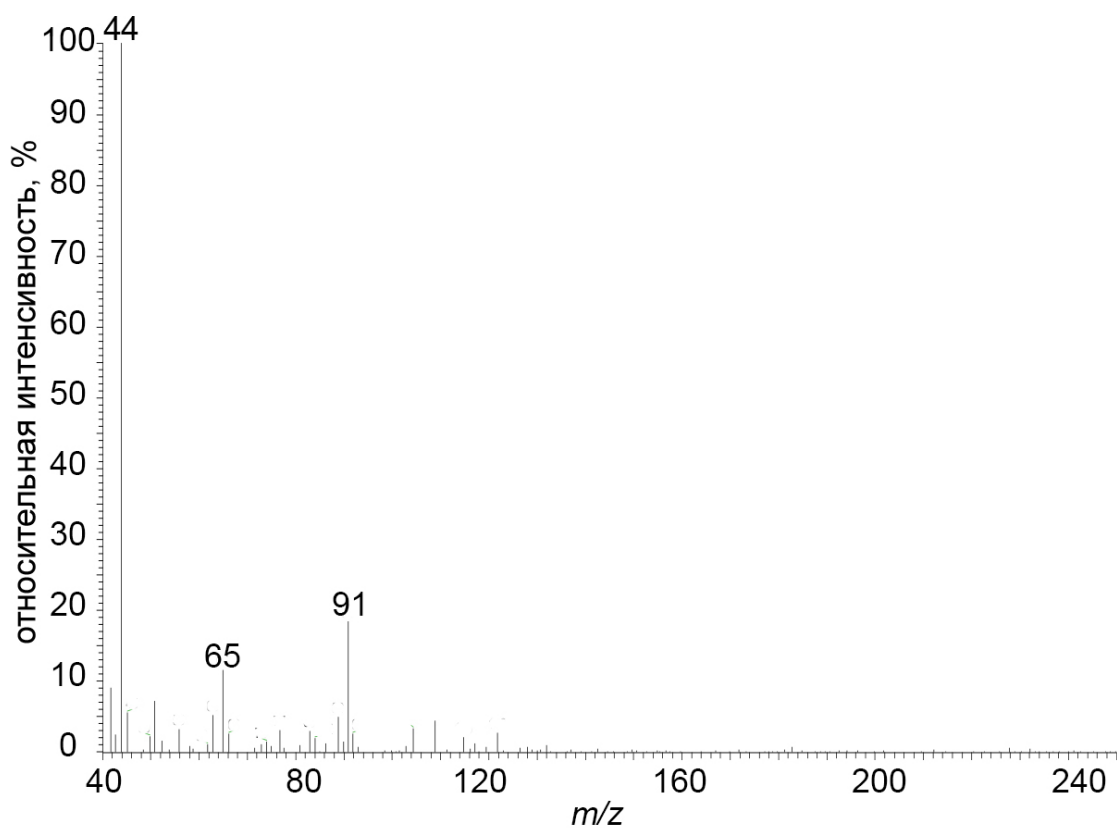


Рисунок 41 – Масс-спектр (ЭИ) амфетамина

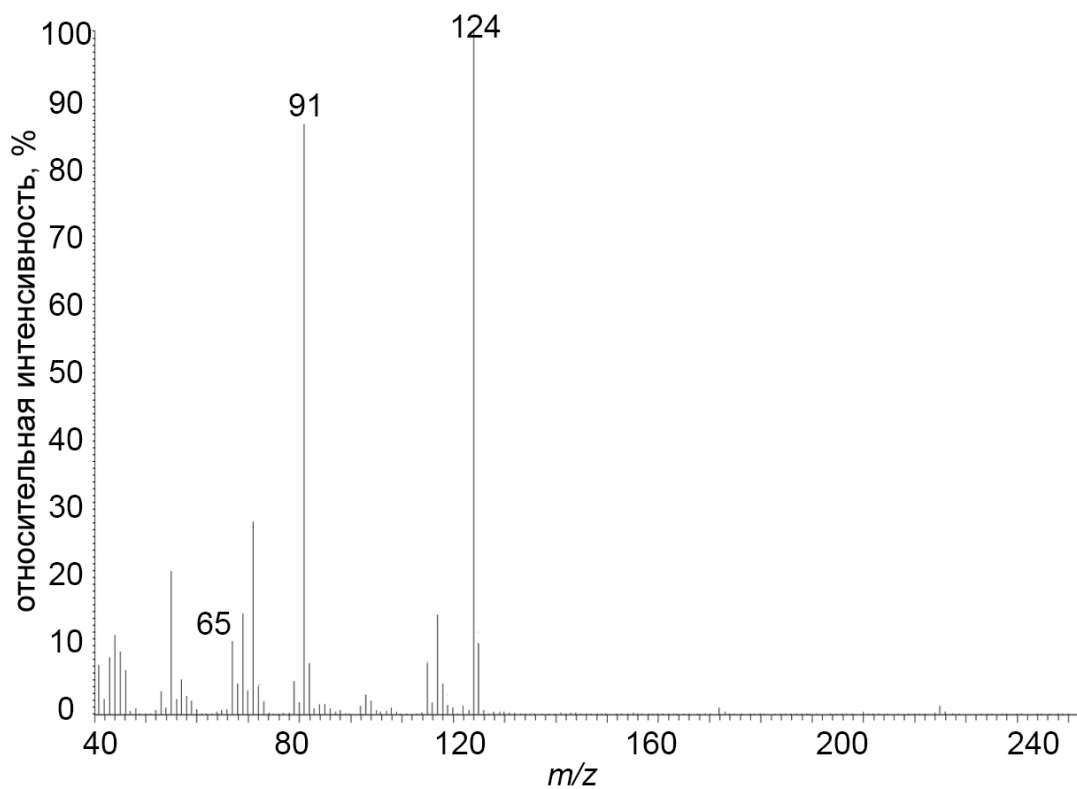


Рисунок 42 – Масс-спектр (ЭИ) деривата амфетамина

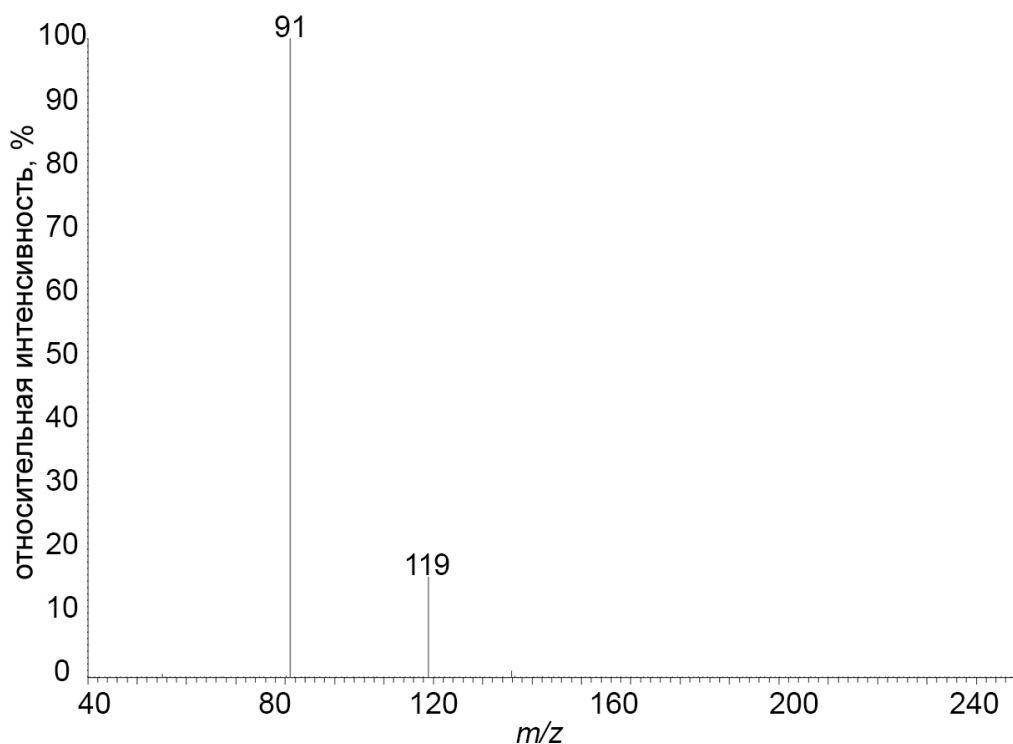


Рисунок 43 – ЭРИ-МС/МС-спектр амфетамина (энергия соударений 10 эВ)

ВЭЖХ-определение наркотических средств природного и синтетического происхождения. Анализ испытуемых образцов осуществляли в режимах сканирования продуктов и селективного мониторинга реакций (SRM). Для этого использовали жидкостный хроматограф (Ultimate-3000, Thermo Scientific), соединенный с тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access MAX с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации положительных ионов, под управлением ПО XCalibur 2.2 в следующих условиях:

- разделение осуществлялось на колонке Phenomenex Kinetex C18 (2.1 мм × 75 мм, 2.6 мкм);
- объем вводимой пробы – 1 мкл;
- скорость потока – 0.8 мл/мин;
- градиентное элюирование осуществлялось по следующей программе (таблица 29);
- условия детектирования приведены в таблице 30.

Таблица 29 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% HCOOH), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 | 5 | 95 | 0.8 |
| 0.4 | 5 | 95 | |
| 5.5 | 20 | 80 | |
| 5.7 | 80 | 20 | |
| 8 | 80 | 20 | |
| 8.1 | 5 | 95 | |
| 10 | 5 | 95 | |

Таблица 30 – Условия детектирования аналитов

| Параметр | Значение |
|--|---------------|
| Температура ионного источника | 450°C |
| Температура нагреваемого капилляра | 380°C |
| Напряжение на капилляре | 3500 V |
| Полярность | положительная |
| Поток газа-распылителя | 75 усл. ед. |
| Поток вспомогательного газа | 20 усл. ед. |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений | 1.5 мТорр |

Высокая точность, экспрессность и воспроизводимость результатов стали решающими факторами при выборе второго метода определения – УВЭЖХ-МС/МС. Для подтверждения данных, полученных с использованием ГХ-МС, использовали УВЭЖХ-МС/МС систему (тройной квадруполь) в режиме MRM. Для каждого соединения установили оптимальные значения энергии коллизии, соответствующие каждому переходу, которые определяли путем её последовательного увеличения (с шагом в 5 В) от 5 до 50 В. Достижение большой чувствительности возможно путем установления точных значений энергии соударений для каждого перехода путем напуска определяемого вещества в камеру источника. В нашем случае при работе с криминалистическими образцами в этом нет необходимости в виду высоких концентраций

аналита, в отличие от случаев анализа биологических жидкостей. Кроме того, использование фиксированного значения энергии соударений в режиме полного сканирования спектра продукт-ионов позволяет использовать полученный спектр как один из параметров для идентификации. Как и в случае с ГХ-МС определения веществ, надежность результатов достигалась соответствием критериям качественного и количественного анализа ВАДА [79].

Несмотря на то, что ширина пика в среднем составляла 0.1 мин, из таблицы 31 видно, что не все соединения были полностью разделены. Однако практически для всех соединений, имеющих одинаковые ионы-прекурсоры, нами достигнуто эффективное разделение (например, для героина и скополамина), равно как и для таких соединений, как этилон и бутилон, которые даже с использованием ВЭЖХ-МС/МС можно отличить лишь по отношениям интенсивностей ионов-продуктов и времени удерживания (рисунки 44, 45).

Таблица 31 – Времена удерживания, ионы-прекурсоры и условия детектирования MRM-переходов для каждого компонента

| Соединение № | Название соединения | Время удерживания | Ион-прекурсор | Продукт-ионы (энергия соударения) |
|--------------|---------------------|-------------------|---------------|--|
| 1 | Пирацетам | 0.38 | 143 | 143 → 126 (10) 143 → 98 (15) |
| 2 | Морфин | 0.44 | 286 | 286 → 165 (35) 286 → 157 (35) 286 → 181 (35) 286 → 201 (35) 286 → 173 (35) 286 → 145 (35) |
| 3 | Гелиамин | 0.56 | 194 | 194 → 165 (20) 194 → 147 (20) 194 → 162 (20) 194 → 177 (20) 194 → 131 (20) |
| 4 | Кодеин | 0.75 | 300 | 300 → 199 (35) 300 → 165 (35) 300 → 155 (35) |

| | | | | |
|----|------------------|------|-----|--|
| | | | | 300 → 181 (35) 300 → 225 (35) |
| 5 | МРА | 0.76 | 156 | 156 → 125 (15) 156 → 91 (15) 156 → 58 (15) |
| 6 | Метилон | 0.85 | 208 | 208 → 190 (15) 208 → 160 (20) 208 → 132 (35) 208 → 117 (35) 208 → 91 (40) |
| 7 | Амфетамин | 0.93 | 136 | 136 → 119 (10) 136 → 91 (15) |
| 8 | Скополамин | 1.03 | 304 | 304 → 152 (15) 304 → 138 (35) 304 → 103 (35) 304 → 110 (35) 304 → 121 (35) |
| 9 | Этилон | 1.12 | 222 | 222 → 204 (15) 222 → 174 (15) 222 → 146 (35) 222 → 91 (35) 222 → 118 (35) |
| 10 | Моноац | 1.13 | 328 | 328 → 165 (30) 328 → 211 (30) 328 → 193 (30) 328 → 183 (30) 328 → 268 (30) |
| 11 | 4-фторамфетамин | 1.24 | 154 | 154 → 137 (10) 154 → 109 (15) |
| 12 | 4-метиламфетамин | 1.46 | 150 | 150 → 65 (40) 150 → 91 (15) |
| 13 | РММА | 1.46 | 180 | 180 → 149 (10) 180 → 121 (20) 180 → 91 (35) 180 → 77 (35) |
| 14 | АМТ | 1.51 | 175 | 175 → 158 (10) 175 → 143 (35) 175 → 130 (35) 175 → 115 (35) 175 → 90 (35) |

| | | | | |
|----|----------------|------|-----|--|
| 15 | Бутилон | 1.51 | 222 | 222 → 204 (15) 222 → 191 (15) 222 → 174 (20) 222 → 146 (25) |
| 16 | Мефедрон | 1.63 | 178 | 178 → 145 (20) 178 → 91 (35) |
| 17 | Атропин | 2.07 | 290 | 290 → 124 (35) 290 → 93 (35) 290 → 77 (35) 290 → 142 (35) |
| 18 | 4-МЕС | 2.21 | 192 | 192 → 174 (15) 192 → 145 (20) 192 → 159 (20) 192 → 131 (25) 192 → 119 (25) 192 → 91 (25) |
| 19 | МДРВР | 2.32 | 262 | 262 → 191 (20) 262 → 161 (25) 262 → 112 (35) 262 → 149 (35) 262 → 105 (35) 262 → 135 (35) |
| 20 | Бензилацетамид | 2.56 | 150 | 150 → 91 (35) 150 → 65 (40) |
| 21 | Пентедрон | 2.69 | 192 | 192 → 174 (15) 192 → 161 (15) 192 → 132 (20) 192 → 91 (35) 192 → 144 (35) 192 → 117 (35) |
| 22 | МРРР | 2.78 | 218 | 218 → 147 (20) 218 → 119 (20) 218 → 98 (20) |
| 23 | СРР | 3.26 | 197 | 197 → 154 (20) 197 → 118 (35) |
| 24 | Пентилон | 3.34 | 236 | 236 → 218 (15) 236 → 188 (20) 236 → 175 (20) 236 → 131 (35) 236 → 159 (35) 236 → 121 (35) |

| | | | | |
|----|-----------|------|-----|---|
| 25 | МХЕ | 3.37 | 248 | 248 → 203 (15) 248 → 175 (20) 248 → 121 (25) 248 → 91 (40) |
| 26 | α-PVP | 3.55 | 232 | 232 → 91 (35) 232 → 126 (35) 232 → 77 (35) 232 → 105 (35) |
| 27 | Тебаин | 3.61 | 312 | 312 → 58 (40) 312 → 236 (40) 312 → 178 (40) 312 → 189 (40) 312 → 251 (40) 312 → 206 (40) 312 → 152 (40) |
| 28 | Героин | 3.69 | 370 | 370 → 328 (35) 370 → 268 (35) 370 → 211 (35) 370 → 193 (35) 370 → 165 (35) |
| 29 | 2С-В | 3.70 | 260 | 260 → 243 (10) 260 → 228 (25) 260 → 213 (35) 260 → 106 (35) 260 → 91 (35) |
| 30 | Кокаин | 3.72 | 304 | 304 → 182 (20) 304 → 82 (35) 304 → 105 (35) 304 → 119 (35) 304 → 150 (35) 304 → 77 (35) |
| 31 | MDPV | 3.72 | 276 | 276 → 205 (20) 276 → 175 (25) 276 → 135 (25) 276 → 126 (25) 276 → 149 (25) |
| 32 | βк-MDBZA | 3.90 | 284 | 284 → 266 (15) 284 → 236 (15) 284 → 91 (25) |
| 33 | Папаверин | 3.95 | 340 | 340 → 324 (35) 340 → 202 (35) |

| | | | | |
|----|-----------|------|-----|---|
| | | | | 340 → 171 (35) 340 → 308 (40) 340 → 280 (40) |
| 34 | Димедрол | 4.23 | 256 | 256 → 165 (40) 256 → 152 (40) |
| 35 | Бензокаин | 4.31 | 166 | 166 → 138 (15) 166 → 120 (20) 166 → 94 (20) 166 → 77 (20) |
| 36 | Нафирон | 4.33 | 282 | 282 → 211 (20) 282 → 141 (35) 282 → 127 (40) 282 → 155 (40) |
| 37 | АМ-1220 | 4.48 | 383 | 383 → 286 (20) 383 → 98 (35) 383 → 112 (35) 383 → 155 (35) 383 → 127 (35) |
| 38 | Апрофен | 4.49 | 326 | 326 → 253 (20) 326 → 100 (20) 326 → 181 (35) 326 → 103 (35) |
| 39 | Метадон | 4.50 | 310 | 310 → 265 (15) 310 → 105 (35) 310 → 204 (35) 310 → 91 (40) 310 → 117 (40) |
| 40 | АМ-694 | 5.67 | 436 | 436 → 309 (20) 436 → 231 (35) 436 → 203 (45) 436 → 76 (55) |
| 41 | АМ-2201 | 5.81 | 360 | 360 → 155 (35) 360 → 127 (35) 360 → 144 (35) 360 → 232 (35) |
| 42 | NNEI | 5.87 | 357 | 357 → 214 (25) 357 → 144 (55) 357 → 89 (55) |
| 43 | PB-22 | 5.91 | 359 | 359 → 214 (15) 359 → 144 (35) |

| | | | | |
|----|-----------|------|-----|--|
| | | | | 359 → 116 (55) 359 → 89 (55) |
| 44 | JWH-250 | 5.94 | 336 | 336 → 121 (20) 336 → 91 (35) 336 → 130 (35) 336 → 144 (35) |
| 45 | JWH-251 | 6.05 | 320 | 320 → 214 (35) 320 → 144 (35) 320 → 105 (35) |
| 46 | JWH-203 | 6.05 | 340 | 340 → 188 (20) 340 → 214 (20) 340 → 125 (35) |
| 47 | JWH-018 | 6.05 | 342 | 342 → 127 (35) 342 → 155 (35) 342 → 144 (35) 342 → 214 (35) |
| 48 | 5-F-AKB48 | 6.21 | 384 | 384 → 135 (25) 384 → 107 (40) 384 → 93 (40) |
| 49 | JWH-122 | 6.24 | 356 | 356 → 214 (25) 356 → 169 (35) 356 → 141 (35) 356 → 144 (35) 356 → 115 (55) |
| 50 | UR-144 | 6.31 | 312 | 312 → 125 (25) 312 → 144 (35) 312 → 214 (35) |
| 51 | JWH-210 | 6.35 | 370 | 370 → 183 (35) 370 → 214 (25) 370 → 155 (35) 370 → 144 (35) 370 → 115 (55) 370 → 128 (55) |
| 52 | AKB48 | 6.56 | 366 | 366 → 135 (35) 366 → 107 (40) 366 → 93 (40) |

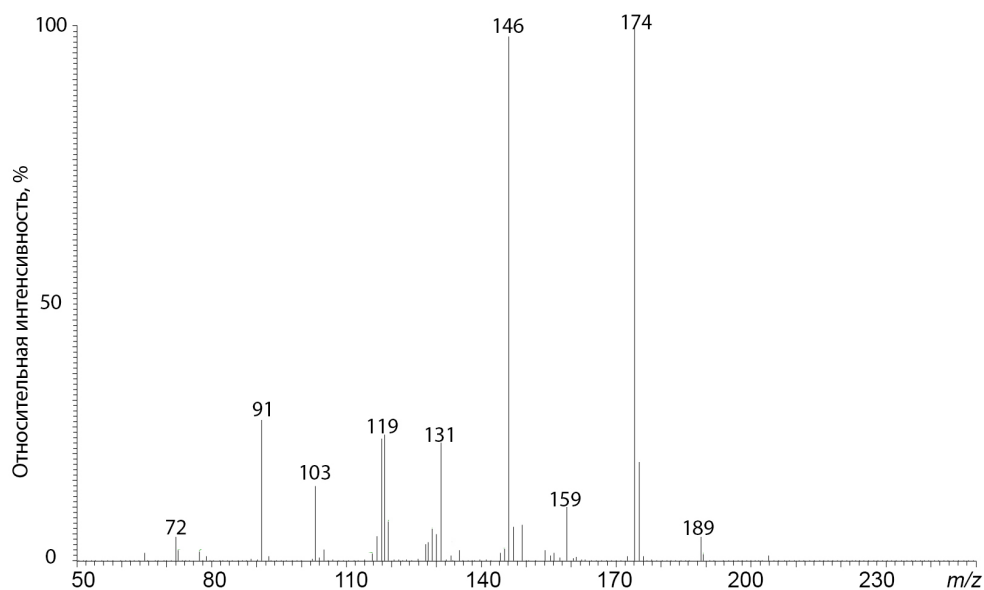


Рисунок 44 – ЭРИ-МС/МС-спектр этилона (энергия соударений 25 эВ)

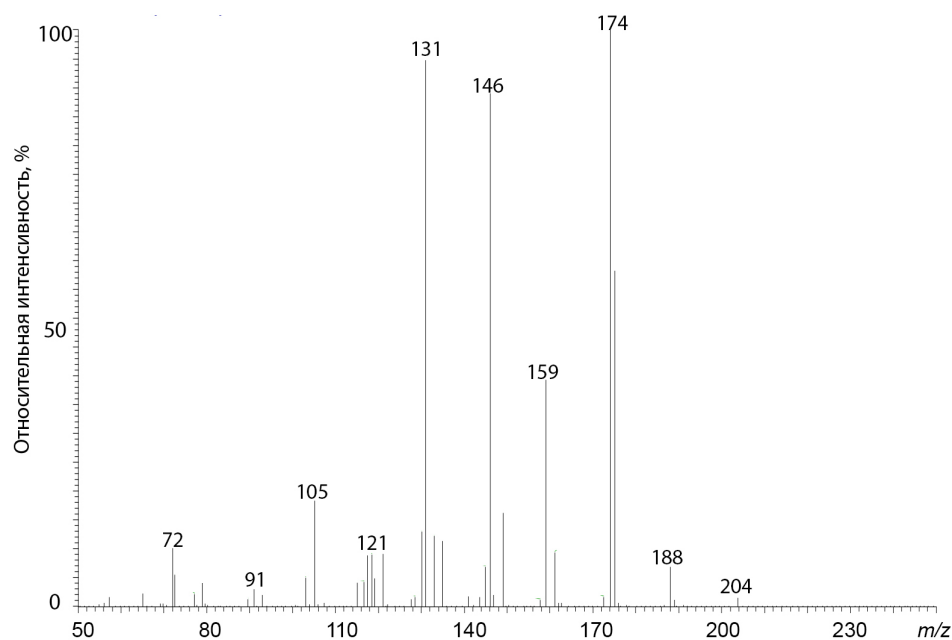


Рисунок 45 – ЭРИ-МС/МС-спектр бутилона (энергия соударений 25 эВ)

Для всех соединений были установлены минимум 2 MRM перехода, что в совокупности со временем удерживания, а также результатами, полученными с использованием ГХ-МС, что позволило достаточно надежно провести их идентификацию. Отдельно стоит отметить необходимость использования ГХ-МС для соединений, элюирующихся рядом с мертвым временем.

Анализ реальных образцов. Для оценки адекватности предложенной схемы определения проводили анализ 23 реальных образцов курительных

смесей, «солей для ванн» и «удобрений». Результаты исследований приведены в таблице 32.

Как видно из таблицы 32, в большинстве курительных смесей присутствует JWH-018, запрещенный к обороту на территории многих стран. Интересен также факт наличия в ряде случаев в составах курительных смесей нескольких соединений, что, вероятно, связано с их новизной. В других образцах курительных смесей в основном регистрируется только 1 действующий агент, а в некоторых случаях встречались «пустышки» – образцы, не содержащие действующих агентов. Наличие токоферола (витамина Е) во многих курительных смесях говорит о том, что в качестве растительной матрицы были использованы лекарственные растения.

Таблица 32 – Результаты анализа реальных образцов курительных смесей и «солей для ванн», конфискованных в ходе оперативных действий

| Название | JWH-018 | JWH-250 | JWH-203 | AKB48 | AM-694 | NNEI | PB-22 | Мефедрон | MDPV | Героин | α-PVP | Гелиамин | Другие соединения |
|--------------|---------|---------|---------|-------|--------|------|-------|----------|------|--------|-------|----------|---|
| Turbo | × | | | | | | | | | | | | – |
| 888 | | | | × | | | | | | | | | THC, CDB, CBN |
| Box-up | × | | | | | | | | | | | | α-токоферол |
| z-03 | | | × | | | | | | | | | | α-токоферол JWH-073 (следовые количества) |
| JahRiigh | | × | × | | | | | | | | | | – |
| Eclipse sun | × | | | | | | | | | | | | – |
| Eclipse moon | × | | | | | | | | | | | | – |
| GOAmoon | × | | | | | | | | | | | | – |
| Hydro zero | × | | | | | | | | | | | | – |
| Hydro fire | × | | | | | | | | | | | | – |
| Shirsh | | × | | | | | | | | | | | α-токоферол |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|--|--|---|---|
| Power | × | | | | | | | | | | | | | – |
| Zeus | | | | | | | | × | | | | | | – |
| Урожай | | | | | | | | | × | | | | × | – |
| Ручеек | | | | | | | | | | | | | × | – |
| Агро | | | | | | | | | × | | | | | – |
| Неизвестный-1 | | × | | × | | × | | | | | | | | – |
| Неизвестный-2 | | | | | × | | × | | | | | | | α-токоферол |
| Неизвестный-3 | | × | | | | | | | | | | | | – |
| Неизвестный-4 | | | | | | | | | | | | | × | α- токоферол |
| Неизвестный-5 | | | | | | | × | | | | | | | – |
| Неизвестный-6 | | | | | | | | | | | | | | α- токоферол |
| Неизвестный-7 | | | | | | | | | | × | | | | Моноацетил- морфин, кофеин, димедрол |

Несколько иная ситуация с порошками, большинство из которых представляют собой индивидуальные вещества, содержащие примеси, которые, вероятно, являются сырьевыми продуктами для синтеза данного соединения. При анализе образца, оказавшегося героином, среди сопутствующих ему соединений обнаружены кофеин и димедрол, которые, вероятно, добавлялись для увеличения массы.

Предложенная методика используется в целях проведения экспертиз в Главном управлении МВД России по Краснодарскому краю и бюро судебно-медицинской экспертизы г. Краснодара (приложение 2, приложение 3).

2.6 Определение запрещенных соединений в продуктах питания, БАД и спортивном питании

Биологически активные добавки и вспомогательные продукты спортивного питания – известный и популярный способ ускорения восстановления спортсмена между тренировками. Но, ввиду отсутствия контроля их качества, существует опасность употребления загрязненных запрещенными веществами продуктов. Во избежание этого необходимо проведение превентивного контроля качества, направленного не только на соответствие требованиям пищевой безопасности, но и определению запрещенных ВАДА веществ и их метаболитов. Для проведения анализа использовали систему сверхпроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, состоящую из тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Thermo TSQ Access Max («Thermo Scientific», США) с источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate-3000 («Thermo Scientific», США), состоящего из дегазатора, бинарного градиентного насоса, автосамплера, термостата и диодно-матричного детектора. Газохроматографическое определение с масс-спектрометрическим детектированием осуществляли с использованием комплекса, состоящего из газового хроматографа Thermo Trace-1310 («Thermo Scientific», США) и тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Thermo TSQ Quantum XLS («Thermo Scientific», США) с источником электронной ионизации. Управление и обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Thermo Xcalibur 2.2 [601].

Идентификация соединений проводилась с использованием СВЭЖХ-системы Agilent 1260 («Agilent Technologies», США), соединенной с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения Agilent 6540 UHD («Agilent Technologies», США) с источником

электрораспылительной ионизации. Хроматографическое разделение веществ методом СВЭЖХ проводили на аналитической колонке Phenomenex Kinetex C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм), а методом ГХ – на Phenomenex Zebron ZB-1MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), соответственно. Условия разделения и детектирования представлены в таблица 33–36.

Таблица 33 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% р-р муравьиной кислоты в воде), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|---|-------------------------|
| 0 | 10 | 90 | 0.6 |
| 2.5 | 20 | 80 | |
| 3.5 | 30 | 70 | |
| 4 | 50 | 50 | |
| 5 | 90 | 10 | |
| 7.5 | 90 | 10 | |
| 7.8 | 10 | 90 | |
| 9 | 10 | 90 | |

Таблица 34 – Условия детектирования соединений с использованием метода СВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС

| Thermo TSQ Quantum Access Max | |
|--|---------------|
| Параметр | Значение |
| Температура испарителя, °С | 400 |
| Температура трансферного капилляра, °С | 300 |
| Напряжение на источнике ионизации, В | 4000 |
| Режим регистрации ионов | Положительные |
| Расход газа-распылителя, АУ* | 60 |
| Расход вспомогательного газа, АУ | 15 |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона), мТорр | 1.5 |
| Agilent 6540 UHD | |
| Температура испарителя, °С | 350 |
| Напряжение на скиммере, В | 65 |
| Напряжение на фрагментаторе, В | 100 |
| Напряжение на источнике ионизации, В | 3500 |
| Режим регистрации ионов | Положительные |
| Расход газа-распылителя, л/мин | 8 |
| Расход вспомогательного газа, л/мин | 8 |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (азота), мТорр | 1.5 |

*АУ – arbitrary units

Таблица 35 – Температурная программа при проведении газохроматографического определения анализируемых соединений

| Время, мин | T, °C | Скорость потока газа-носителя, мл/мин |
|------------|-------|---------------------------------------|
| 0 | 60 | 0.8 |
| 3 | 60 | |
| 12 | 150 | |
| 20 | 270 | |
| 30 | 270 | |

Таблица 36 – Условия детектирования веществ с использованием метода ГХ-МС/МС

| Параметр | Значение |
|-------------------------------------|----------|
| Температура источника ионизации, °C | 220 |
| Температура трансферной линии, °C | 270 |
| Температура инжектора, °C | 270 |
| Объем вводимой пробы, мкл | 1 |
| Деление потоком | 1:10 |
| Газ-носитель | гелий |

Образцы пептидов, SARM и спортивного питания приобретали в период с 2014 по 2016 гг. в различных интернет-магазинах для обеспечения более представительной выборки исследуемых образцов. Широкое разнообразие продуктов спортивного питания и их достаточно быстрая ротация на рынке обусловили необходимость ограничить перечень исследуемых продуктов наиболее популярными на момент исследования наименованиями. В ходе проведения контрольных закупок было замечено, что в разных магазинах AICAR и кардарин (GW1516), являющиеся агонистами дельта-рецепторов активации пролиферации пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR δ), реализовывали и как пептиды, и как SARM, хотя ни структурно, ни по своему воздействию они не могут быть отнесены к этим классам соединений [606].

Подготовка проб к анализу для СВЭЖХ заключалась в растворении навески исследуемого образца в 0.1% растворе муравьиной кислоты в воде

(для пептидов) или метаноле, с получением раствора с массовой концентрацией 100 нг/мл. Образцы SARM растворяли в смеси вода:ацетонитрил 50:50 (v:v). Для проведения газохроматографического анализа пробы жиросжигателей, в состав которых входило растительное сырье, нагревали в воде при 45°C в течение 30 мин с добавлением аммиака до pH 9, после чего проводили жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ) диэтиловым эфиром. Полученный экстракт анализировали в выше приведенных условиях.

Подтверждение полученных результатов проводили с использованием метода СВЭЖХ-МС/МС с применением аналогичной пробоподготовки за исключением стадии реэкстракции. Результаты исследования представлены в таблица 37.

Таблица 37 – Результаты исследования жиросжигателей, предтренировочных комплексов и прогормонов

| Название | Обнаруженное вещество | | | | | | |
|------------------------|-----------------------|--------------|--------|-----------|---------------|-----------------|------------------------------|
| | Эфедрин | Метилэфедрин | Кофеин | Теобромин | Фенилэтиламин | Фенилпропиламин | Дегидроэпиандростерон (ДГЭА) |
| APS Phenadrine | - | - | + | - | + | + | - |
| Methyldrene 25 Elite | + | + | + | + | - | - | - |
| Hellfire | + | + | + | + | - | - | - |
| APS Mesomorph | - | - | + | + | - | - | - |
| San Fierce Domination | - | - | + | + | - | - | - |
| Weider Super Nova caps | - | - | + | + | - | - | - |
| MHP Cyclin | - | - | + | - | - | - | - |
| Anavar | - | - | - | - | - | - | + |
| Chosen 1 | - | - | - | - | - | - | + |

Несмотря на то, что продукты Anavar и Chosen 1 были заявлены как смесь эфиров ДГЭА, в их составе был обнаружен только дегидроэпиандростерон. Как видно из представленных данных, в состав большинства жиросжигателей и предтренировочных комплексов входят два алкалоида пуринового ряда: кофеин и тебаин, обуславливающие стимулирующий эффект. В то же

время, в ряде жиросжигателей содержатся эфедрин и метилсинефрин, входящие в перечень запрещенных препаратов. Основная сложность определения эфедрина с использованием метода газовой хроматографии заключается в том, что он имеет идентичные параметры удерживания и масс-спектр с псевдоэфедрином, поэтому его идентификация проводилась с использованием подтверждающего метода – СВЭЖХ-МС/МС, позволяющего эффективно разделить эфедрин и псевдоэфедрин. Стоит отметить, что ни в одном продукте напрямую не заявлялось наличие эфедрина, указывался «экстракт эфедры» во избежание трудностей в ходе декларирования и ввоза продукции на территорию ряда стран.

Следующим этапом стала идентификация соединений, продающихся под видом SARM и пептидного допинга. Для этого первичные исследования проводили с использованием СВЭЖХ-МС/МС низкого разрешения и последующим подтверждением результата с использованием МСВР. Результаты исследования SARM и агонистов PPAR δ (AICAR и GW1516) приведены в таблице 38. Для расчета точности определения масс во внимание принимались возможность образования аддуктов и фрагментация исследуемых веществ на источнике, поэтому в таблице 38 приведены теоретические моноизотопные массы, после чего рассчитывались теоретические массы ионов и сопоставлялись с зарегистрированными значениями m/z . Стоит отметить, что применение ГХ-МС в качестве подтверждающего метода не представлялось возможным – данные соединения, за исключением ТМС-производного AICAR, обладают низкой летучестью и являются термически нестабильными.

Таблица 38 – Результаты исследований некоторых SARM и агонистов PPAR δ

| Заявленное вещество | Элементная композиция | Теоретическая моноизотопная масса, Да | Детектируемое значение m/z | Детектируемый ион | Точность определения массы, Δppm |
|------------------------|---|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--|
| Andarine (S-4) | C ₁₉ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₆ | 441.1148 | 442.1201 | [M+H] ⁺ | 4.5 |
| Ostarine (МК-2866) | C ₁₉ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₃ | 389.0987 | 390.1049 | [M+H] ⁺ | 2.8 |
| Cardarine (GW1516) | C ₂₁ H ₁₈ F ₃ NO ₃ S ₂ | 453.0680 | 454.0733 | [M+H] ⁺ | 4.4 |
| Ligandrol (LGD-4033) | C ₁₄ H ₁₂ F ₆ N ₂ O | 338.0854 | 339.0918 | [M+H] ⁺ | 2.7 |
| Laxogenin | C ₂₇ H ₄₂ O ₄ | 430.3083 | 445.2948 | – | – |
| Radarine (RAD140) | C ₂₀ H ₁₆ ClN ₅ O ₂ | 393.0993 | 394.1052 | [M+H] ⁺ | 3.6 |
| AICAR (A9788) | C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₈ P | 258.0964 | 259.1034 | [M+H] ⁺ | 1.2 |
| Reverol (SR9009) | C ₂₀ H ₂₄ ClN ₃ O ₄ S | 437.1176 | 438.1226 | [M+H] ⁺ | 5.2 |
| Miostop (YK-11) | C ₂₅ H ₃₄ O ₆ | 430.2355 | 399.2154 | [M-OCH ₃] ⁺ | 4.3 |
| Ibutamoren (МК-677) | C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₅ S | 528.2406 | 529.2462 | [M+H] ⁺ | 3.2 |
| Sarmastol (AC-262,356) | C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O | 278.1419 | 279.1496 | [M+H] ⁺ | -1.4 |

Из представленных данных видно, что в случае лаксогенина заявленное и обнаруженное вещество отличаются. Вероятно, в данном случае в качестве действующего вещества использовали 20-гидроксиэкдизон (**20E**), также применявшийся ранее в профессиональном спорте. При его ионизации происходит элиминирование двух гидроксильных групп из положений 1 и 2

(рисунок 46), при этом отщепление второй группы происходит с захватом протона и образованием кратной связи. В этом случае моноизотопная масса иона составляет 445.2949 Да, что хорошо согласуется с полученными данными.

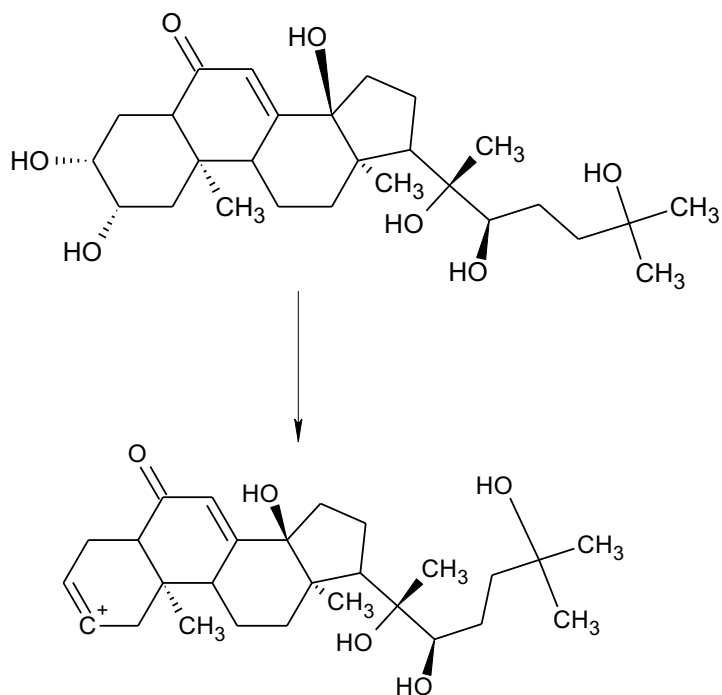
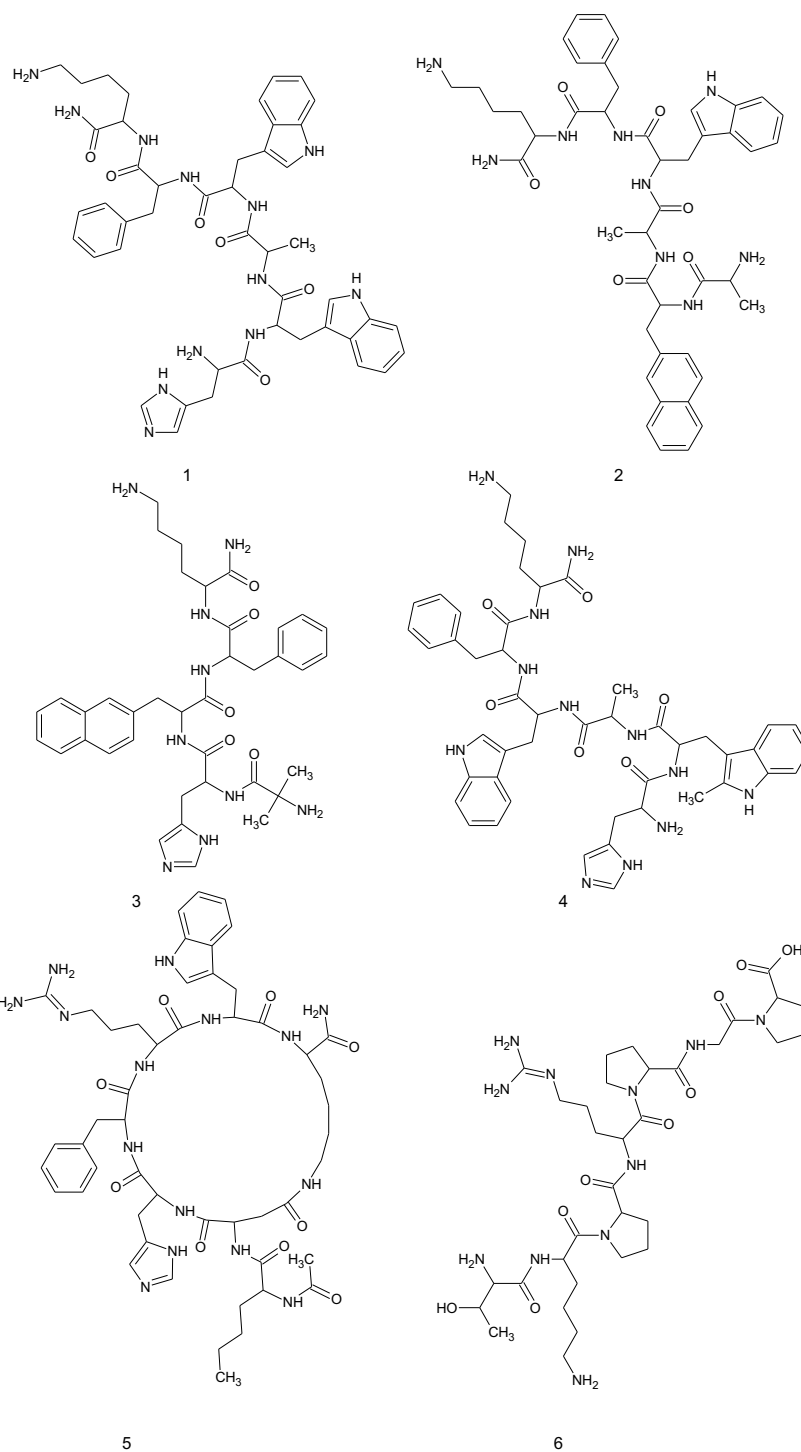


Рисунок 46 – Фрагментация 20-гидроксиэкдизона на источнике ЭРИ

При проведении анализа соединений пептидной природы (рисунок 47) ситуация осложняется также тем, что для них критичным является температурный режим хранения и транспортировки, который практически никогда не соблюдается при покупке в интернет-магазинах.



1 – GHRP-6, 2 – GHRP-2, 3 – ипаморелин, 4 – гексарелин, 5 – меланотан–2,
6 – селанк

Рисунок 47 – Структурные формулы некоторых пептидов

Как и в случае с другими рассматриваемыми продуктами, исследуемые пептиды имеют различные механизмы воздействия на организм. В первом случае, достаточно грубом приближении их можно разделить на несколько групп:

1) фрагмент гормона роста, обладающий липолитическим эффектом; 2) рилизинг-пептиды гормона роста, стимулирующие его выработку; 3) пептиды, способствующие восстановлению организма (например, в случае пептида MGF, это происходит за счет активации мышечных стволовых клеток-сателлитов).

Результаты исследования пептидов приведены в таблица 39.

Таблица 39 – Результаты исследований некоторых пептидов

| Заявленное вещество | Структурная формула | Теоретическая молекулярная масса, Да | Детектируемое значение m/z | Детектируемый ион | Точность определения массы, Δppm |
|---------------------|---|--------------------------------------|------------------------------|----------------------|--|
| Iramorelin | Aib-His-(D- β -Nal)-(D-Phe)-Lys-NH ₂ | 711.3850 | 356.7006 | [M+2H] ²⁺ | -2.2 |
| Hexarelin | H-His-D-Trp(2-Me)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂ | 886.4602 | 444.2369 | [M+2H] ²⁺ | 1.1 |
| Selank | H-Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro-OH | 751.4341 | 376.7239 | [M+2H] ²⁺ | 1.2 |
| DSIP | L-Trp-L-Ala-Gly-Gly-L-a-Asp-L-Ala-L-Ser-Gly-L-Glu-OH | 848.3301 | 425.1706 | [M+2H] ²⁺ | 4.1 |
| MGF | YQPPSTNKNTKSQ RRKGSTFEERK | 2866.4786 | 478.7564 | [M+6H] ⁶⁺ | -5.6 |
| MGF-PEG | YQPPSTNKNTKSQ RRKGSTFEERK- PEG | 2866.4786+ PEG | 478.7561 | – | – |
| CJC-1295 | YADAIFTQSYRKVL AQLSARKLLQDILS R-NH ₂ | 3367.9046 | 842.9753 | [M+4H] ⁴⁺ | 9.7 |

| | | | | | |
|---------------------|--|------------------|-----------------|----------------------|-----|
| Melanotan 2 | Ac-Nle-c[Asp-His- DPhe-Arg-Trp-Lys]- NH ₂ | 1023.5403 | 512.7763 | [M+2H] ²⁺ | 2.3 |
| TB-500 | (Acetyl)Leu-Lys-Lys- Thr-Glu-Thr-Gln | 4921.4158 | 828.2583 | – | – |
| PT-141 | Ac-Nle-cyclo(Asp- His-D-Phe-Arg-Trp- Lys-OH) | 1024.5243 | 513.2684 | [M+2H] ²⁺ | 2.1 |
| Long-R3- IGF-1 | MFPAMPLSSLFVN GPRTL- CGAELVDALQFVC GDRGFYFNKPTGY GSSSRRAPQTGIVD ECCFRSCDLRRLE MYCAPLKPAKSA | 9111.4531 | – | – | – |
| HGH frag 176-191 | YLRIVQCRSVEGSC GF | 1815.8760 | 908.9431 | [M+2H] ²⁺ | 2.4 |
| GHRP-2 | Ala-beta-Nal-Ala-Trp- Phe-Lys-NH ₂ | 817.4275 | 409.7207 | [M+2H] ²⁺ | 0.9 |
| GHRP-6 | His-Trp-Ala-Trp-Phe- Lys-NH ₂ | 872.4446 | 437.2293 | [M+2H] ²⁺ | 0.7 |

Анализируя полученные результаты, можно сделать следующие выводы: в ряде случаев заявленное вещество либо отсутствует (Long-R3-IGF-1), либо не соответствует заявленному (MGF-PEG). Также из представленных данных видно, что образец пептида TB-500 на самом деле представляет собой фрагмент белка тимазин бета-4, ацилированного по N-концу полипептидной цепи.

Поскольку помимо масс-спектрометрического детектора в ходе проведения исследований нами использовался и диодно-матричный детектор, представлялось интересным оценить чистоту препаратов по наличию пиков примесных компонентов. В состав готовой к употреблению формы SARM

входили, как правило, стеарат магния и тальк, а в ряде препаратов пептидной природы наблюдались достаточно интенсивные пики других сторонних агентов, видимые при использовании УФ/вид-детектирования и отсутствующие на хроматограммах по полному ионному току при использовании МСД, что заставляет усомниться в заявляемой 98% чистоте препарата.

2.7 Определение мелдония в молоке и мясе

Как и в случае со спортивным питанием, в большинстве случаев продукты питания контролируются исключительно на предмет соответствия критериям пищевой безопасности, а возможность присутствия и применения вспомогательных ветеринарных препаратов, не подлежащих обязательному контролю, не нормируется. К таковым относится и мелдоний, внесенный в перечень запрещенных ВАДА соединений, как модулятор метаболизма. Он может входить в состав некоторых ветеринарных препаратов, таких, как «Эмидонол», используемых при скученном содержании птицы и домашнего скота, что делает актуальным его определение в продуктах питания [602].

В целях предотвращения потерь аналита в ходе пробоподготовки молока использовали процедуру «разбавил и вколол». Для этого 200 мкл молока разбавляли 800 мкл ацетонитрила в эппендорфе объемом 1.5 мл, после чего перемешивали 1 мин с использованием лабораторного миксера (Vortex) и центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин. 300 мкл полученного супернатанта переносили в стеклянные вials с понижающими объем стеклянными вставками.

В ходе пробоподготовки образцов мяса и печени, 1 г исследуемого образца гомогенизировали с кварцевым песком и экстрагировали 5 мл смеси, состоящей из воды и ацетонитрила (10:90, v:v), после чего перемешивали 2 мин с помощью лабораторного миксера и центрифугировали 1 мл полученного экстракта при 10000 об./мин с последующим переносом 300 мкл супернатанта в стеклянную вial со стеклянной вставкой.

Разделение осуществляли с использованием подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила (подвижная фаза А) и 10 мМ раствора ацетата аммония в воде (подвижная фаза В) в режиме градиентного элюирования. Общее время анализа с учетом уравнивания колонки после разделения

составило 15 мин (таблица 40). Скорость потока подвижной фазы – 0.35 мл/мин, температура термостата колонок – 30 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Таблица 40 – Условия градиентного элюирования (скорость потока подвижной фазы – 0.35 мл/мин)

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (10 мМ водный раствор ацетата аммония), % |
|------------|--------------------|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 83 | 17 |
| 4 | 62 | 38 |
| 6 | 42 | 58 |
| 8 | 35 | 65 |
| 10 | 35 | 65 |
| 12 | 35 | 65 |
| 14 | 35 | 65 |
| 16 | 95 | 5 |

Ионизация аналита и внутреннего стандарта (габапентина) осуществлялась с использованием источника электрораспылительной ионизации с последующей регистрацией положительных ионов. Условия детектирования приведены в таблица 41. Азот для источника ионизации и ячейки соударений был получен с использованием генератора азота Peak NM32LA (Peak Scientific, Великобритания).

Таблица 41 – Условия масс-спектрометрического детектирования

| Параметр | Значение |
|--|----------|
| Температура ионного источника, °С | 250 |
| Напряжение на капилляре, В | 4000 |
| Напряжение на экстрагирующей линзе, В | 500 |
| Давление газа-распылителя (азот), кПа | 100 |
| Расход газа-осушителя, л/мин | 5 |
| Скорость сканирования, Гц | 3 |
| Диапазон сканируемых масс, Да | 50–600 |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (азот), мТорр | 1.5 |

Несмотря на то, что мельдоний имеет небольшую молекулярную массу (менее 150 Да), использованный диапазон сканируемых масс был выбран существенно шире, поскольку условия съемки и условия калибровки масс-спектрометра должны быть идентичны. Поскольку в качестве калибранта для масс-спектрометра используется формиат натрия, способный давать аддукты в широком диапазоне масс, увеличение числа захватываемых для калибровки аддуктов, позволит точнее описывать рабочую шкалу масс без потери чувствительности и искусственной дискриминации масс. Ввиду склонности аналитов к образованию интенсивных протонированных молекулярных ионов ($[M+H]^+$), использовали режим регистрации положительных ионов. Теоретические и наблюдаемые массы представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Времена удерживания, наблюдаемые и теоретические массы аналитов, ошибка определения масс

| Вещество | Время удерживания, мин | $[M+H]^+$, теор. | $[M+H]^+$, практ. | Ошибка определения масс (MS), ppm | Продукт-ион (практ.), m/z |
|------------|------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Мельдоний | 7.75 | 147.1128 | 147.1126 | -0.8 | 58.0652 |
| Габапентин | 5.16 | 172.1332 | 172.1331 | 0.6 | 137.0960 |
| | | | | | 95.0855 |
| | | | | | 67.0543 |

Построение калибровочных кривых осуществляли путем анализа образцов молока, мяса и печени с известным внесенным содержанием мельдония в шести повторностях с разными концентрациями аналита – 10, 12.5, 25, 50, 100, 125 и 250 нг/мл для молока и 25, 50, 100, 125, 250, 500 нг/мл для мяса и печени. Концентрация внутреннего стандарта - габапентина при проведении исследований была постоянна и составляла 50 нг/мл. Выбор внутреннего стандарта обусловлен его высокой полярностью, малой молекулярной массой и неприменимостью в ветеринарии. В результате проведенных исследований были построены калибровочные кривые для молока и мяса в указанных ранее

диапазонах с удовлетворительным коэффициентом детерминации (R^2), равным 0.997 и 0.988 соответственно.

Изучение *селективности* проводилось с использованием различных холостых образцов коровьего молока и куриного мяса, печени, подвергавшихся описанной ранее пробоподготовке. Было установлено, что пики, соответствующие аналиту или внутреннему стандарту, отсутствуют.

Пределом детектирования (LOD) являлась концентрация аналита, при которой соотношение сигнал:шум было не менее 3:1. Данное требование выполнялось при концентрации мельдония на уровне 5 нг/мл в молоке и 12.5 нг/мл в мясе.

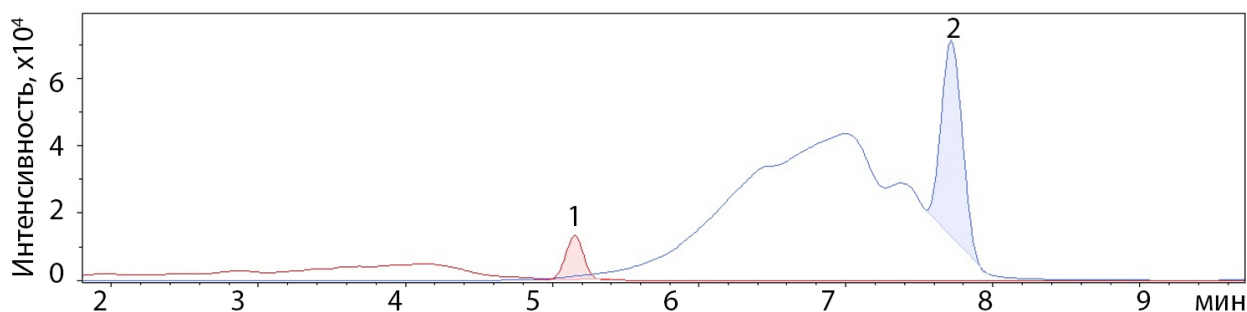
Нижний предел количественного определения (LLOQ). Данная величина характеризуется возможностью проведения количественного анализа с ошибкой определения, не превышающей 20%. При проведении данных исследований она составила 10 нг/мл для молока и 25 нг/мл для мяса соответственно.

Оценку точности и относительного стандартного отклонения (**ОСКО**) результатов анализа проводили с использованием растворов контроля качества, приготовленных для трех уровней концентраций – низкого, среднего и высокого.

Точность рассчитывалась по следующей формуле:

$$\text{Точность, \%} = (C_{\text{эсп}} - C_{\text{теор}}) / C_{\text{теор}} \times 100\%$$

Хроматограмма образца молока с внесенным раствором контроля качества на уровне низких концентраций аналита представлена на рисунок 48.



1 – габапентин (внутренний стандарт), 2 – мельдоний

Рисунок 48 – Хроматограмма образца молока с внесенным в него на уровне низких концентраций мельдония:

Результаты валидации процедуры определения мельдония представлены в таблице 43. В соответствии с критериями FDA, точность проводимого анализа должна находиться в пределах $\pm 15\%$ от номинальной концентрации аналита при проведении анализа растворов контроля качества на уровне низких, средних и высоких концентраций.

Таблица 43 – Валидация процедуры определения мельдония (n=6)

| Объект исследования | Концентрация РКК, нг/мл | В один день | | В разные дни | | Матричные эффекты, % |
|---------------------|-------------------------|-------------|---------|--------------|---------|----------------------|
| | | Точность, % | ОСКО, % | Точность, % | ОСКО, % | |
| Молоко | 25 | -4.8 | 13.5 | -5.7 | 11.8 | 9.4 |
| | 100 | 3.4 | 9.2 | -2.1 | 10.4 | 6.2 |
| | 250 | 2.7 | 5.1 | 1.9 | 7.2 | 2.8 |
| Мясо/печень | 50 | -12.1 | 11.3 | -14.1 | 12.9 | 11.6 |
| | 100 | 6.2 | 9.5 | 10.5 | 11.2 | 7.4 |
| | 250 | 4.7 | 8.4 | 6.6 | 9.0 | 3.9 |

Матричные эффекты устанавливали путем сопоставления результатов, полученных в ходе анализа водных растворов мельдония и габапентина и образцов с добавками таких же концентраций аналита в холостую пробу.

Кратковременная стабильность образцов устанавливалась путем сопоставления результатов анализа объектов спустя 4, 8, 12 и 24 ч после подготовки проб и их хранения при 20 °С. Установлено, что пробы куриного мяса и печени пригодны к анализу не позднее, чем 4 ч после

пробоподготовки, а пробы молока – не позднее, чем 12 ч после пробоподготовки (в противном случае ошибка определения превышает 15%).

Стабильность при повторной заморозке образцов проводили в течение 2-х недель путем выполнения трех циклов заморозки (при -20 °С) и разморозки образцов молока и мяса с целью установления влияния данных процессов на содержание аналита. В ходе проведения эксперимента установили, что исследуемые объекты могут выдерживать только 2 цикла заморозки и разморозки. Для минимизации рисков возникновения ложноположительных результатов холостые пробы анализировали сразу после испытания образцов контроля качества с высокими содержаниями мельдония. Было установлено, что в предложенных условиях не возникает перекрестного загрязнения образцов.

Описанная выше методика была использована при анализе образцов молока, мяса и печени, приобретенных на фермерском рынке.

Результаты приведены в таблица 44 и таблица 45.

Таблица 44 – Результаты исследования образцов молока, мяса и печени (первая партия образцов)

| Образец | Концентрация мельдония в продукте, нг/мл | |
|---------|--|------------------------|
| | Сырое молоко | Пастеризованное молоко |
| Ф-1 | – | – |
| Ф-2 | – | – |
| Ф-3 | – | – |
| Ф-4 | – | – |
| Ф-5 | 650±61 | 343±45 |
| Ф-6 | – | – |
| Ф-7 | – | – |

Таблица 45 – Результаты исследования образцов молока (вторая партия образцов), куриного мяса (М-1–М-5), куриной печени (П-1–П-5), термически обработанной куриной печени (ПТ-1–ПТ-5)

| Шифр образца | Концентрация мельдония в молоке, нг/мл |
|--------------|--|
| 1 | менее предела определения |
| 2 | 370±34 |
| 3 | 511±47 |
| 3,5 | 530±49 |
| 4 | 567±52 |
| 4,5 | 592±55 |
| 5 | 640±60 |
| 6 | 693±62 |
| 7 | 715±65 |
| 8 | 340±44 |
| 9 | 180±24 |
| 10 | 60±8 |
| 11 | менее предела определения |
| 12 | менее предела определения |
| М-1 | менее предела определения |
| М-2 | 230±30 |
| М-3 | менее предела определения |
| М-4 | менее предела определения |
| М-5 | менее предела определения |
| П-1 | менее предела определения |
| П-2 | 920±86 |
| П-3 | менее предела определения |
| П-4 | менее предела определения |
| П-5 | менее предела определения |
| ПТ-1 | менее предела определения |
| ПТ-2 | 650±72 |
| ПТ-3 | менее предела определения |
| ПТ-4 | менее предела определения |
| ПТ-5 | менее предела определения |

Предложенная методика использовалась для проведения исследования в рамках урегулирования спора с РУСАДА в целях демонстрации возможности контаминации продуктов питания запрещенными веществами. Исследование выполнено в рамках обращения юридической группы «КлеверКонсалт» (Приложение 1)

2.8 Определение некоторых «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях

Злоупотребление фармацевтическими препаратами в немедицинских целях влечет за собой необходимость разработки и внедрения в токсикологическую практику ряда методик, направленных на оперативный контроль «аптечных наркотиков» в биологических жидкостях [603]. Ввиду отсутствия изотопно-меченных стандартов, являющихся идеальными внутренними стандартами, которые позволили бы учесть все матричные эффекты, в качестве внутреннего стандарта использовали аминифенилмасляную кислоту. Как показали исследования, даже в случае её употребления, она практически полностью метаболизирует в организме человека и позволяет избежать возможных наложений и искажений результатов анализа. В качестве внутреннего стандарта также изучали возможность применения инодометацина и катадолона, однако от их использования пришлось отказаться ввиду сильного подавления ионизации и, как следствие, получения нестабильных результатов.

Для разделения использована аналитическая колонка Phenomenex Kinetex C18 (100мм × 2.1мм, 1.7 мкм) с аналогичной предохранительной колонкой Phenomenex, разделение осуществляли при температуре термостата 45 °С. Особенностью данных колонок с поверхностно-пористым сорбентом является возможность работы в широком диапазоне рН, а также возможность их эксплуатации при достаточно высоких скоростях потока и низких, по сравнению с традиционными пористыми сорбентами, давлениях.

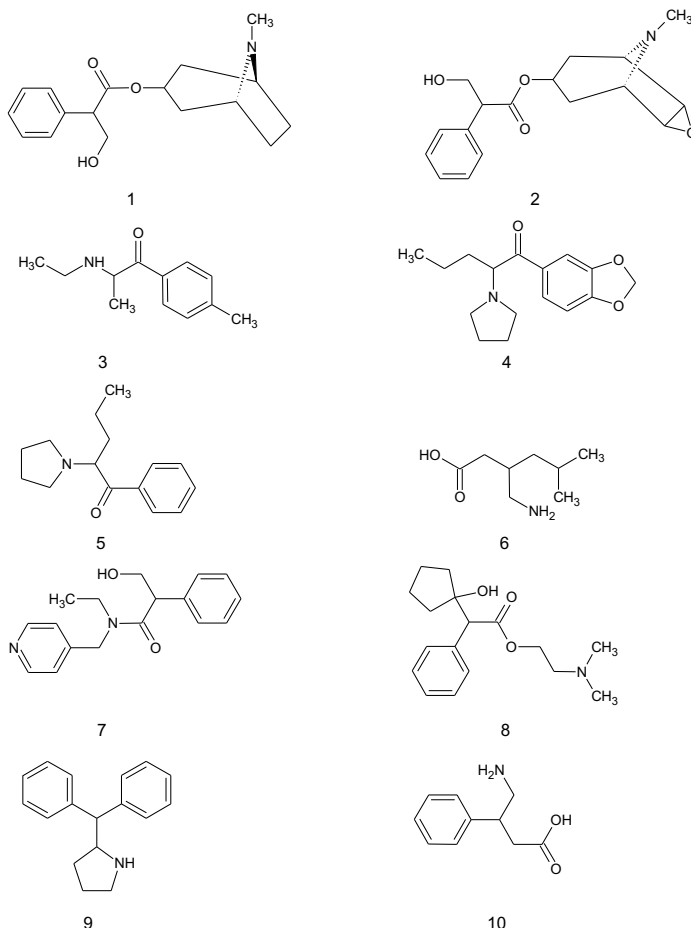
В качестве подвижной фазы изучали несколько систем: метанол:0.1% муравьиная кислота, метанол:ацетатный буфер (рН=3), ацетонитрил:ацетатный буфер (рН =3) и ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота. Лучшая эффективность разделения достигается при использовании системы ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота. При этом оптимальная скорость потока

составила 0.6 мл/мин при температуре термостата колонок 40 °С, что позволило добиться более узких пиков и, как следствие, более низких пределов детектирования и пределов обнаружения. Условия градиентного элюирования приведены в таблица 46. Объем вводимой пробы равен 5 мкл.

Таблица 46 – Условия градиентного элюирования некоторых «аптечных наркотиков»

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (0.1% р-р муравьиной кислоты), % | Скорость потока, мл/мин |
|------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 0 | 10 | 90 | 0.6 |
| 2.5 | 20 | 80 | |
| 3.5 | 30 | 70 | |
| 4 | 50 | 50 | |
| 5 | 90 | 10 | |
| 7.5 | 90 | 10 | |
| 7.8 | 10 | 90 | |
| 9 | 10 | 90 | |

В описанных выше условиях все определяемые соединения были разделены (рисунок 49).



1 – атропин; 2 – скополамин; 3 – 4-метилэтилкатинон; 4 – MDPV; 5 – α -PVP; 6 – прегабалин; 7 – тропикамид; 8 – циклопентанолат; 9 – дифенил-2-пирролидинилметан; 10 – фенибут

Рисунок 49 – Структурные формулы аналитов

Исследования проводили с использованием источников электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении (ХИАД). В ходе оптимизации условий анализа было установлено, что чувствительность определений для большинства веществ с использованием источника ХИАД недостаточна, что послужило причиной выбора нагреваемого источника электрораспылительной ионизации (HESI) в ходе разработки методики. Условия детектирования приведены в таблица 47. Оптимизация условий МС/МС проводили путем напуска определяемых веществ в источник с использованием шприцевого ввода.

Таблица 47 – Условия детектирования некоторых «аптечных наркотиков»

| Параметр | Значение |
|---|---------------|
| Температура испарителя | 400 °C |
| Температура трансферного капилляра | 300 °C |
| Напряжение на источнике ионизации | 4000 V |
| Режим регистрации ионов | Положительные |
| Давление газа-распылителя | 60 AU |
| Давление вспомогательного газа | 15 AU |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона) | 2 мТорр |

AU – условных единиц

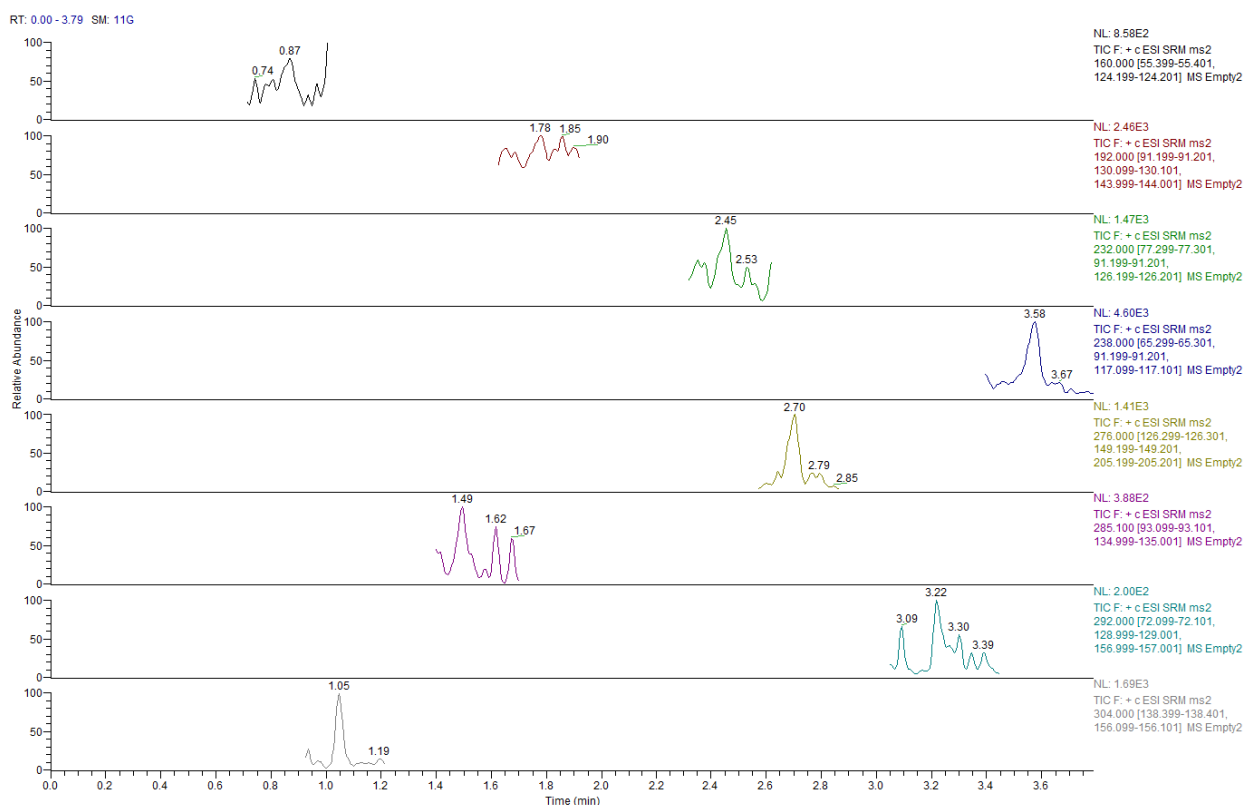


Рисунок 50 – Хроматограмма холостого образца мочи после кислотного гидролиза

В описанных выше условиях на хроматограммах (рисунок 50) отсутствовали пики, имеющие время удерживания и соотношение интенсивностей между MRM-переходами, аналогичные аналитам и мешающие их определению, что свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают

требованиям селективности и эндогенные соединения не оказывают серьезных мешающих влияний при применении процедур «разбавил и вколол» и минерального гидролиза. Подготовка проб по данным процедурам осуществлялась следующим образом:

1) «Разбавил и вколол». В эппендорф объемом 2 мл вносили 100 мкл анализируемой мочи и 900 мкл смеси ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота (50:50) (v:v), содержащей внутренний стандарт, которую перемешивали, после чего провести центрифугирование при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант переносили в стеклянные виалы и анализировали в описанных выше условиях.

2) Минеральный гидролиз. Для подготовки образцов мочи к 1000 мкл пробы добавляли 250 мкл концентрированной соляной кислоты и инкубировали 60 минут при 90 °С, после чего центрифугировали 10 минут при 10 000 об/мин. Избыточную кислоту нейтрализовали 250 мкл 10% водным раствором аммиака.

Для проведения количественных определений готовили ряд калибровочных растворов. Для этого готовили головной раствор с концентрацией аналитов 1 мг/мл путем растворения навески вещества в смеси метанол:0.1% муравьиная кислота (60:40) (v:v). Рабочие растворы готовили последовательным разбавлением головного раствора, которые хранили при 4 °С не более месяца. Стабильность растворов при большей продолжительности хранения не контролировалась.

Калибровочные растворы готовили введением аналитов в холостую пробу мочи. Калибровка осуществляли по следующим концентрациям: 100, 200, 250 и 500 пг/мл, 1, 2, 2.5, 5, 10, 20, 25 и 50 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали аминофенилмасляную кислоту с концентрацией в конечном экстракте 10 нг/мл. Полученные пробы хранили не более 48 ч при комнатной температуре. Спустя 48 ч на дне виалы начинает образовываться осадок, обусловленный деградацией пробы.

Изучение селективности проводили с использованием биологических жидкостей добровольцев, из которых готовили холостые пробы и пробы с добавкой всех аналитов на уровне нижнего предела обнаружения, что позволило убедиться в отсутствии мешающих влияний на времена удерживания, соответствующих аналитам. Описанные выше калибровочные точки были проанализированы с целью установления линейности ($n=6$). Каждый уровень калибровки измерялся дважды. Калибровочные кривые строили как зависимость отношений площадей (площадь аналита/площадь внутреннего стандарта) от концентрации и обрабатывали как линейные зависимости для установления коэффициента корреляции.

Для определения точности анализа готовили несколько растворов контроля качества (QC) с высокой (20 нг/мл), средней (5 нг/мл) и низкой (200 пг/мл) концентрациями. Точность в течение одного дня устанавливали путем определения концентрации растворов QC, проанализированных 5 раз в один день. Междудневная точность определялась путем определения концентраций QC, проанализированных в разные дни. Расчет концентраций QC проводили по калибровочным кривым, полученным в день анализа QC. Результат считался удовлетворительным, если погрешности определения точности и прецизионности не превышали 15%.

Предел детектирования аналита (100 пг/мл) устанавливали экспериментально. Вывод о наличии вещества в пробе делался при соотношении сигнал/шум (S/N) не менее, чем 3:1. Предел обнаружения аналита также устанавливали экспериментально путем построения калибровочной кривой и установления минимальной достоверно определяемой его концентрации, который составил 200 пг/мл, при этом соотношение сигнал/шум всегда было больше, чем 10:1.

При проведении качественного и количественного анализа проб также учитывали критерии ВАДА, согласно которым время удерживания аналита и время удерживания стандартного вещества не должны отличаться больше,

чем на 0.1 мин, а для всех определяемых веществ должны выполняться требования по воспроизводимости абсолютных отношений относительных интенсивностей ионов. Также для каждого вещества устанавливали, как минимум, 2 MRM-перехода. Для проведения количественного определения аналита использовали наиболее селективный и интенсивный ион, который позволял добиться большей точности анализа (таблица 48).

Таблица 48 – Условия детектирования аналитов с использованием ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС

| Вещество | Q ₁ , m/z | Q ₃ , m/z | Энергия соударений, эВ | R _t , мин | Напряжение на экстрагирующей линзе, В |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Фенибут | 180 | 91 (q)* | 35 | 0.57 | 41 |
| | 180 | 117 (t) | 17 | | |
| | 180 | 145 (q) | 12 | | |
| Прегабалин (PGB) | 160 | 55 (q) | 20 | 0.82 | 37 |
| | 160 | 124 (t) | 14 | | |
| Скополамин | 304 | 138 (t) | 21 | 1.05 | 72 |
| | 304 | 156 (q) | 15 | | |
| Тропикамид | 285 | 93 (t) | 35 | 1.53 | 77 |
| | 285 | 135 (q) | 22 | | |
| Атропин | 290 | 93 (q) | 33 | 1.62 | 80 |
| | 290 | 124 (t) | 29 | | |
| 4-метилэтилкатинон (4-МЕС) | 192 | 91 (q) | 32 | 1.75 | 44 |
| | 192 | 130 (q) | 31 | | |
| | 192 | 144 (t) | 29 | | |
| α-PVP | 232 | 77 (q) | 42 | 2.43 | 62 |
| | 232 | 91 (t) | 23 | | |
| | 232 | 126 (q) | 26 | | |
| MDPV | 276 | 126 (t) | 25 | 2.70 | 83 |
| | 276 | 149 (q) | 29 | | |
| | 276 | 205 (q) | 17 | | |
| Циклопентолат (цикломед) | 292 | 72 (q) | 20 | 3.21 | 22 |
| | 292 | 129 (t) | 31 | | |
| | 292 | 157 (q) | 22 | | |
| Дифенил-2-пирролидинилметан (DPhPrd) | 238 | 65 (q) | 54 | 3.56 | 68 |
| | 238 | 91 (t) | 29 | | |
| | 238 | 117 (q) | 16 | | |

* – целевые переходы обозначены как (t), подтверждающие – (q)

Точность определения для всех веществ контролировали в ходе всего эксперимента по валидации с помощью растворов QC. Результат признавался удовлетворительным, если точность и прецизионность не превышали 15% (таблица 49 и 50).

Таблица 49 – Метрологические характеристики определения аналитов в моче методом «разбавил и вколол»

| Вещество | QC | В один день | | | Между днями | | |
|-----------------|-------|------------------------------|-------------|-------------------|------------------------------|-------------|------------------------|
| | | Измеренная конц., (нг/мл) | Точность, % | Прецизионность, % | Измеренная конц., (нг/мл) | Точность, % | Прецизион- ность, % |
| Атропин | Низк | 0.178±0.023 | 11 | 12.8 | 0.172±0.018 | 14 | 10.4 |
| | Средн | 4.50±0.39 | 10 | 8.7 | 4.41±0.33 | 11.8 | 7.5 |
| | Выс | 19.1±1.0 | 4.5 | 5.2 | 18.7±0.9 | 6.5 | 4.8 |
| Скопола- мин | Низк | 0.183±0.02 | 8.5 | 12.3 | 0.177±0.020 | 11.5 | 11.2 |
| | Средн | 4.52±0.37 | 9.6 | 8.1 | 4.52±0.35 | 9.6 | 7.7 |
| | Выс | 19.3±0.9 | 3.5 | 4.8 | 19.0±0.7 | 5 | 3.9 |
| 4-МЕС | Низк | 0.212±0.022 | -6 | 10.3 | 0.207±0.018 | -3.5 | 8.7 |
| | Средн | 4.81±0.35 | 3.8 | 7.2 | 4.86±0.31 | 2.8 | 6.3 |
| | Выс | 19.2±0.83 | 4 | 4.3 | 19.0±0.8 | 5 | 4.1 |
| α-PVP | Низк | 0.183±0.021 | 8.5 | 11.7 | 0.181±0.018 | 9.5 | 10.1 |
| | Средн | 4.77±0.44 | 4.6 | 9.2 | 4.75±0.37 | 5 | 7.8 |
| | Выс | 19.1±1.12 | 4.5 | 6.1 | 19.1±0.7 | 4.5 | 3.8 |
| MDPV | Низк | 0.188±0.023 | 6 | 12.1 | 0.184±0.019 | 8 | 10.3 |
| | Средн | 4.81±0.34 | 3.8 | 7.1 | 4.72±0.35 | 5.6 | 7.5 |
| | Выс | 19.3±1.1 | 3.5 | 5.7 | 18.9±0.8 | 5.5 | 4.0 |
| Прегаба- лин | Низк | 0.171±0.023 | 14.5* | 13.5 | 0.164±0.024 | 18** | 14.6 |
| | Средн | 4.47±0.48 | 10.6 | 10.7 | 4.34±0.53 | 13.2 | 12.2 |

| | | | | | | | |
|-----------------|-------|-------------|--------|------|-------------|--------|------|
| | Выс | 18.3±1.5 | 8.5 | 8.2 | 17.9±1.6 | 10.5 | 9.1 |
| Тропика- мид | Низк | 0.169±0.024 | 15.5** | 14.3 | 0.153±0.022 | 23.5** | 14.3 |
| | Средн | 4.44±0.50 | 11.2 | 11.2 | 4.33±0.49 | 13.4 | 11.2 |
| | Выс | 18.6±1.7 | 7 | 9.2 | 18.3±1.7 | 8.5 | 9.2 |
| Цикло- мед | Низк | 0.171±0.022 | 14.5* | 12.8 | 0.163±0.018 | 18.5** | 11.2 |
| | Средн | 4.62±0.49 | 7.6 | 10.5 | 4.56±0.43 | 8.8 | 9.4 |
| | Выс | 18.8±1.5 | 6 | 8.1 | 18.7±1.6 | 6.5 | 8.6 |
| DPhPrd | Низк | 0.183±0.018 | 8.5 | 9.8 | 0.181±0.015 | 9.5 | 8.4 |
| | Средн | 4.84±0.36 | 3.2 | 7.4 | 4.84±0.28 | 3.2 | 5.8 |
| | Выс | 19.3±1.0 | 3.5 | 5.1 | 19.2±0.8 | 4 | 4.3 |

* – сомнительное значение

** – неудовлетворительное значение

Таблица 50 – Метрологические характеристики определения аналитов в моче с использованием кислотного гидролиза

| Вещество | QC | В один день | | | Между днями | | |
|------------|-------|------------------------------|----------------|------------------------|------------------------------|----------------|------------------------|
| | | Измеренная конц., (нг/мл) | Точность, % | Прецизион- ность, % | Измеренная конц., (нг/мл) | Точность, % | Прецизион- ность, % |
| Атропин | Низк | 0.171±0.018 | 14.5* | 10.7 | 0.162±0.016 | 19** | 10.1 |
| | Средн | 4.51±0.36 | 9.8 | 7.9 | 4.48±0.33 | 10.4 | 7.3 |
| | Выс | 18.9±1.1 | 5.5 | 5.8 | 18.7±1.0 | 6.5 | 5.4 |
| Скополамин | Низк | 0.174±0.018 | 13 | 10.2 | 0.172±0.017 | 14 | 9.8 |
| | Средн | 4.60±0.38 | 8 | 8.1 | 4.51±0.33 | 9.8 | 7.4 |
| | Выс | 18.8±1.1 | 6 | 5.6 | 18.6±1.1 | 7 | 6.1 |
| 4-МЕС | Низк | 0.178±0.017 | 11 | 9.3 | 0.181±0.015 | 9.5 | 8.5 |
| | Средн | 4.71±0.32 | 5.8 | 6.7 | 4.77±0.30 | 4.6 | 6.2 |
| | Выс | 19.1±1.0 | 4.5 | 5.1 | 19±1.0 | 5 | 5.4 |
| α-PVP | Низк | 0.179±0.016 | 10.5 | 8.9 | 0.179±0.015 | 10.5 | 8.4 |
| | Средн | 4.74±0.34 | 5.2 | 7.2 | 4.76±0.29 | 4.8 | 6.1 |
| | Выс | 19.2±0.9 | 4 | 4.7 | 19.1±1.2 | 4.5 | 6.3 |
| MDPV | Низк | 0.182±0.016 | 9 | 8.6 | 0.179±0.016 | 10.5 | 8.8 |
| | Средн | 4.79±0.31 | 4.2 | 6.5 | 4.75±0.35 | 5 | 7.3 |
| | Выс | 19.1±0.8 | 4.5 | 4.4 | 19.1±1 | 4.5 | 5.8 |
| Прегабалин | Низк | 0.166±0.024 | 17** | 14.2* | 0.173±0.023 | 13.5 | 13.5 |
| | Средн | 4.62±0.58 | 7.6 | 12.5 | 4.68±0.55 | 6.4 | 11.7 |

| | | | | | | | |
|------------|-------|-------------|-------|------|-------------|-------|------|
| | Выс | 18.7±1.9 | 6.5 | 10.2 | 19.0±1.9 | 5 | 9.8 |
| Тропикамид | Низк | 0.173±0.023 | 13.5 | 13.3 | 0.171±0.021 | 14.5* | 12.5 |
| | Средн | 4.57±0.50 | 8.6 | 10.9 | 4.60±0.47 | 8 | 10.2 |
| | Выс | 18.5±1.4 | 7.5 | 7.3 | 18.7±1.4 | 6.5 | 7.1 |
| Цикломед | Низк | 0.171±0.020 | 14.5* | 11.8 | 0.176±0.022 | 12 | 12.4 |
| | Средн | 4.61±0.39 | 7.8 | 8.5 | 4.71±0.42 | 5.8 | 8.9 |
| | Выс | 18.4±1.0 | 8 | 5.3 | 18.8±1.38 | 6 | 7.3 |
| DPhPrd | Низк | 0.183±0.016 | 8.5 | 8.8 | 0.182±0.024 | 9 | 13.2 |
| | Средн | 4.81±0.33 | 3.8 | 6.8 | 4.74±0.38 | 5.2 | 8 |
| | Выс | 19.1±1.1 | 4.5 | 6.0 | 19±1.2 | 5 | 6.2 |

* – сомнительное значение

** – неудовлетворительное значение

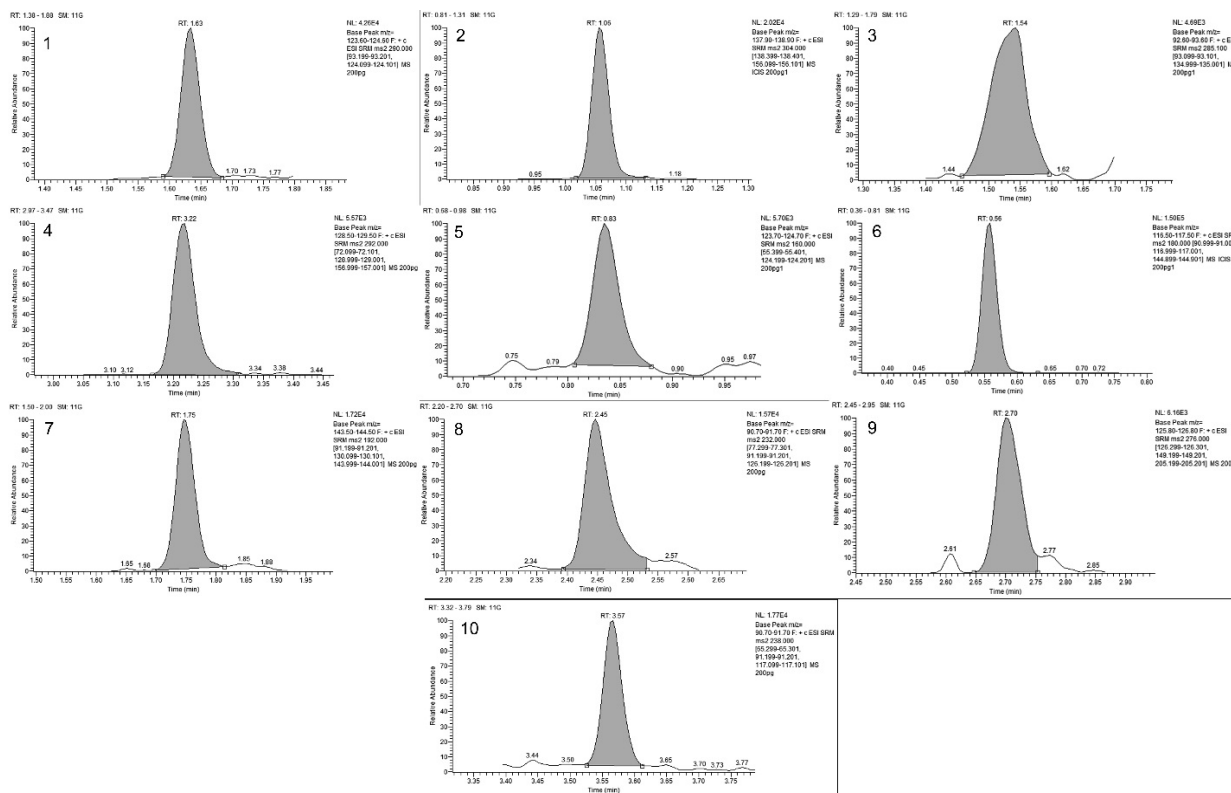
В таблица 51 приведены матричные эффекты для процедур разбавления и кислотного гидролиза, которые представляют собой максимальные значения, полученные в ходе проведения серии экспериментов. Матричные эффекты вычисляли путем сопоставления аналитических сигналов аналитов в чистых растворах и матрице. Как видно из представленных данных, матричные эффекты оказывают достаточно серьезное влияние на величину аналитического сигнала и пренебрегать ими нельзя.

Таблица 51 – Значения матричных эффектов при определении аналитов в моче с использованием разных видов пробоподготовки

| Вещество | «Разбавил и вколол» | Минеральный гидролиз |
|-----------------|------------------------|-------------------------|
| | <i>МЭ, %</i> | <i>МЭ, %</i> |
| Атропин | 18±4 | 14±4 |
| Скопола- мин | 16±3 | 12±4 |
| 4-МЕС | 10±4 | 12±3 |
| α-PVP | 12±3 | 10±3 |
| MDPV | 10±3 | 10±3 |
| Прегаба- лин | 24±5 | 18±6 |
| Тропика- мид | 17±5 | 14±4 |
| Цикломед | 14±4 | 12±4 |
| DPhPrd | 8±3 | 6±3 |

Для всех определяемых веществ установленный предел детектирования составил 100 пг/мл, нижний предел обнаружения – 200 пг/мл, а коэффициент корреляции варьировался от 0.991 до 0.998. Полученные в разные дни калибровочные кривые демонстрировали хорошую корреляцию, что подтверждает

стабильность системы. На рисунок 51 приведены хроматограммы раствора QC низшей концентрации, соответствующей нижнему пределу обнаружения.



1 – атропин; 2 – скополамин; 3 – тропикамид; 4 – цикломед; 5 – прегабалин; 6 – фенибут; 7 – 4-МЕС; 8 – α -PVP; 9 – MDPV; 10 – DPhPrd
Рисунок 51 – Хроматограммы QC (низк)

Предложенный способ использовали при анализе проб, полученных из Краснодарского наркодиспансера с целью установления наличия и содержания психоактивных веществ. В ходе анализа было установлено, что содержания аналитов в пробах существенно превышают линейный диапазон калибровочного графика и для их определений целесообразно проведение предварительного разбавления проб до 100 раз ввиду высокой концентрации аналитов в реальной пробе (рисунок 52 и 53). Чувствительность предложенной методики можно назвать несколько избыточной, однако, в ряде случаев при проведении токсикологических экспертиз требуется установление факта употребления наркотических и психоактивных веществ после совершения правонарушения спустя несколько дней. В таких случаях требуется применение методики, отвечающей требованиям высокой чувствительности и надежности.

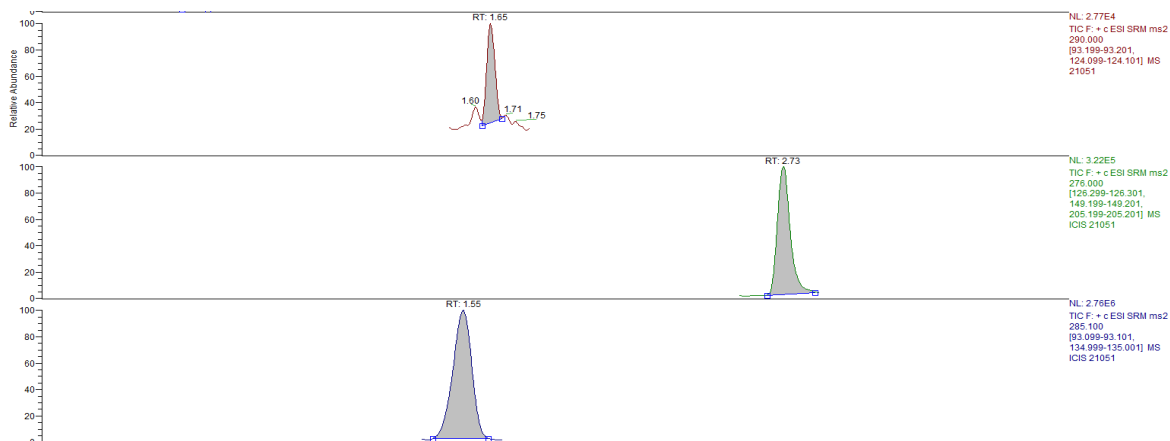


Рисунок 52 – Хроматограмма 1 образца мочи после кислотного гидролиза (разбавление в 20 раз)

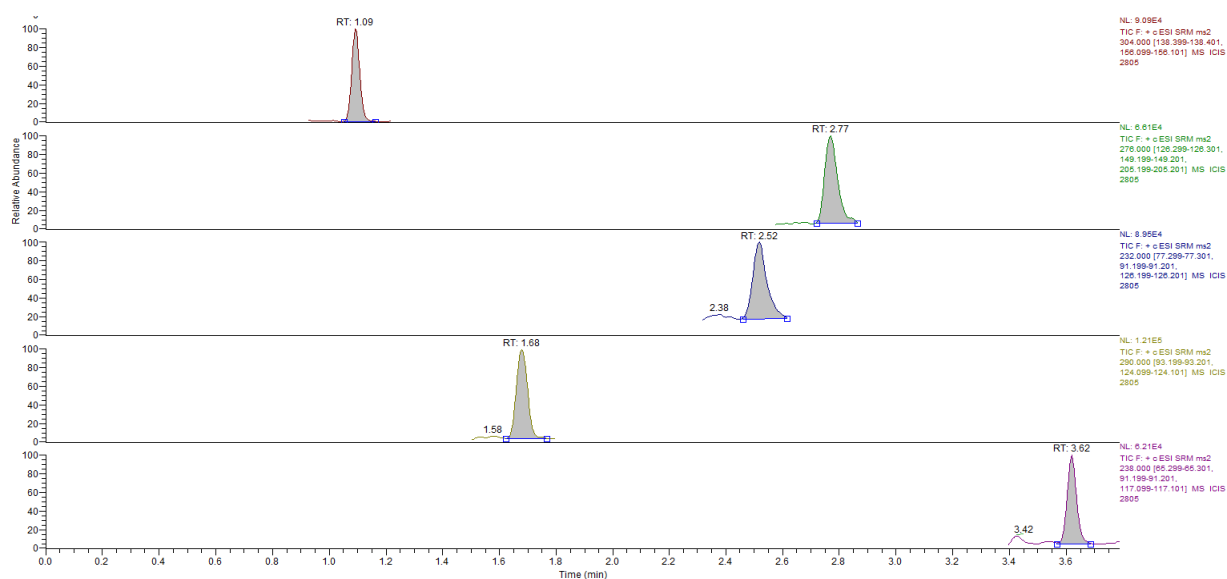


Рисунок 53 – Хроматограмма 2 образца мочи после кислотного гидролиза (разбавление в 100 раз)

2.9 Определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче

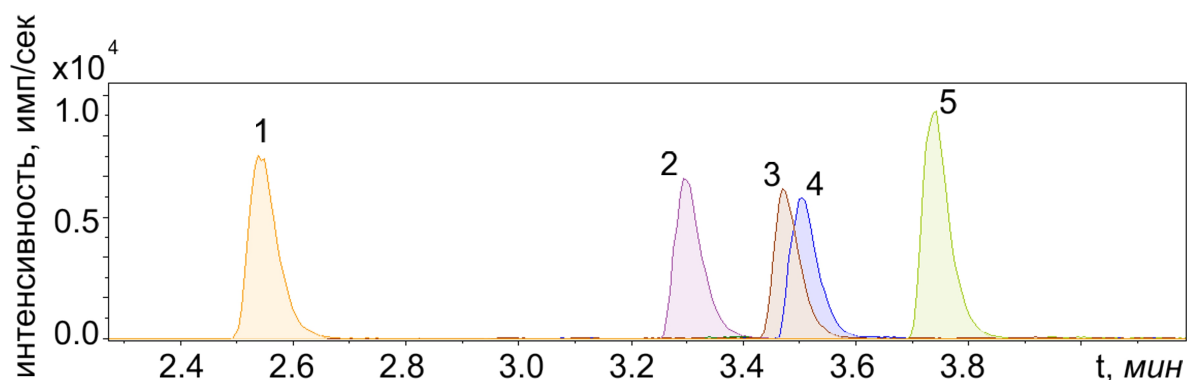
Изменение состава подвижной фазы – один из способов управления не только параметрами удерживания аналитов, но и чувствительностью анализа, особенно в жидкостной хромато-масс-спектрометрии. В ходе проведения исследований, были использованы системы подвижных фаз на основе подкисленных воды и ацетонитрила, также проведена оптимизация условий градиентного элюирования [604]. В результате решили рассмотреть два варианта, обеспечивших наилучшие результаты. В первом случае подвижная фаза состояла из 0.1 % раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила с добавкой 0.1 % муравьиной кислоты. К сожалению, его использование не позволило добиться чувствительности определения аналита лучше, чем 20 нг/мл. Вторая система, в состав которой входили 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) (А) и ацетонитрил с добавкой 0.1 % ТФУ (В), позволила снизить предел обнаружения до 5 нг/мл за счет повышения эффективности ионизации аналитов. Условия градиентного элюирования и детектирования аналитов приведены в таблица 52 и 53. Хроматограмма смеси пептидов, полученная в условиях регистрации полного ионного тока, приведена на рисунок 54.

Таблица 52 – Условия градиентного элюирования рилизинг-пептидов гормонов роста. Скорость потока подвижной фазы – 0.3 мл/мин

| Время, мин | Элюент А, % | Элюент В, % |
|------------|-------------|-------------|
| 0.0 | 95 | 5 |
| 0.5 | 95 | 5 |
| 5.0 | 10 | 90 |
| 9.0 | 10 | 90 |
| 9.2 | 95 | 5 |
| 10.5 | 95 | 5 |

Таблица 53 – Условия детектирования релизинг-пептидов гормона роста в моче

| Параметр | Значение |
|--|----------|
| Температура источника ионизации, °С | 250 |
| Напряжение на источнике ионизации, В | 4500 |
| Давление газа-распылителя (азот), кПа | 100 |
| Расход газа-осушителя (азот), л/мин | 5 |
| Скорость сканирования, Гц | 3 |
| Диапазон масс, m/z | 150–3000 |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (азот), мТорр | 1.5 |



1 – селанк, 2 – ипаморелин, 3 – GHRP-6, 4 – гексарелин, 5 – РТ-141.

Рисунок 54 – Хроматограмма смеси пептидов в условиях регистрации полного ионного тока с концентрацией 10 нг/мл.

Достижение такой чувствительности не является достаточной и не отвечает требованиям ВАДА при определении релизинг-пептидов гормона роста, даже в случае прямого анализа мочи без её предварительного разбавления для денатурации белка. Решение данной проблемы возможно с применением твердофазной экстракции. Для этого аликвоту мочи, содержащей нативные анализы, объемом 3 мл, загружали на патроны для ГФЭ. Предварительное кондиционирование патронов осуществляли с использованием смеси метанол:вода (50:50, $v:v$) и элюирование (объемом 0.5 мл) осуществляли смесью

ацетонитрил:вода (90:10) для патронов C₁₈. Ввиду отличий в механизме удерживания катионообменных сорбентов (SCX и WCX), их кондиционирование осуществляли 2.5% водным раствором аммиака в воде с последующим пропуском смеси ацетонитрил:вода (10:90). Элюирование осуществляли 5 % раствором ацетата аммония в метаноле.

Таблица 54 – Эффективность различных сорбентов при твердофазном концентрировании аналитов из мочи ($C = 20$ нг/мл, $n = 3$)

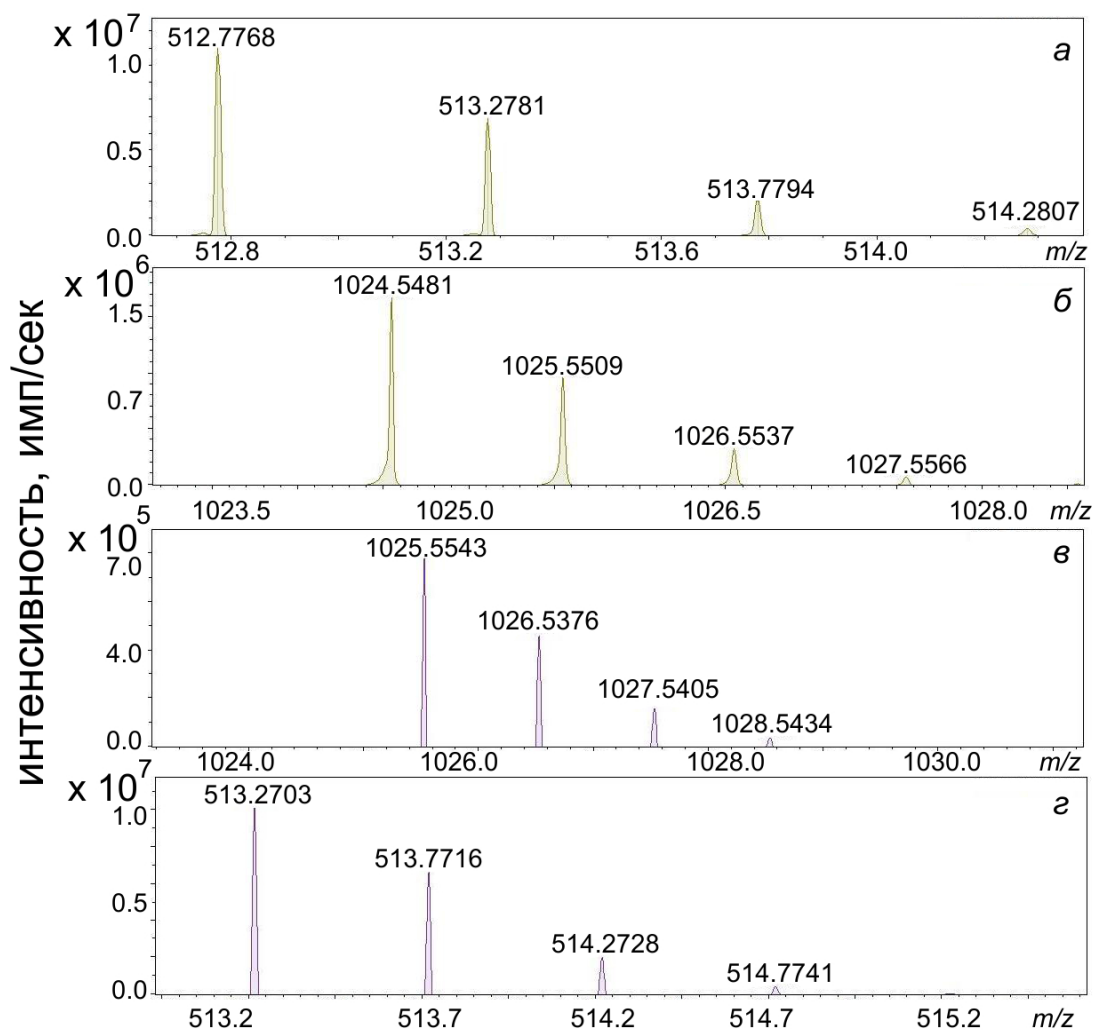
| Определяемое соединение | Степень извлечения, % | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | Biotage Isolute C ₁₈ | Phenomenex Strata WCX | Biotage Isolute SCX |
| Селанк | 35 ± 4 | 89 ± 5 | 76 ± 5 |
| Ипаморелин | 48 ± 5 | 94 ± 4 | 82 ± 5 |
| GHRP-6 | 53 ± 5 | 91 ± 4 | 80 ± 5 |
| Гексарелин | 54 ± 5 | 91 ± 4 | 78 ± 5 |
| PT-141 (IS) | 70 ± 5 | 92 ± 4 | 86 ± 4 |

Как видно из таблица 54, наибольшая степень извлечения аналитов достигается при использовании патронов для твердофазной экстракции со слабым катионообменным сорбентом (WCX). Меньшая степень извлечения с использованием патронов SCX обусловлена тем, что аналиты сильнее удерживаются на сорбенте и количественного их извлечения удастся достигнуть при увеличении объема элюента в 2 раза, что снижает их концентрирование. При использовании октадецильного сорбента наблюдается существенный проскок аналитов уже в начале загрузки.

Немаловажным аспектом при проведении анализа является оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования. Применение режима динамического исключения ионов-прекурсоров не позволяет добиться выигрыша в чувствительности, однако, в целях повышения информативности и возможности дальнейшего ретроспективного анализа данных его применение может являться целесообразным. Неменьший интерес представляет режим, при котором масс-спектрометр постоянно осуществляет переключение между

режимом сканирования полного ионного тока ионов-прекурсоров и широкополосным сканированием ионов-продуктов, при котором аналитический квадруполь пропускает весь заданный диапазон масс в ячейку соударений с целью получения их ионов-продуктов. В этом режиме, в случае наличия коэлюирующихся матричных соединений, будут получены спектры ионов-продуктов как аналитов, так и матричных компонентов. При этом вероятность ложного отбрасывания пика аналита ввиду его малой интенсивности отсутствует (что возможно при работе в режиме динамического исключения), однако однозначно установить принадлежность иона-продукта к конкретному иону-прекурзору в условиях реальных образцов биологических жидкостей практически невозможно. При этом, как и в случае динамического исключения ионов-прекурсоров, выигрыша в чувствительности по сравнению с работой при сканировании полного ионного тока без проведения экспериментов в режиме тандемного масс-спектрометрического детектирования (**MS1**) не происходит, что объясняется потерями при формировании ионов-продуктов, которые компенсируются высокой селективностью масс-спектрометра. Существенным недостатком подхода, основанного на работе без проведения MS/MS экспериментов, является малая информативность о структурной информации аналитов и возможности возникновения хроматографически неразрешенных соединений, имеющих близкие значения m/z , которые не могут быть разрешены даже с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения. Примером подобных соединений являются РТ-141 и меланотан II (рисунок 55а и 5г). В присутствии обоих соединений в образце, несмотря на значимую для МСВР разницу в массах образующихся полизарядных ионов, могут наблюдаться завышение аналитического сигнала РТ-141 из-за наложения моноизотопного пика двузарядного иона РТ-141 с первым изотопным пиком двузарядного иона меланотана II. При этом их однозарядные ионы, имеющие существенно меньшую интенсивность в этих условиях (что, в условиях анализа биологических жидкостей, где концентрации аналитов чрезвычайно малы, приведет к их полному

отсутствию в спектре), можно разделить даже с использованием масс-спектрометрии низкого разрешения (рисунок 55б и рисунок 55в).



а, б – меланотан II, в, г – РТ-141

Рисунок 55 – Масс-спектры рассматриваемых пептидов

С другой стороны, вероятность их присутствия в пробах биологических жидкостей спортсменов крайне мала, поскольку оба соединения не обладают свойствами, которые могут привести к улучшению демонстрируемых результатов. Это позволяет использовать любое из них в качестве внутреннего стандарта, что и было нами использовано (таблица 55).

Как видно из представленных данных, полученные результаты являются удовлетворительными. Дополнительным критерием оценки надежности результатов, в случае применения масс-спектрометрии высокого разрешения,

является ошибка определения масс. Удовлетворительным, согласно критериям FDA, является значение, не превышающее 5 ppm в режиме MS1, которому полностью удовлетворяют результаты, полученные в ходе проведения исследования.

В ряде случаев, помимо ОФ-ВЭЖХ целесообразно применение и других вариантов разделения, например, гидрофильной хроматографии. На сегодняшний день она имеет широкое распространение и продолжает активно использоваться исследователями для решения новых задач и широко применяется в рутинном анализе. В ряде случаев её применение позволяет добиться существенного повышения чувствительности при применении масс-спектрометрического детектирования, поскольку в этих условиях основным компонентом подвижной фазы является ацетонитрил.

Разделение исследуемых низкомолекулярных пептидов в режиме гидрофильной хроматографии, как видно из хроматограммы (рисунок 56), не позволяет добиться необходимых результатов – формы получаемых пиков неудовлетворительны, несмотря на проведенную оптимизацию условий разделения (таблица 56 и таблица 57) и детектирования (таблица 58), некоторые из них и вовсе не элюировались [605]. При этом оптимизацию условий разделения осуществляли как по составу подвижной фазы (соотношению компонентов), так и по профилю кривой градиентного элюирования. Несмотря на это лучшей формы пиков и эффективности разделения с использованием данного сорбента добиться не удалось.

Таблица 55 – Некоторые метрологические характеристики методики определения релизинг-пептидов гормона роста в моче ($n = 6$). Внутренний стандарт – РТ-141

| Вещество | Детектируемое значение m/z | Детектируемый ион | Ошибка определения масс, Δppm | Концентрация раствора контроля качества (РКК), нг/мл | В один день | | В разные дни | | Матричные эффекты, % |
|------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|--|-------------|----------------------|--------------|----------------------|----------------------|
| | | | | | Точность, % | Воспроизводимость, % | Точность, % | Воспроизводимость, % | |
| Селанк | 376.7242 | $[M+2H]^{2+}$ | 1.73 | 2 | -5.6 | 11.4 | -5.2 | 14.2 | 15 |
| | | | | 10 | -3.8 | 7.7 | -3.6 | 10.5 | 9.2 |
| | | | | 25 | 2.2 | 5.4 | -2.9 | 11.9 | 4.5 |
| Ипаморелин | 356.7000 | $[M+2H]^{2+}$ | 0.84 | 2 | -6.1 | 12.3 | -7.0 | 13.6 | 12 |
| | | | | 10 | -4.2 | 9.1 | -5 | 10.3 | 7.3 |
| | | | | 25 | 2.5 | 4.9 | 2.9 | 5.9 | 4.8 |
| GHRP-6 | 437.2295 | $[M+2H]^{2+}$ | 1.37 | 2 | 6.6 | 10.5 | 6.4 | 10.2 | 13 |
| | | | | 10 | 4.3 | 8.3 | 4.2 | 8.1 | 6.4 |
| | | | | 25 | 1.7 | 3.9 | 1.7 | 3.7 | 4.2 |
| Гексарелин | 444.2372 | $[M+2H]^{2+}$ | 1.58 | 2 | 5.5 | 10.7 | 5.7 | 11.0 | 12 |
| | | | | 10 | 3.2 | 7.4 | 3.3 | 6.9 | 6.8 |
| | | | | 25 | 1.3 | 2.8 | 1.3 | 3.1 | 5.0 |

Таблица 56 – Условия градиентного элюирования в режиме гидрофильной хроматографии

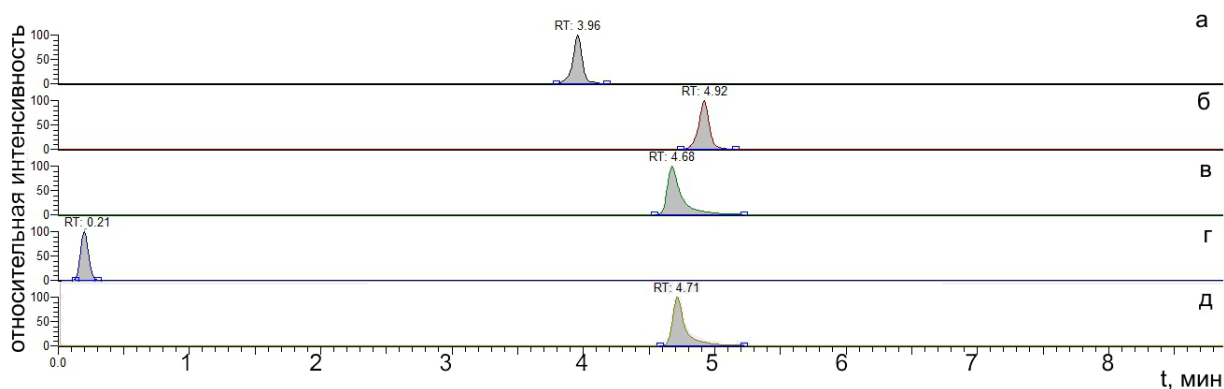
| Время, мин | А (ацетонитрил), % об. | В (0.1% р-р муравьиной кислоты), % об. | Скорость потока, мл/мин |
|------------|------------------------|--|-------------------------|
| 0 | 95 | 5 | 0.5 |
| 0.6 | 95 | 5 | |
| 1.6 | 50 | 50 | |
| 5.6 | 50 | 50 | |
| 5.8 | 95 | 5 | |
| 8.5 | 95 | 5 | |

Таблица 57 – Условия градиентного элюирования в режиме обращено-фазовой хроматографии

| Время, мин | А (ацетонитрил), % об. | В (0.1% р-р муравьиной кислоты / 1% р-р аммиака), % об. | Скорость потока, мл/мин |
|------------|------------------------|---|-------------------------|
| 0 | 5 | 95 | 0.45 |
| 1 | 5 | 95 | |
| 2.5 | 20 | 80 | |
| 3.5 | 30 | 70 | |
| 5 | 90 | 10 | |
| 7.5 | 90 | 10 | |
| 7.8 | 10 | 90 | |
| 9 | 10 | 90 | |

Таблица 58 – Условия детектирования аналитов с использованием ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС

| Параметр | Значение |
|---|---------------|
| Температура испарителя | 350 °С |
| Температура трансферного капилляра | 270 °С |
| Напряжение на источнике ионизации | 3500 В |
| Режим регистрации ионов | Положительный |
| Давление газа-распылителя | 12 л/мин |
| Давление вспомогательного газа | 3 л/мин |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (аргона) | 0.2 Па |

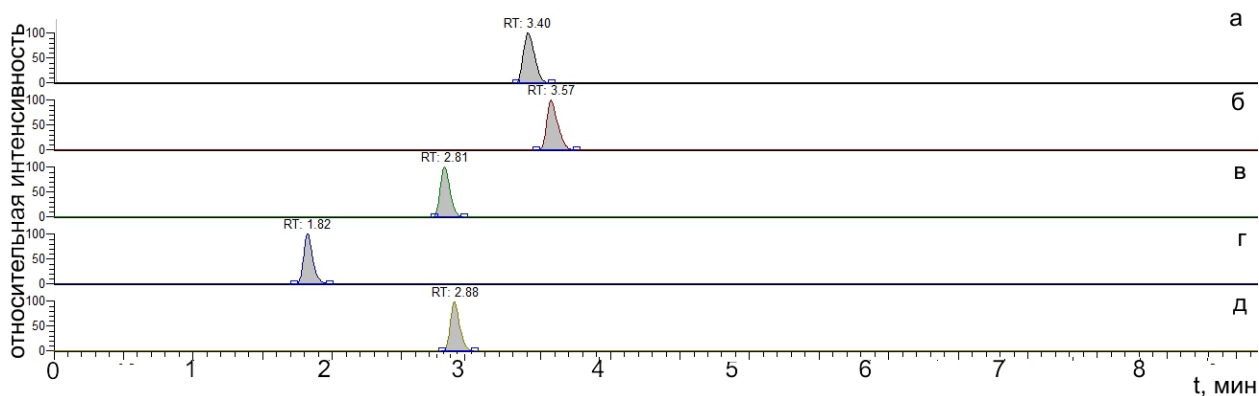


а – меланотан-2; б – GHRP-2; в – GHRP-6; г – DSIP; д – гексарелин

Рисунок 56 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в режиме гидрофильной хроматографии:

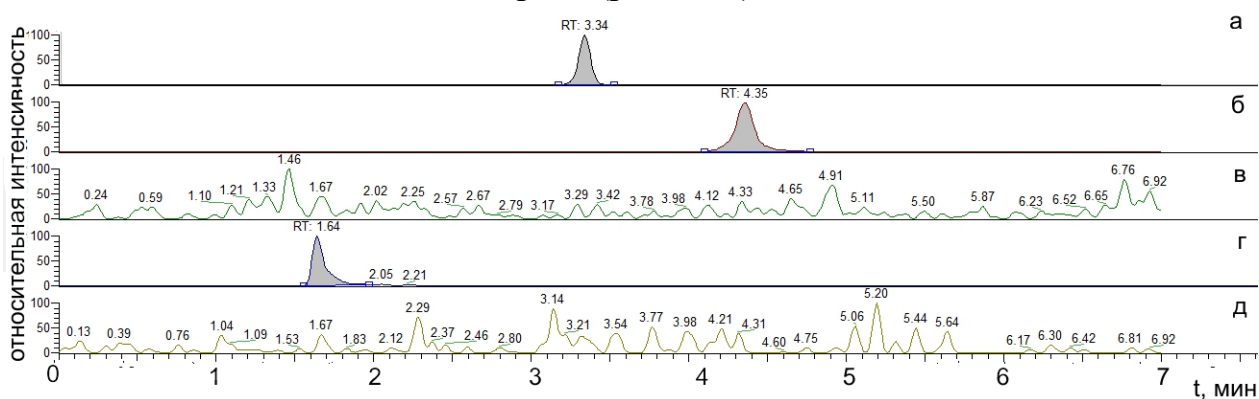
Традиционным методом разделения подобных соединений является обращенно-фазовая жидкостная хроматография. В зависимости от свойств аналита при этом могут меняться как условия разделения, так и способ детектирования.

При проведении исследований использовали оба варианта разделения: традиционный вариант регистрации положительных ионов с использованием кислой подвижной фазы (система 1) (рисунок 57), и регистрация положительных ионов с использованием подщелоченной подвижной фазы (система 2) (рисунок 58). В последнем случае в растворе отсутствует явный источник избыточного количества протонов, поэтому возможность получения протонированных ионов не является очевидной.



а – меланотан-2; б – GHRP-2; в – GHRP-6; г – DSIP; д – гексарелин

Рисунок 57 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в кислой среде (pH = 2.5)



а – меланотан-2; б – GHRP-2; в – GHRP-6; г – DSIP; д – гексарелин

Рисунок 58 – Хроматограмма смеси пептидов по выделенным ионам в щелочной среде (pH = 10)

Предлагаемый способ разделения позволяет не только существенно изменить параметры удерживания за счет изменения формы нахождения вещества в растворе (рисунок 58), но и позволяет получить монозарядные молекулярные ионы. При применении в качестве одного из компонентов подвижной фазы подкисленных растворов большинство изучаемых соединений образует ряд ионов: как монозарядных, так и двузарядных. При этом оба способа обеспечивали идентичную чувствительность: предел обнаружения составил 5 нг/мл.

С другой стороны, использование способа “Wrong-way round ionization” ограничено возможностью применения большинства сорбентов в щелочной среде. Существенное отличие форм пиков, полученных при разделении в кислой и щелочной среде, отчасти объясняется тем, что программа градиентного

элюирования для щелочной среды не менялась для сохранения возможности сопоставления параметров удерживания аналитов при формально одинаковой силе элюента, обусловленной объемной долей ацетонитрила в составе подвижной фазы в обоих случаях.

Другой интересной особенностью применения данного метода является возможность получения преимущественно монозарядного иона для аналитов, склонных к образованию полизарядных ионов (рисунок 59), что, в ряде случаев, может положительно сказаться как на точности анализа, так и его надежности при использовании масс-спектрометрического детектирования. Следует отметить, что применение данного метода ограничено верхним диапазоном масс применяемого прибора и может привести к невозможности его применения.

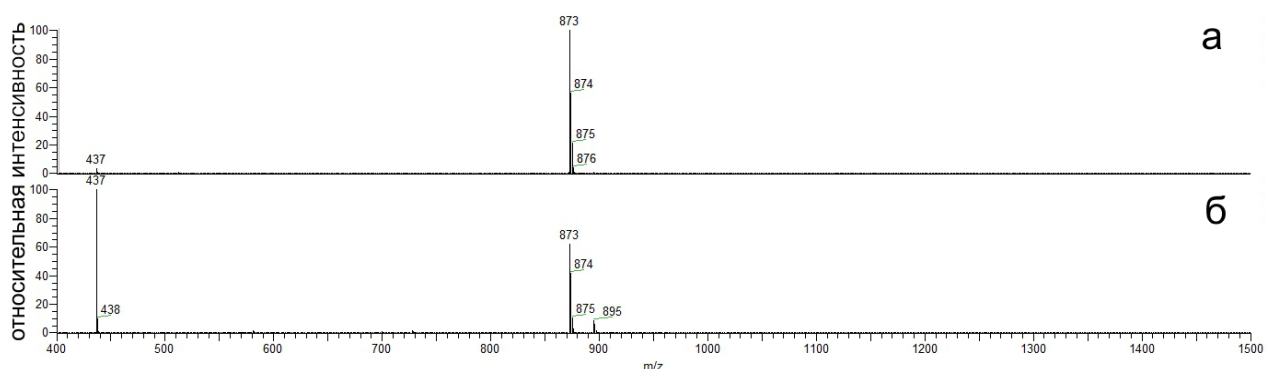


Рисунок 59 – Масс-спектры пептида GHRP-6 в щелочной (а) и кислой среде (б)

Анализ приведенных в таблица 55 структур аналитов и их молекулярных масс показывает, что исследуемые пептиды являются низкомолекулярными и их определение на современных ВЭЖХ-МС/МС системах с использованием предлагаемого способа не вызывает затруднений.

Предложенные методики были апробированы при анализе образцов пептидов, приобретенных в интернет-магазине. Пробы готовили путем разбавления содержимого флакона с помощью 0.1 % об. раствора муравьиной кислоты для анализа с использованием системы 1. Во всех приобретенных образцах

обнаружили заявленные пептиды, что говорит о легкодоступности данных соединений.

Таким образом, для проведения исследований низкомолекулярных пептидов наиболее целесообразным представляется применение методов ОФ-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и регистрацией положительных ионов, как в режиме “Wrong-way round ionization”, так и в традиционной схеме реализации с подкислением подвижной фазы. Применение последней представляется более предпочтительным ввиду большей универсальности и отсутствия дополнительных требований к хроматографической системе.

2.10 Определение мельдония в моче

Далеко не все соединения могут быть определены в рамках одного аналитического цикла из-за значительных отличий в условиях разделения и детектирования. В качестве примера можно назвать мельдоний, который является полным аналогом природного γ -бутиробетаина, предшественника карнитина (рисунок 60) [606, 607].

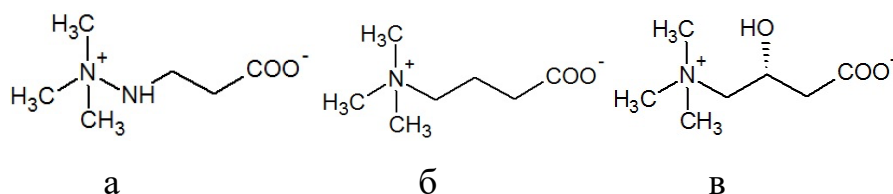


Рисунок 60 – Структуры мельдония (а), γ -бутиробетаина (б), карнитина (в)

Ввиду высокой полярности, а также небольшой молекулярной массы, определение мельдония в биологических объектах может быть затруднено сильно выраженными матричными эффектами и практически отсутствием удерживания в режиме ОФ-ВЭЖХ, что обуславливает необходимость применения гидрофильной хроматографии (HPLC). Как видно из рисунка 60, соединение не имеет хромофорных групп, поэтому ультрафиолетовое и

флуоресцентное детектирование без его предварительной дериватизации нецелесообразно. В то же время, данное соединение достаточно эффективно ионизируется, что, в сочетании с HPLC, позволяет достичь достаточно низких пределов обнаружения.

Ввиду отсутствия изотопно-меченных стандартов в качестве внутреннего стандарта использовали габапентин. Данное вещество близко по структуре к мельдонию, оно не является эндогенным соединением, что позволяет избежать существенных искажений получаемых результатов. В качестве внутреннего стандарта также изучали возможность применения холина альфосцерат, но от его использования пришлось отказаться из-за невысокой воспроизводимости получаемых результатов.

Разделение компонентов осуществлялось на колонке Phenomenex Kinetex HPLC (100 мм× 2.1 мм, 2.6 мкм) при температуре термостата 30°C. Для обеспечения воспроизводимости результатов и минимизации перекрестного загрязнения образцов игла автосамплера пятикратно промывалась до и после ввода пробы смесью вода:ацетонитрил:метанол (70:20:10, по объему).

В качестве подвижной фазы изучали системы ацетонитрил:0.1% муравьиная кислота и ацетонитрил:10 мМ ацетат аммония. Наибольшая эффективность разделения достигается при использовании системы ацетонитрил :10 мМ ацетат аммония. В ходе оптимизации условий разделения также установили, что наиболее воспроизводимые результаты и лучшая форма пиков достигается при скорости потока подвижной фазы, равной 0.3 мл/мин и температуре термостата колонок 30°C. Условия градиентного элюирования приведены в таблице 59.

Таблица 59 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (10 мМ ацетат аммония), % | Скорость потока, мл/мин | Объем вводимой пробы, мкл |
|------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 0 | 95 | 5 | 0.3 | 10 |
| 2 | 83 | 17 | | |
| 4 | 62 | 38 | | |
| 6 | 42 | 58 | | |
| 8 | 35 | 65 | | |
| 10 | 35 | 65 | | |
| 12 | 35 | 65 | | |
| 14 | 35 | 65 | | |
| 16 | 95 | 5 | | |

По причине высокой полярности аналита, оптимальным является применение электрораспылительной ионизации (**HESI**). В ходе проведения исследований установили оптимальные условия детектирования: температура 350°C, температура трансферного капилляра 320°C, напряжение на источнике ионизации 3000 В, режим регистрации положительных ионов, давление газа – распылителя (азот) 60 усл.ед., давление вспомогательного газа (азот) 10 усл.ед., давление газа-мишени в ячейке соударений (аргон) 1.5 мТорр. Оптимизацию условий МС/МС детектирования проводили путем напуска определяемых вещества в камеру источника с использованием шприцевого ввода.

В вышеописанных условиях на хроматограммах (рисунок 61) отсутствуют пики с временами удерживания и соотношением интенсивностей между MRM-переходами, аналогичные аналитам и мешающим их определению. Это свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают требованиям селективности, и эндогенные соединения серьезно не мешают при применении техники «разбавил и вколлол».

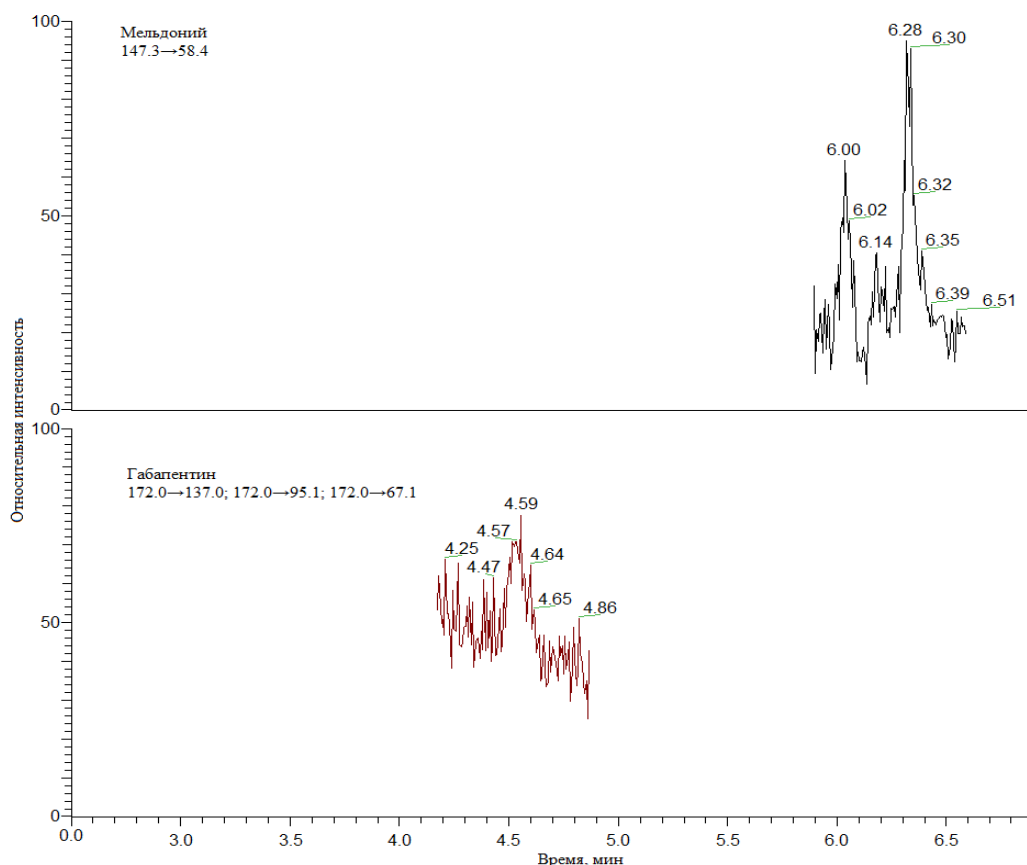


Рисунок 61 – ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма контрольного образца мочи по методике «разбавил и вколел»

Подготовку проб осуществляли следующим образом: в эппендорф, объемом 2 мл, вносили 200 мкл анализируемой мочи и 1800 мкл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт, перемешивали, после чего центрифугировали при 10000 об/мин 10 минут. Супернатант переносили в стеклянные вials и анализировали. Подготовленные таким образом образцы мочи также могут быть использованы при прямом способе введения пробы в систему масс-спектрометрического детектирование без предварительного хроматографического разделения, однако в этом случае обнаружение мельдония с концентрацией ниже 20 нг/мл представляется затруднительным из-за проявляющихся матричных эффектов. Кроме того, происходит существенное загрязнение ионной оптики и трансферного капилляра и уже после 100 вводов пробы, требуется проведение технического обслуживания прибора с целью очистки ионной оптики.

Для проведения количественного анализа готовили ряд градуировочных растворов. Головной раствор с концентрацией аналитов 1мг/мл получали путем растворения навески вещества в смеси вода:ацетонитрил (20:80, по объему). Рабочие растворы готовили последовательным разбавлением ацетонитрилом исходного раствора. Для градуировки использовали прием введения аналитов в контрольную пробу мочи с концентрациями 10; 12.5; 25; 50; 100; 125 и 250 нг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали габапентин с концентрацией 50 нг/мл в полученном экстракте. Полученные пробы хранили не более 48 ч при комнатной температуре. Описанные выше градуировочные точки анализировали с целью установления линейного диапазона (n=3), каждый уровень градуировки измеряли дважды. Градуировочные кривые строили в виде зависимости отношений площадей (площадь аналита / площадь внутреннего стандарта) от концентрации и обрабатывали как линейные зависимости для установления коэффициента корреляции.

Для установления точности анализа готовили несколько растворов контроля качества (РКК) с высокой (250нг/мл), средней (100нг/мл) и низкой (25 нг/мл) концентрациями; растворы РКК анализировали в течение одного дня по 5 раз. Правильность результатов в разные дни также контролировали путем анализа РКК. Концентрации рассчитывали по градуировочным графикам, полученным в день анализа. Результат признавали удовлетворительным, если погрешность определения не превышала 15% (таб. 60).

Таблица 60 – Результаты определения мельдония в моче с применением методики «разбавил и вколол»

| Мельдоний | Введено, нг/мл | В один день | | В разные дни | |
|-----------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | | Найдено, нг/мл | Правильность, % | Найдено, нг/мл | Правильность, % |
| | 25 | 28±4 | 11.97 | 24±3 | -2.79 |
| | 100 | 117±12 | 17.73* | 111±11 | 11.42 |
| | 250 | 249±14 | -0.30 | 246±14 | -1.29 |

*неудовлетворительный результат

Предел обнаружения аналита устанавливали экспериментально путем снижения концентраций стандартных растворов до тех пор, пока соотношение сигнал:шум не составило 3:1 при концентрации мельдония 7.5 нг/мл. Нижнюю границу определяемых концентраций также устанавливали экспериментально, и она составила 10 нг/мл.

При проведении качественного и количественного анализа проб учитывали критерии ВАДА, согласно которым времена удерживания аналита и стандартного вещества не должны отличаться более чем на 0.1 мин с соблюдением воспроизводимости абсолютных отношений относительных интенсивностей ионов.

Ввиду малой молекулярной массы мельдония, он имеет только один характеристичный переход, что существенно осложняет обеспечение надежности его определения и требует тщательного подбора условий разделения – время удерживания, MRM- переходы и энергия соударений для аналитов (таблица 61).

Таблица 61 – Времена удерживания, MRM- переходы и энергии соударений при определении мельдония с использованием ВЭЖХ-МС/МС-ЭРИ

| Вещество | Время удерживания, мин | Ион-пре-курсор, m/z | Продукт-ион, m/z | Энергия соударений, эВ | Напряжение на экстрагирующей линзе, В |
|------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Мельдоний | 6.20 | 147.1 | 58.3 | 32 | 57 |
| Габапентин | 4.35 | 172.3 | 137.2 95.3 67.3 | 14 20 28 | 75 |

Предложенный способ использовали для анализа проб мочи, полученных от добровольцев через 12 ч и 24 ч после приема мельдония в дозе 500 мг (рисунок 62).

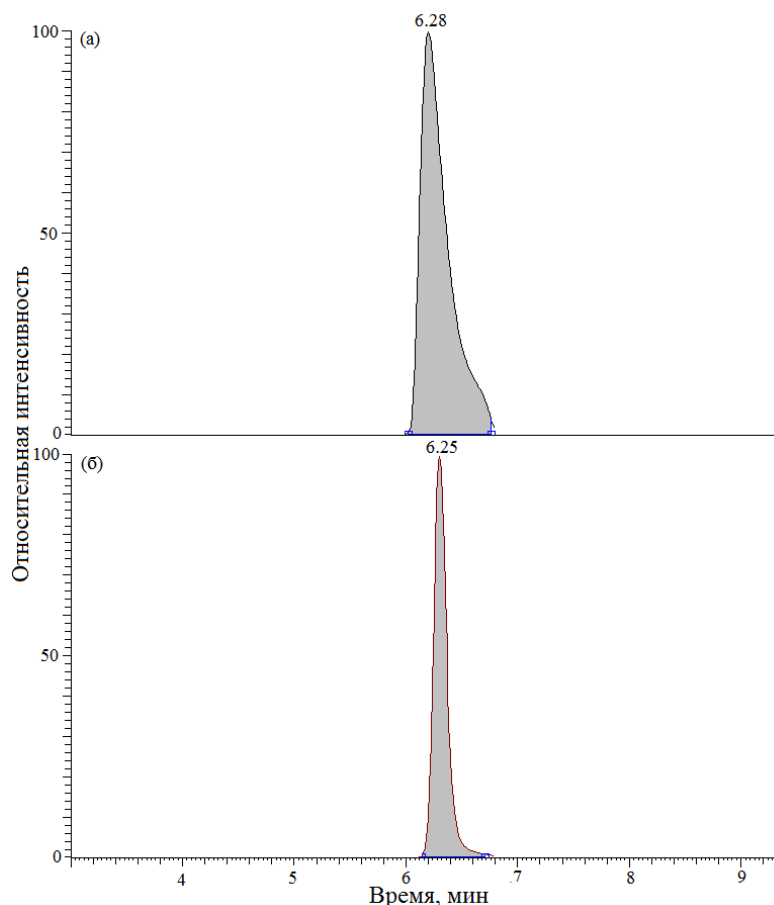


Рисунок 62 – ВЭЖХ-МС/МС хроматограммы образцов мочи через 12 часов (а), 24 часа (б)

2.11 Определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче с использованием твердофазной экстракции

Ранее уже отмечалось [254–258], что определение селективных модуляторов андрогенных рецепторов в моче возможно не только в форме метаболитов, но и в нативном виде. Для этого зачастую требуется применение предварительных методов концентрирования, таких как ТФЭ [608–613].

Исходя из структур определяемых соединений и параметров удерживания в режиме ОФ-ВЭЖХ, для проведения дальнейших исследований изучили возможность использования следующих патронов для твердофазной экстракции: Varian Bond Elut C8 (100 мг, 1 мл), Biotage Isolute C18 (EC) (100 мг, 1 мл) и Waters Oasis HLB (30 мг, 1 мл).

Кондиционирование патрона проводили с последовательным использованием метанола и деионизованной воды. Оптимизацию объема загрузки

анализируемых образцов мочи проводили в отдельных экспериментах путем добавления смеси аналитов в бланковые образцы мочи и определением объема до проскока. Промывку патрона осуществляли смесью метанола в воде при их различных соотношениях до достижения наилучшей очистки проб от матричных компонентов и без потерь аналитов. После промывки сушили патрон в токе азота, элюирование аналитов проводили метанолом. Далее проводили упаривание элюата в токе азота и перерастворение остатка в смеси метанол: деионизованная вода (1:1, по объему). Элюат затем подвергался анализу.

В качестве подвижной фазы использовали 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1 % об. раствор муравьиной кислоты в метаноле (элюент В) в режиме градиентного элюирования (таблица 62) при параметрах масс-спектрометра, приведенных в таблица 63. Объем вводимой пробы составил 10 мкл, скорость потока подвижной фазы – 0.45 мл/мин и температуре термостата 40 °С. Детектирование проводили в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM) при регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов (таблица 64).

Таблица 62 – Условия градиентного элюирования при скорости потока 0.45 мл/мин

| Время, мин | Элюент А, % об. | Элюент В, % об. |
|------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 1.0 | 95 | 5 |
| 1.7 | 40 | 60 |
| 3.5 | 40 | 60 |
| 6.5 | 10 | 90 |
| 9.0 | 10 | 90 |
| 9.0 | 95 | 5 |
| 10.5 | 95 | 5 |

Таблица 63 – Параметры масс-спектрометрического детектирования с источником нагреваемой электрораспылительной ионизации

| Параметр | Значение | |
|---|---------------|---------------|
| | Положительный | Отрицательный |
| Режим регистрации ионов | | |
| Температура испарителя, °С | 400 | |
| Температура трансферного капилляра, °С | 320 | |
| Напряжение на источнике ионизации, В | 4000 | - 3000 |
| Расход газа-распылителя, усл. ед. | 60 | |
| Расход вспомогательного газа, усл. ед. | 10 | |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений, мТорр | 1.5 | |

Таблица 64 – Условия детектирования аналитов в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM)

| Аналит | Ион-предшественник, m/z | Ион-продукт, m/z | Энергия соударений, эВ | t_R , мин | Напряжение на экстрагирующей линзе, В |
|------------------|---------------------------|--------------------|------------------------|-------------|---------------------------------------|
| Андарин | 442.1 | 108.1 | 32 | 3.16 | 101 |
| | | 148.0 | 29 | | |
| | | 190.0 | 23 | | |
| Ибутаморен | 529.2 | 235.0 | 22 | 2.61 | 77 |
| | | 263.0 | 15 | | |
| | | 267.0 | 19 | | |
| Лаксогенин | 445.3 | 145.0 | 36 | 6.56 | 65 |
| | | 191.0 | 19 | | |
| | | 283.0 | 18 | | |
| Лигандрол | 339.1 | 199.0 | 28 | 4.16 | 88 |
| | | 220.0 | 27 | | |
| | | 240.0 | 24 | | |
| Остарин | 388.0 | 118.0 | 40 | 3.45 | -46 |
| | | 185.0 | 40 | | |
| | | 268.9 | 21 | | |
| Метилтестестерон | 303.3 | 79.2 | 32 | 4.66 | 55 |
| | | 97.2 | 30 | | |

| | | | | | |
|----------|-------|-------|----|------|-----|
| | | 109.2 | 29 | | |
| Фипронил | 434.8 | 183.0 | 40 | 4.85 | -45 |
| | | 250.0 | 28 | | |
| | | 329.9 | 19 | | |

Для проведения количественных измерений готовили серию градуировочных растворов в холостых пробах мочи с содержанием аналитов 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 и 50 нг/мл. Кроме того, для получения корректных результатов количественных измерений перед проведением ТФЭ в пробы мочи вносили внутренние стандарты. Фипронил применялся для всех аналитов, кроме лаксогенина, имеющего стероидную структуру. Для него в качестве внутреннего стандарта использовали метилтестостерон. Содержание внутренних стандартов во всех образцах было постоянно и составило 5 нг/мл.

Градуировочные растворы подвергали процедуре твердофазной экстракции с использованием различных патронов. Для каждого из патронов строили по 3 калибровочные кривые, все точки которых получали в результате 2-х параллельных определений. Для оценки матричных влияний в тех же условиях анализировали градуировочные растворы, приготовленные путем внесения аналитов не в мочу, а деионизованную воду.

При оптимизации условий твердофазной экстракции было установлено, что прокок определяемых веществ не наблюдается при загрузке образцов до объема 3 мл на всех исследуемых патронах при содержании аналитов в образцах не более 100 нг/мл. Для промывки всех патронов в качестве оптимальной была выбрана смесь метанол: вода (5:95, по объему). При использовании растворов, содержащих больше 5 об. % метанола, наблюдался прокок аналитов при промывке.

В таблица 65 представлены результаты эксперимента по оптимизации объема для элюирования аналитов. Как видно, 0.5 мл метанола достаточно для количественного извлечения целевых соединений с патронов.

Таблица 65 – Степень извлечения аналитов с патронов для ТФЭ (концентрации аналитов 10 нг/мл)

| Патрон | Аналит | Степень извлечения (%) при указанных объемах элюента (n = 6) | | |
|--------|------------|--|----------|----------|
| | | 0.5 мл | 1.0 мл | 1.5 мл |
| С8 | Андарин | 97 ± 6 | 98 ± 7 | 98 ± 7 |
| | Ибутаморен | 99 ± 10 | 100 ± 10 | 100 ± 10 |
| | Лаксогенин | 111 ± 12 | 111 ± 12 | 111 ± 12 |
| | Лигандрол | 106 ± 9 | 106 ± 9 | 106 ± 9 |
| | Остарин | 107 ± 9 | 107 ± 10 | 107 ± 10 |
| С18 | Андарин | 94 ± 9 | 96 ± 9 | 96 ± 9 |
| | Ибутаморен | 109 ± 12 | 112 ± 14 | 113 ± 15 |
| | Лаксогенин | 112 ± 12 | 115 ± 16 | 115 ± 16 |
| | Лигандрол | 108 ± 11 | 108 ± 11 | 108 ± 11 |
| | Остарин | 102 ± 9 | 105 ± 10 | 106 ± 10 |
| HLB | Андарин | 105 ± 6 | 106 ± 7 | 107 ± 7 |
| | Ибутаморен | 104 ± 15 | 114 ± 16 | 114 ± 16 |
| | Лаксогенин | 115 ± 16 | 115 ± 16 | 115 ± 16 |
| | Лигандрол | 112 ± 14 | 112 ± 14 | 112 ± 14 |
| | Остарин | 109 ± 11 | 111 ± 12 | 111 ± 12 |

В условиях проведения хроматомасс-спектрометрического анализа отсутствовали пики компонентов, мешающие определению целевых аналитов. Это свидетельствует о том, что выбранные условия отвечают требованиям селективности и компоненты матрицы мочи не оказывают мешающего влияния при поведении анализа. Предел обнаружения находили как минимальное обнаруживаемое содержание аналита (при соотношении сигнал:шум 3:1) в моче. Предел определения соответствует минимальному содержанию аналита, определяемому с погрешностью менее 15 %. Пределы обнаружения и определения

аналитов, наряду с линейным диапазоном, устанавливали путем анализа градуировочных растворов.

Матричные эффекты (МЕ) оценивали сопоставлением аналитических сигналов, полученных в модельных растворах и образцах мочи, и рассчитывали по формуле

$$ME (\%) = (A/B) \times 100\%,$$

где А – площадь пика аналита в матричном растворе,

В – площадь пика аналита в модельном растворе.

Полученные аналитические характеристики методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов сведены в таблица 66. Как видно, использование патрона Oasis HLB является наиболее оптимальным, хотя использование остальных патронов также дает удовлетворительные результаты. Полученные результаты могут быть связаны с близким, гидрофобным, механизмом удерживания аналитов при использовании исследуемых патронов.

Таблица 66 – Аналитические характеристики методики определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов

| Патрон | Аналит | Предел обнаружения, нг/мл | Предел определения, нг/мл | Линейный диапазон, нг/мл | R^2 | Матричные эффекты, % |
|--------|------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-------|----------------------|
| С8 | Андарин | 0.5 | 1 | 1–50 | 0.999 | 89 ± 10 |
| | Ибутаморен | 0.5 | 1 | 1–50 | 0.999 | 104 ± 6 |
| | Лаксогенин | 0.25 | 1 | 1–50 | 0.996 | 108 ± 8 |
| | Лигандрол | 0.5 | 2.5 | 2.5–50 | 0.999 | 105 ± 7 |
| | Остарин | 0.1 | 0.5 | 0.5–25 | 0.998 | 92 ± 8 |
| С18 | Андарин | 0.5 | 1 | 1–50 | 0.999 | 90 ± 10 |
| | Ибутаморен | 0.5 | 1 | 1–50 | 0.998 | 109 ± 8 |
| | Лаксогенин | 0.5 | 1 | 1–50 | 0.997 | 112 ± 12 |
| | Лигандрол | 0.5 | 2.5 | 2.5–50 | 0.999 | 110 ± 11 |
| | Остарин | 0.1 | 0.5 | 0.5–25 | 0.998 | 94 ± 8 |

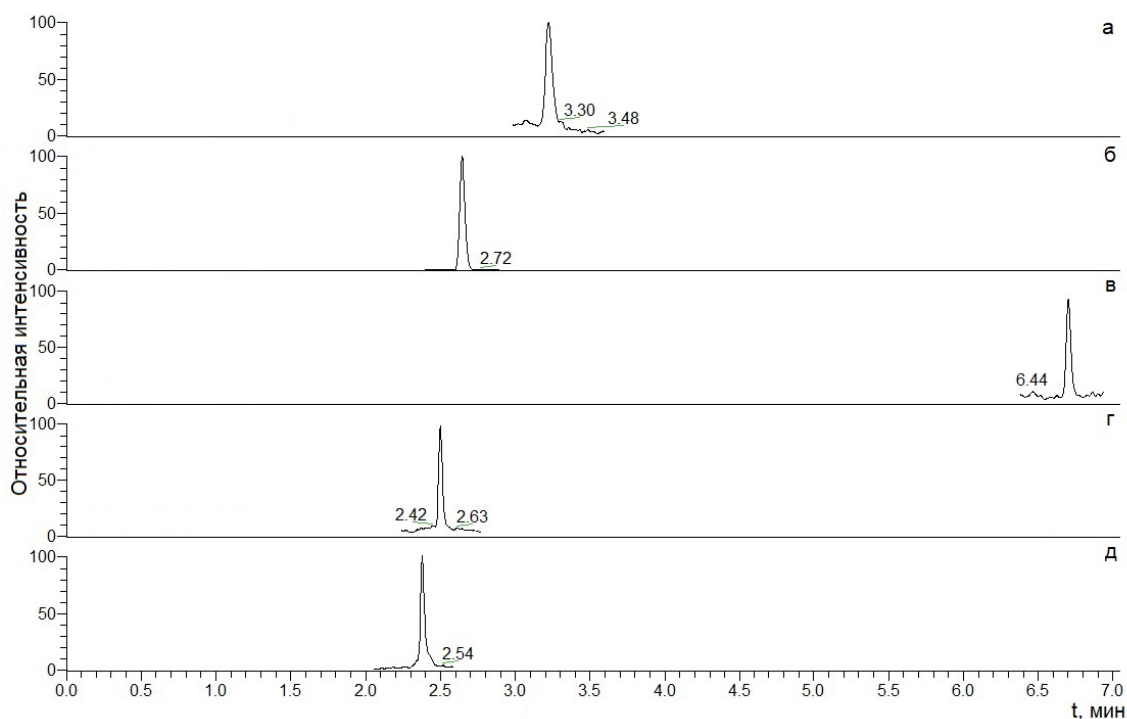
| | | | | | | |
|-----|------------|------|-----|--------|-------|----------|
| HLB | Андарин | 0.5 | 2.5 | 2.5–50 | 0.999 | 95 ± 6 |
| | Ибутаморен | 0.25 | 0.5 | 0.5–50 | 0.999 | 105 ± 7 |
| | Лаксогенин | 0.25 | 1 | 1–50 | 0.997 | 113 ± 12 |
| | Лигандрол | 0.5 | 2.5 | 2.5–50 | 0.999 | 101 ± 6 |
| | Остарин | 0.1 | 0.5 | 0.5–25 | 0.998 | 94 ± 7 |

Для оценки правильности и воспроизводимости результатов анализа готовили тестовые растворы с содержанием аналитов, соответствующим нижней, средней и верхней областям линейного диапазона концентраций. Анализ растворов проводили в течение одного дня и в различные дни. Полученные результаты при использовании патрона Oasis HLB в методике представлены в таблица 67.

Таблица 67 – Валидационные характеристики методики при использовании патрона Oasis HLB (n = 18)

| Аналит | Введено, нг/мл | В один день | | | В разные дни | | |
|------------|-------------------|----------------|-----------------|---------------------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| | | Найдено, нг/мл | Правильность, % | Воспроизводи- мость, % | Найдено, нг/мл | Правильность, % | Воспроизводи- мость, % |
| Андарин | 5 | 5.2±0.6 | 2.9 | 9.3 | 5.3±0.2 | 6.0 | 14.1 |
| | 10 | 9.9±0.4 | -0.8 | 3.5 | 10±1 | 1.2 | 12.1 |
| | 25 | 25±1 | 1.5 | 2.7 | 26±3 | 2.5 | 14.2 |
| Ибутаморен | 2.5 | 2.5±0.1 | -1.6 | 3.8 | 2.4±0.3 | -4.6 | 14.4 |
| | 10 | 9.8±0.3 | -1.5 | 3.0 | 10±1 | -2.5 | 12.9 |
| | 25 | 25±1 | 1.0 | 2.5 | 25±3 | 0.7 | 14.3 |
| Лаксогенин | 2.5 | 2.5±0.4 | 2.0 | 14.3 | 2.4±0.2 | -4.9 | 9.7 |
| | 10 | 10.2±0.8 | 1.8 | 7.9 | 10±1 | 0.1 | 10.3 |
| | 25 | 24±1 | -3.7 | 4.7 | 24±2 | -4.3 | 9.0 |
| Лигандрол | 5 | 5.1±0.3 | 1.8 | 6.8 | 5.2±0.4 | 3.1 | 8.7 |
| | 10 | 9.9±0.3 | -1.1 | 3.1 | 10±1 | 0.0 | 14.8 |
| | 25 | 25±1 | 0.9 | 3.0 | 25±3 | 1.5 | 14.7 |
| Остарин | 1 | 0.89±0.09 | -8.9 | 12.6 | 1.14±0.09 | 9.5 | 14.2 |
| | 5 | 5.2±0.2 | 5.0 | 4.6 | 5.5±0.2 | 4.5 | 11.3 |
| | 10 | 10.4 ± 0.1 | 4.4 | 1.4 | 10.7±0.7 | 8.1 | 7.7 |

С использованием предложенной методики были проанализированы образцы мочи, полученные от добровольцев спустя 12 часов после употребления 15 мг действующего вещества. При проведении анализа установили, что содержания андарина, остарина, лигандрола и лаксогенина в моче добровольцев находятся в линейном диапазоне градуировочных зависимостей, в то время как для образца, содержащего ибутаморен, требуется 20-кратное разбавление для попадания в линейный диапазон (рисунок 63).



а – андарин, б – ибутаморен, в – лаксогенин, г – лигандрол, д – остарин
Рисунок 63 – Хроматограммы проб мочи после однократного перорального
употребления 15 мг действующего вещества

2.12 Определение стероидных гормонов в моче с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции

Дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция (DLLME) – относительно новый метод пробоподготовки, главным преимуществом которого является возможность работы с малыми количествами проб и экстрагента. Учитывая общемировую тенденцию перехода к процессам, отвечающей требованиям «зеленой химии», DLLME довольно быстро стала конкурировать с классической ЖЖЭ для решения ряда аналитических задач.

Однако далеко не всегда данный метод способен полностью заместить классические процедуры пробоподготовки. Зачастую это связано с ограниченной емкостью и крайне малыми объемами экстрагента, в ряде случаев это обусловлено также и малыми коэффициентами распределения, что при использовании ЖЖЭ частично компенсировалось большими объемами экстрагента. В случае DLLME также важно подобрать подходящий диспергент, способный быстро растворяться не только в экстрагенте, но и среде, из которой будет осуществляться экстракция. В этих целях чаще всего используют ацетон, метанол и ацетонитрил. В качестве экстрагента зачастую используют хлорированные растворители, т.к. их плотность достаточно высока и они не смешиваются с водой (если экстракция идет из водных сред). Подобная поливариантность, а также необходимость учета влияния матрицы, способны существенно замедлить процесс оптимизации эксперимента, что делает целесообразным использование статистических подходов, таких как центрально-композиционный план и план Бокса-Бенкена, позволяющие варьировать сразу несколько показателей одновременно [614].

Для проведения исследований по определению стероидных гормонов в моче с использованием дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции готовили стандартный раствор аналитов, содержащий 17 α -эстрадиол, эстриол, эстрон, тестостерон, дигидротестостерон, кортизон, кортизол,

прогестерон и 11 α -гидроксипрогестерон с концентрацией 1 мг/мл в метаноле. Затем на их основе готовили рабочие растворы с концентрациями 7.5, 15, 30, 75, 150, 300, 750, 1500, 3000, 7500 и 15000 нг/мл в смеси воды и метанола (50:50, v;v).

Контроль правильности, точности и воспроизводимости результатов осуществляли с использованием растворов контроля качества (РКК) с концентрациями 750 (LLOQ), 1500 (QC low), 3000 (QC medium) и 15000 нг/мл (QC high). Среди факторов, способных оказывать влияние на получаемые результаты, нами были выбраны такие основные переменные, как рН среды, из которой проводилась экстракция, влияние солевого фона, количество экстрагента, диспергента, растворители, способные исполнять роль экстрагента и диспергента, время ферментативного гидролиза и время экстракции.

Ацетатные буферные растворы с рН 4–6 готовили путем смешивания 1 М уксусной кислоты 1 М раствора гидроксида натрия. Фосфатные буферные растворы с рН 7 и 8 готовили путем смешивания 0.067 М растворы гидрофосфата натрия и гидрофосфата калия в различных соотношениях. Боратные буферные растворы с рН 9 путем смешивания 0.05 М раствор тетрабората натрия и 0.1 М раствора соляной кислоты, а растворы с рН 10 и 11 готовили путем смешивания тетрабората натрия и 0.1 М раствора гидроксида натрия в различных соотношениях.

Для учета влияния варьируемых параметров внутренние стандарты (метилтестостерон, d3-тестостерон и d3-эпитестостероны), используемые в этом исследовании, вводили в исследуемые пробы перед началом пробоподготовки. Необходимость применения нескольких внутренних стандартов обусловлена тем, что метилтестостерон хоть и подобен по структуре анализам, но может испытывать отличающиеся матричные эффекты, что требует сопоставления результатов также и с использованием изотопно-меченных стандартов.

Согласно процедуре оптимизации с использованием плана Бокса-Бенкена, количество экспериментов, необходимых для проведения вычисляли согласно следующему уравнению:

$$N = 2k \times (k-1) + C_p,$$

где k – это количество факторов, принимаемых во внимание при оптимизации эксперимента;

C_p – количество центральных точек при оптимизации.

При проведении оптимизации также принимали во внимание необходимость использования минимум трех значений (-1; 0; +1) для каждого значимого фактора в оптимизации эксперимента (таблица 68).

Таблица 68 – Факторы и их уровни значений, используемые для оптимизации эксперимента

| Фактор | Значение уровня | | |
|------------------------------|-----------------|-----|------|
| | -1 | 0 | +1 |
| Объем диспергента, мкл | 600 | 850 | 1100 |
| Объем экстрагента, мкл | 100 | 150 | 200 |
| Содержание хлорида натрия, % | 0 | 5 | 10 |
| Время перемешивания, сек | 5 | 15 | 30 |

Поскольку стероидные гормоны выводятся из организма преимущественно в конъюгированной форме, при их определении зачастую используют стадию деконъюгации. Без её применения извлечение аналитов из мочи становится возможным только с помощью твердофазной экстракции.

В отличие от ряда ксенобиотиков, стероиды разрушаются при длительной экспозиции в среде минеральных кислот и нагревании, что может привести к искажениям получаемых результатов и полной деградации пробы. Ферментативный гидролиз, протекающий при значительно меньших температурах, может осуществляться двумя разными способами – с использованием глюкуронидазы кишечной палочки и глюкуронидазы виноградной улитки.

Последний фермент, помимо β -глюкуронидазы, содержит также арилсульфатазу, способную расщеплять сульфатные конъюагты. В процессе проведения исследования было установлено, что оба фермента одинаково эффективны в отношении исследуемых веществ и в дальнейших экспериментах использовали β -глюкуронидазу кишечной палочки в целях унификации с остальными предлагаемыми методиками.

Для деконъюгирования использовали температуры 50 и 55 °С, так как в этих условиях требуется меньше времени для полного протекания процесса, а наибольшая эффективность дальнейшей экстракции достигается при рН 9 (рисунок 64).

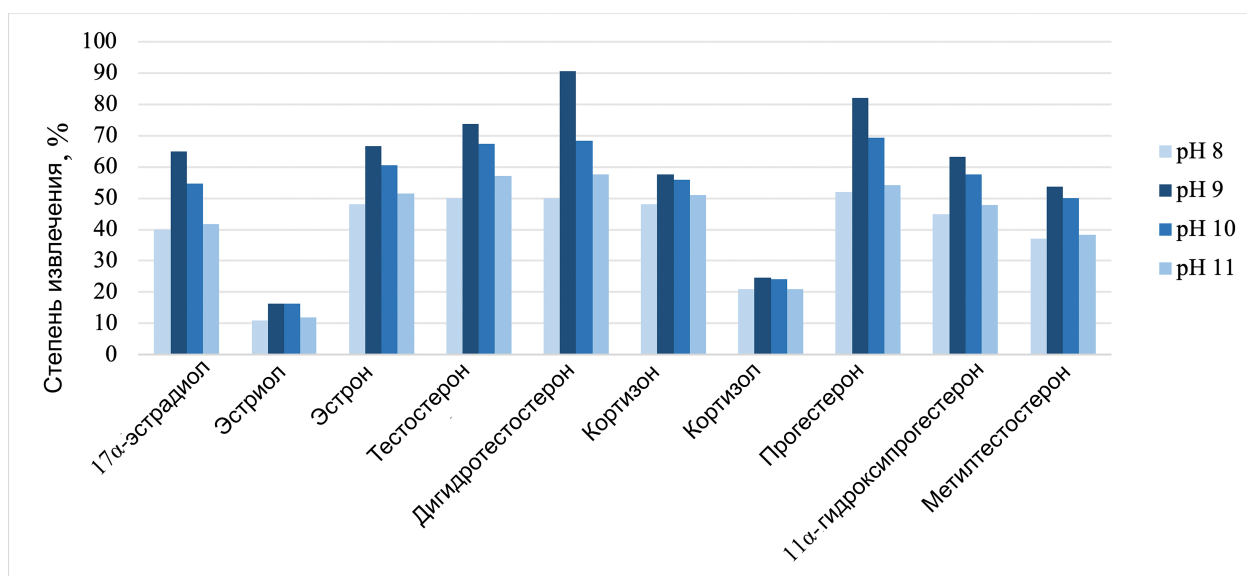


Рисунок 64 – Эффективность извлечения стероидных гормонов при различных значениях рН

В процессе оптимизации установили, что оптимальное содержание хлорида натрия в пробе составляет 5% и эффективность извлечения кортизона, гидрокортизона и эстрогена больше всего зависит от его концентрации.

Были установлены оптимальные условия пробоподготовки: в фалькон объемом 10 мл вводили 1 мл фосфатного буфера с рН 6.5, содержащего β -глюкуронидазу кишечной палочки, аликоту мочи объемом 3 мл, проводили инкубирование при 50 °С, затем охлаждали до комнатной температуры, вводили 1 мл буфера с рН 9 и 150 мг хлорида натрия. В полученную пробу быстро

вводили смесь, содержащую 1.1 мл диспергента (ацетонитрила) и 150 мкл экстрагента (хлороформа). Проба затем помещалась на 15 секунд на ворткс, центрифугировали 10 мин при 4000 об./мин, отбирали хлороформный слой, высушивали его в токе азота и перерастворяли в 100 мкл в смеси воды и метанола (1:1, v:v) для последующего анализа с использованием УВЭЖХ-МСВР.

Отработку условий подготовки проб проводили с использованием синтетической мочи, в состав которой входили мочевины, сульфат, хлорид, фосфат и оксалат натрия, поскольку любой реальный образец мочи будет содержать эндогенные стероиды.

Условия разделения и детектирования представлены в таблица 69 и 70

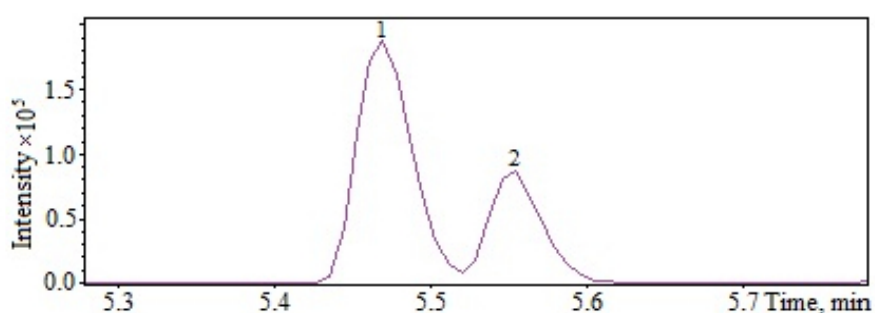
Таблица 69 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | Метанол, содержащий 0.1% муравьиной кислоты, % | 0.1% р-р муравьиной кислоты в воде, % |
|------------|--|---------------------------------------|
| 0.00 | 5 | 95 |
| 1.00 | 5 | 95 |
| 2.70 | 60 | 40 |
| 4.00 | 60 | 40 |
| 5.00 | 90 | 10 |
| 7.50 | 90 | 10 |
| 7.51 | 5 | 95 |
| 9.00 | 5 | 95 |

Таблица 70 – Условия масс-спектрометрического детектирования

| Параметр | Значение |
|---|----------|
| Температура ионного источника, °С | 250 |
| Напряжение на капилляре, В | 4000 |
| Напряжение на экстрагирующей линзе, В | 500 |
| Давление газа-распылителя (азота), кПа | 100 |
| Поток газа-осушителя, л/мин | 5 |
| Скорость сканирования, Гц | 3 |
| Диапазон сканирования масс, m/z | 150–1000 |
| Давление газа-мишени в ячейке соударений (азота), мТорр | 1.5 |

Поскольку содержание стероидов в моче может варьироваться в широких пределах, разрабатываемый подход должен позволять определять физиологически и диагностически значимые концентрации. Предлагаемая методика DLLME извлечения с последующим УВЭЖХ-МСВР определением позволяет достичь предела детектирования на уровне от 0.25–10 нг/мл, что полностью перекрывает значимые диапазоны концентраций и сохраняет возможность проведения нецелевого скрининга. Кроме того, описанные условия позволяют эффективно разделять тестостерон и его эпимер – эпитестостерон (рисунок 65), что является немаловажным при осуществлении допинг-контроля, где соотношение Т/Е является диагностически важным [615].



1 – тестостерон, 2 – эпитестостерон

Рисунок 65 – Хроматограмма пробы мочи по выделенному иону с m/z 289.2162

Помимо чувствительности определения аналита немаловажным фактором является также и предел обнаружения, линейный диапазон, правильность, точность и стабильность получаемых результатов (таблица 71 и 72)

Таблица 71 – Некоторые аналитические характеристики методики

| Аналит | Предел детектирования, нг/мл | Предел обнаружения, нг/мл | Линейный диапазон, нг/мл | R ² |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------|
| 17 α -эстрадиол | 10 | 50 | 50–500 | 0.996 |
| Эстриол | 10 | 50 | 50–500 | 0.996 |
| Эстрон | 10 | 50 | 50–500 | 0.995 |
| Тестостерон | 0.25 | 1.0 | 1.0–500 | 0.998 |

| | | | | |
|----------------------------------|------|-----|---------|-------|
| Дигидротестостерон | 0.5 | 2.5 | 2.5–500 | 0.998 |
| Кортизон | 0.25 | 1.0 | 1.0–500 | 0.998 |
| Кортизол | 0.25 | 1.0 | 1.0–500 | 0.997 |
| Прогестерон | 0.5 | 2.5 | 2.5–500 | 0.997 |
| 11 α -гидроксиандростерон | 0.5 | 2.5 | 2.5–500 | 0.997 |

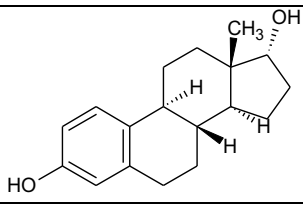
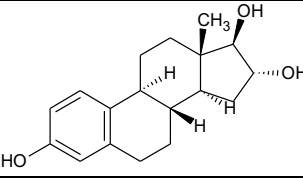
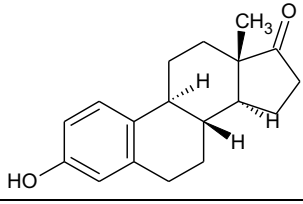
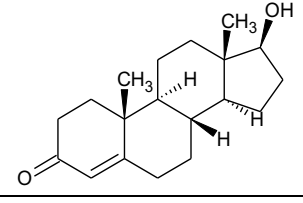
Таблица 72 – Некоторые валидационные характеристики методики

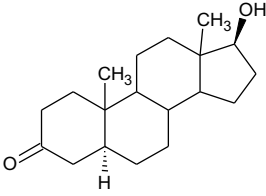
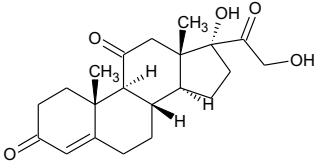
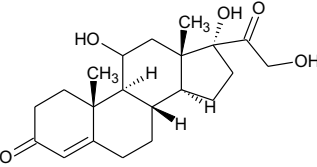
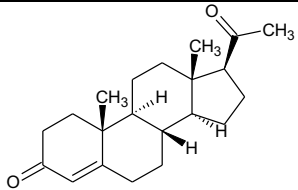
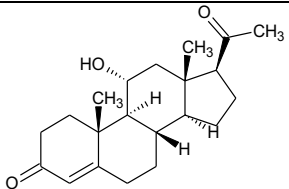
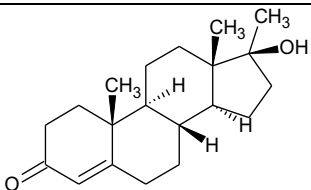
| Аналит | РКК, нг/мл | В один день | | Между днями | |
|------------------------|---------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| | | Точность, % | Воспроизводимость, % | Точность, % | Воспроизводимость, % |
| 17 α -эстрадиол | 25 | -19.1 | 14.4 | -19.5 | 19.6 |
| | 50 | -14.3 | 11.3 | -14.4 | 14.5 |
| | 100 | -8.9 | 9.7 | -9.3 | 12.1 |
| | 500 | 1.2 | 7.6 | 1.1 | 13.3 |
| Эстриол | 25 | -16.5 | 16.2 | -16.1 | 19.8 |
| | 50 | -10.8 | 11.1 | -10.2 | 10.9 |
| | 100 | -5.0 | 8.8 | -4.0 | 9.0 |
| | 500 | -0.9 | 7.6 | 1.4 | 8.9 |
| Эстрон | 25 | -15.1 | 17.8 | -17.2 | 18.2 |
| | 50 | -13.6 | 11.2 | -14.2 | 14.2 |
| | 100 | -5.5 | 6.6 | -6.9 | 7.8 |
| | 500 | 2.3 | 4.2 | -1.2 | 5.6 |
| Тестостерон | 0.5 | -11.2 | 13.7 | -14.8 | 15.5 |
| | 50 | -6.2 | 10.2 | -7.1 | 13.5 |
| | 100 | 3.7 | 4.4 | 1.2 | 4.3 |
| | 500 | 2.9 | 2.3 | 3.2 | 1.3 |
| Дигидротестостерон | 1.0 | -11.6 | 13.4 | -13.2 | 16.9 |
| | 50 | -7.2 | 10.3 | -7.5 | 11.3 |
| | 100 | 3.5 | 5.4 | 3.7 | 6.7 |
| | 500 | 2.6 | 1.1 | 3.0 | 2.4 |
| Кортизон | 0.5 | -13.9 | 14.4 | -14.7 | 16.3 |
| | 50 | -6.4 | 10.9 | -6.8 | 10.6 |
| | 100 | 2.0 | 3.7 | 3.2 | 4.7 |
| | 500 | 2.5 | 0.9 | 1.9 | 2.2 |
| Кортизол | 0.5 | -14.5 | 15.1 | -15.2 | 16.1 |
| | 50 | -6.6 | 9.9 | -6.8 | 10.3 |
| | 100 | -1.1 | 3.5 | 2.4 | 4.2 |
| | 500 | 0.7 | 1.2 | 1.7 | 1.3 |
| Прогестерон | 1.0 | -13.2 | 15.9 | -16.1 | 18.4 |

| | | | | | |
|---------------------------------------|-----|-------|------|-------|------|
| | 50 | -9.8 | 11.8 | -8.7 | 12.7 |
| | 100 | 1.4 | 6.6 | 1.7 | 8.1 |
| | 500 | 2.5 | 5.3 | 1.1 | 6.1 |
| 11 α -гидрокси- прогестерон | 1.0 | -15.6 | 18.2 | -14.8 | 17.6 |
| | 50 | -4.4 | 10.6 | -5.8 | 11.2 |
| | 100 | 1.6 | 7.3 | 3.3 | 7.7 |
| | 500 | 4.3 | 5.7 | 0.8 | 5.8 |

Поскольку для выполнения работы использовалась масс-спектрометрия высокого разрешения, селективность анализа контролировали также и по ошибке определения масс. Согласно рекомендациям FDA при сканировании полного ионного тока ионов-прекурсоров ошибка определения масс не должна превышать 5 ppm, в то время как в режиме сканирования ионов-продуктов – не более 10 ppm. Результаты, полученные в ходе эксперимента, представлены в таблица 73.

Таблица 73 – Структуры, времена удерживания и регистрируемые массы аналито

| Аналит | Структурная формула | Время удерживания, мин | [M+H] ⁺ , Да | Ошибка определения масс, ppm |
|------------------------|---|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 17 α -эстрадиол |  | 5.3 | 273.1849 | 4.2 |
| Эстриол |  | 4.0 | 289.1798 | 3.8 |
| Эстрон |  | 4.4 | 271.1693 | 3.9 |
| Тестостерон |  | 5.4 | 289.2162 | 3.8 |

| | | | | |
|----------------------------------|---|-----|----------|-----|
| Дигидротестостерон |  | 5.8 | 291.2319 | 4.1 |
| Кортизон |  | 4.1 | 361.2010 | 3.0 |
| Кортизол |  | 4.2 | 363.2166 | 3.0 |
| Прогестерон |  | 5.9 | 315.2319 | 4.4 |
| 11 α -гидроксипрогестерон |  | 4.9 | 331.2268 | 2.7 |
| Метилтестостерон |  | 5.6 | 303.2319 | 4.3 |

Принимая во внимание особенность времяпролетного масс-анализатора для достижения большей точности калибровка шкалы масс осуществляли в начале каждого анализа. Для этого раствор формиата натрия подавался вспомогательным насосом и через вспомогательный кран-дозатор заполнял дозирующую петлю объемом 10 мкл, после чего происходило переключение крана и подача калибранта с подвижной фазой на источник ионизации. Одновременно с этим, компоненты, элюирующиеся в мертвом объеме, сбрасывались в слив через тот же кран-дозатор. В случае матрицы мочи такими компонентами преимущественно являлись аминокислоты, мочевины и растворенные соли, что также способствовало уменьшению загрязнения ионной оптики масс-спектрометра.

Не менее важным аспектом в проведенном исследовании являлась стабильность аналитов в образцах. При проведении потокового анализа пробы биологических жидкостей могут начать деградировать еще до анализа, что делает актуальным изучение стабильности образцов как после их приготовления, так и повторной разморозке (в случае возникновения спорных результатов). В результате было установлено, что при хранении проб в термостатируемом автосамплере при 5 °С, полученные пробы стабильны 48 ч, а исходные образцы мочи могут размораживаться для анализа только дважды, после этого проба значительно деградирует и получаемые результаты отличаются от истинного более, чем на 15%.

2.13 Применение твердофазной аналитической дериватизации для определения катехоламинов в моче

Ранее уже обсуждались основные методы определения катехоламинов в биологических жидкостях. Однако в случае необходимости одновременной очистки образца и его дериватизации, время, затрачиваемое на пробоподготовку, становится неудовлетворительным. Поэтому мы провели исследования по разработке схемы определения катехоламинов, включающую экспрессную и простую пробоподготовку и высокую чувствительность определения аналита [616, 617].

Решением данной проблемы стала возможность сочетания концентрирования и дериватизации аналита. Эффективное извлечение катехоламинов из мочи стало возможным с использованием катионообменных сорбентов (Biotage Isolute SCX 100 мг), которые предварительно кондиционируются и активируются для обеспечения эффективной сорбции аналита из матрицы с использованием 1 мл метанола и 1% раствора муравьиной кислоты в воде. После этого аликвоту мочи объемом 1 мл пропускали через патрон и загружали 500 мкл боратного буфера (pH 9.5) и 500 мкл дериватирующего агента FMOС-Cl, затем патрон оставляли при комнатной температуре на 20 мин для протекания реакции. Полученные дериваты смывали 1 мл 5% раствором ацетата аммония, элюат собирали в стеклянные вials для дальнейшего анализа.

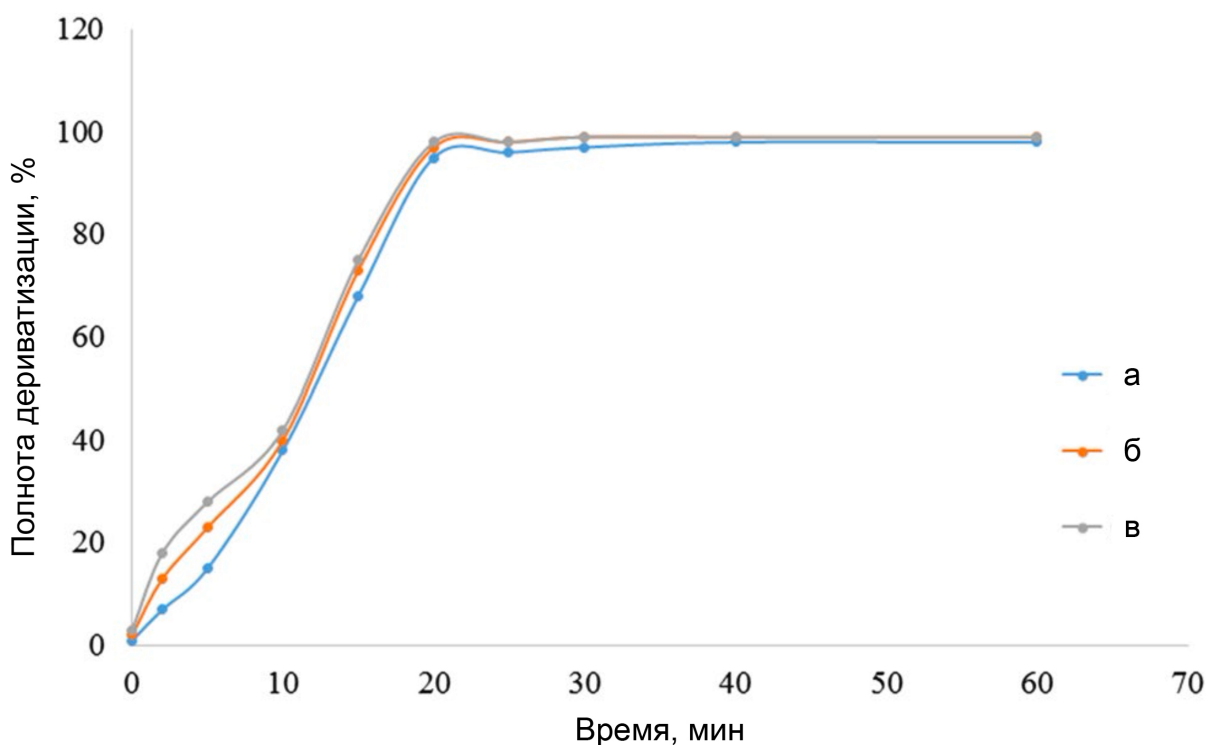
Пробоподготовка в этом случае основывается на принципе твердофазной аналитической дериватизации. При этом сам сорбент не подвергается модификации, а избыток дериватирующего агента ускоряет протекание реакции. В случае, когда сам сорбент имеет определенную буферную емкость, её также можно использовать для того, чтобы катализировать процесс.

Модификация катехоламинов на поверхности сорбента SCX несколько осложняется тем, что для протекания реакции необходима загрузка не только самого агента, но и буры, которая способна частично (или полностью, в

зависимости от объема) элюировать аналиты с патрона, обеспечив тем самым проскок.

Применение катионообменного сорбента имеет еще одно преимущество по сравнению с другими видами сорбентов: поскольку элюирование осуществляется водным раствором, уширения пика из-за присутствия большого количества органической фазы в пробе не происходит, а растворенные в пробе соли также не удерживаются на сорбенте во время загрузки пробы.

Затем устанавливали времени протекания твердофазной аналитической дериватизации. Для этого аналиты элюировали с патрона спустя 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 и 60 минут после начала реакции (рисунок 66).



а – FMOC-адреналин, б – FMOC-октопамин, в – FMOC-допамин

Рисунок 66 – Зависимость полноты дериватизации от времени реакции

Как видно, оптимальное время дериватизации в описанных условиях составляет 20 мин, в течение которого реакция протекает количественно. Контроль полноты протекания реакции осуществлялся не только путем мониторинга содержания производных, но и оценки присутствия немодифицированных катехоламинов. Помимо увеличения эффективности ионизации,

дериватизация необходима для улучшения удерживания в режиме ОФ-ВЭЖХ и увеличения массы аналита – при анализе низких масс зачастую значительно возрастают химические шумы, что негативно сказывается на точности и чувствительности (таблица 74).

Таблица 74 – Ионы-прекурсоры и ионы-продукты при определении катехоламинов и их производных

| Вещество | t_R , мин | Ион-прекурсор, m/z | Ион-продукт, m/z | Энергия соударений, eV |
|-----------------------|-------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| Не дериватизированные | | | | |
| Адреналин | 0.54 | 166.2* | 107.1;77.2;135.0 | 19;33;14 |
| Допамин | 0.52 | 154.1 | 137.1;91.0 | 6;30 |
| Октопамин | 0.64 | 136.2* | 91.2;65.3;119.2 | 17;31;11 |
| Дериватизированные | | | | |
| FMOC-адреналин | 2.54 | 388.2 | 210.0;166.0;178.0 | 10;20;35 |
| FMOC-допамин | 2.56 | 376.2 | 179.0;137.2;91.0 | 15;20;40 |
| FMOC-октопамин | 2.70 | 358.0 | 154.0;179.0;198.0 | 15;30;10 |

После оптимизации условий подготовки требовалось провести валидацию методики для оценки её отдельных метрологических характеристик (таблица 75).

Таблица 75 – Некоторые метрологические характеристики предложенной методики определения катехоламинов и их производных*

| Вещество | E, % | Линейность | | РКК (нг/мл) | Точность (%) | | Воспроизводимость (%) | | Предел детектирования (нг/мл) |
|----------------|------|------------|---|-------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|-------------------------------|
| | | r^2 | n | | В один день | В разные дни | В один день | В разные дни | |
| FMOC-адреналин | 106 | 0.996 | 3 | 10 | -7.9 | -10.1 | 11.5 | 14.8 | 2.5 |
| | | | | 100 | 3.5 | 3.9 | 7.4 | 11.6 | |
| | | | | 500 | 1.1 | 1.5 | 5.5 | 8.1 | |
| FMOC-допамин | 86 | 0.993 | | 25 | 13.1 | 14.2 | 9.3 | 13.2 | 25 |
| | | | | 100 | 5.6 | 5.9 | 6.2 | 9.9 | |
| | | | | 500 | 2.3 | 3.1 | 2.1 | 4.1 | |
| FMOC-октопамин | 87 | 0.996 | | 10 | 11.7 | 13.2 | 8.8 | 13.5 | 5 |
| | | | | 100 | 6.5 | 9.4 | 4.6 | 9.7 | |
| | | | | 500 | 2.1 | 3.4 | 4.5 | 9.5 | |

*E – полнота дериватизации

Оценка полноты дериватизации осуществлялась по следующему уравнению:

$$E(\%) = \frac{S_{\text{после дериватизации на патроне}}}{S_{\text{после дериватизации в растворе}}} \times 100\%,$$

где S – соответствующие площади пиков.

Предложенная методика позволяет совместить одновременную очистку и дериватизацию образцов, а при увеличении емкости сорбента, возможно также и дополнительное концентрирование аналита в случае недостаточной чувствительности анализа.

2.14 Определение некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях с использованием методов целевого и нецелевого скрининга

В отличие от объектов криминалистических экспертиз, биожидкости обладают достаточно сложной матрицей, которая способна как гасить ионизацию аналитов, так и способствовать её усилению. Поэтому для корректного определения некоторых наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях требуется разработка оригинальных методов целевого и нецелевого скрининга. Для исследований использовали метод УВЭЖХ-МС/МС, позволяющий проводить экспрессное определение с минимальной пробоподготовкой таких образцов, как моча и кровь в условиях, описанных выше [618–620].

Так как отбор проб мочи является неинвазивной и стандартной процедурой при проведении химико-токсикологических исследований, они представляли наибольший интерес. Пробы мочи людей, употреблявших наркотические и психоактивные вещества, предоставлены наркодиспансером г. Краснодара. Полученные пробы принадлежали мужчинам и женщинам в возрасте от 20 до 45 лет.

Так как синтетические каннабиноиды практически полностью метаболизируют в организме, в моче определяют их метаболиты, которые, в зависимости от пробоподготовки, будут либо в форме конъюгатов (без минерального или ферментативного гидролиза), либо в свободной форме. А большинство стимуляторов могут быть обнаружены в моче как в виде метаболитов, так и в виде нативных веществ.

Наиболее простой процедурой подготовки проб к анализу является разбавление пробы и её анализ. В этом случае не происходит потерь аналитов, но возможно определение только конъюгированных форм метаболитов, однако данный способ пригоден для определения нативных веществ (рисунок 67).

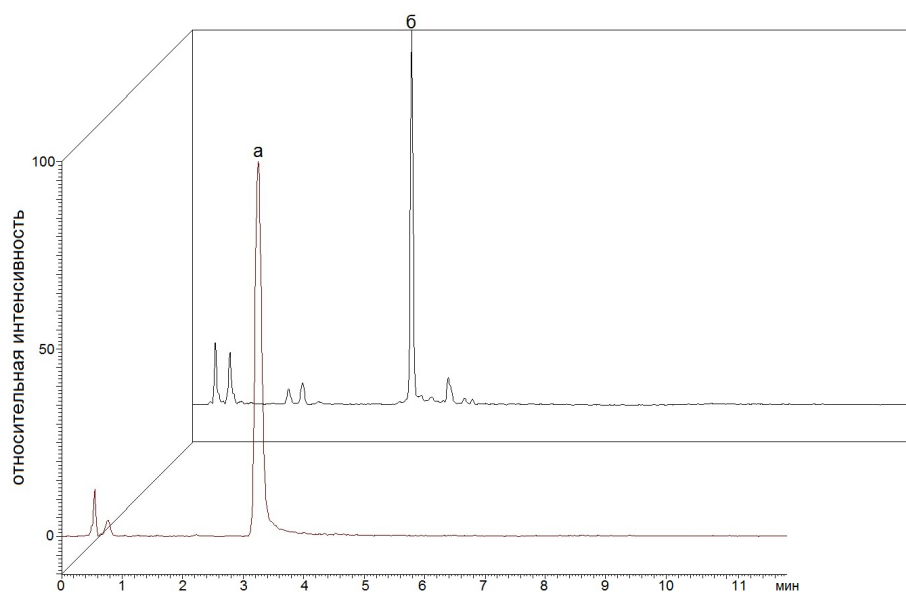


Рисунок 67 – Хроматограмма образца мочи, содержащей α -PVP (a) и MDPV (б)

С другой стороны, подобный способ не позволяет очистить пробу, что приводит к достаточно быстрому выходу из строя колонки. Обеспечить более полную очистку проб можно с использованием ТФЭ или минерального гидролиза, разрушающего ряд высокомолекулярных соединений. При этом необходимо учитывать, что на некоторые соединения минеральный гидролиз может оказать негативное влияние (например, тропановые алкалоиды могут гидролизаться).

Несмотря на то, что ферментативный гидролиз является более мягким и экспрессным способом подготовки проб для определения не только нативных стимуляторов, но и их метаболитов, предпочтительным является применение минерального гидролиза, как более доступного и простого способа подготовки проб, кроме этого минеральный гидролиз обеспечивает большую чистоту получаемых проб. Применение гидролиза позволяет также определять не только нативные стимуляторы, но и их метаболиты (рисунок 68, 69)

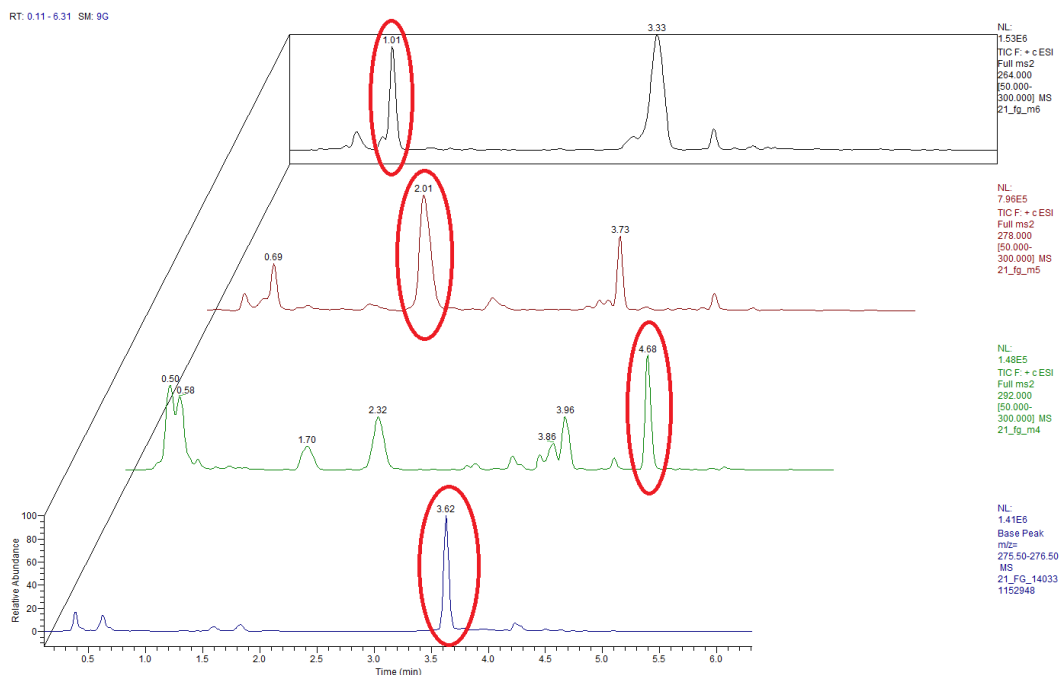
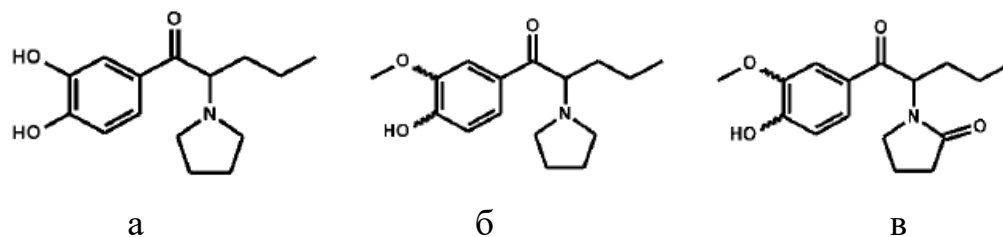


Рисунок 68 – Одновременное определение MDPV и некоторых его метаболитов в моче



а – MDPV-М (деметил-); б – MDPV-М (деметил-метил-); в – MDPV-М (деметил-метил-окси)

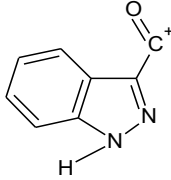
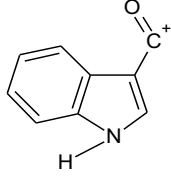
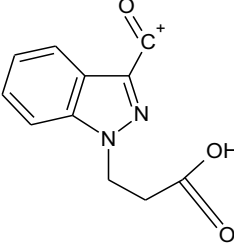
Рисунок 69 – Структурные формулы метаболитов MDPV

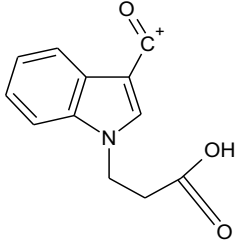
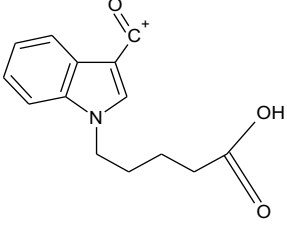
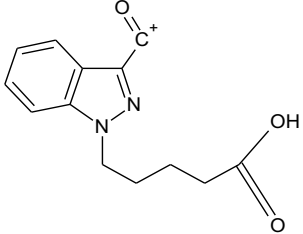
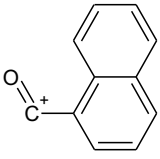
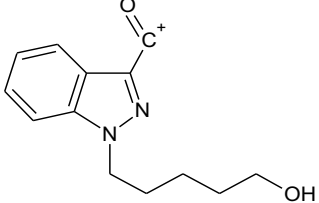
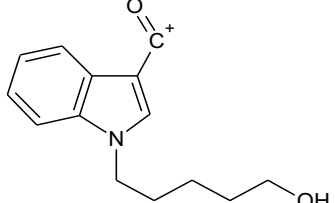
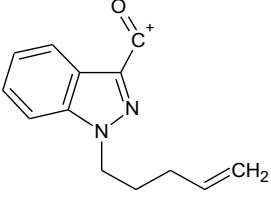
Предложенный ранее способ [574] позволяет определять стимуляторы и используется для проведения скрининга НС и ПВ в криминалистических образцах, но не позволяет проводить определение на следовом уровне (менее 1 нг/мл). Также необходимо учитывать, что для ряда соединений наблюдаются существенные матричные эффекты (в ряде случаев наблюдается гашение ионизации, достигающее 25–30%), делая способ пригодным лишь для экспрессного качественного токсикологического анализа, поскольку, несмотря на комплексную матрицу, параметры удерживания аналитов не меняются. Кроме того, данный способ имеет ряд существенных ограничений при определении синтетических каннабиноидов в моче, т.к. они практически полностью

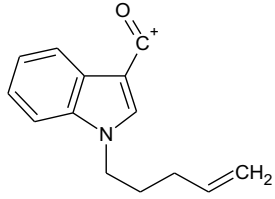
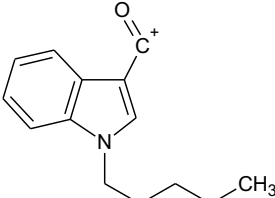
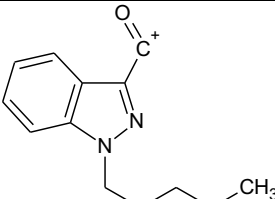
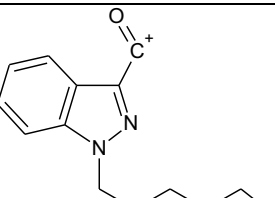
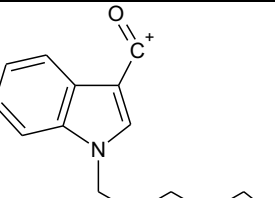
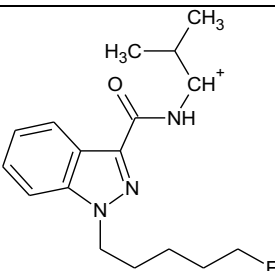
метаболизируют в организме и выводятся в виде метаболитов. Таким образом, при использовании ВЭЖХ-МС/МС систем низкого разрешения целесообразно проведение только целевого скрининга, чтобы свести к минимуму возможность ложноположительной идентификации.

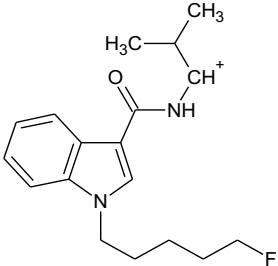
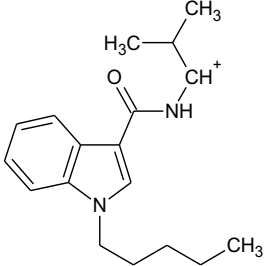
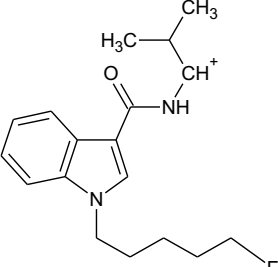
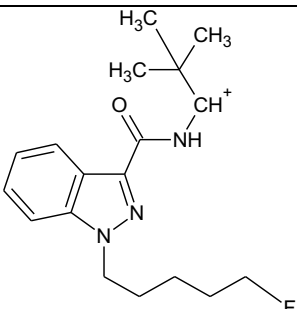
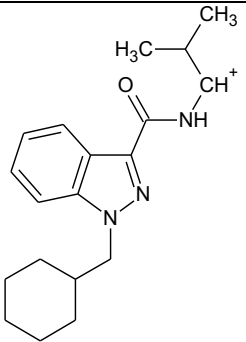
Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет проводить нецелевой скрининг синтетических каннабиноидов, т.к. большинство известных синтетических каннабиноидов «конструируются» вокруг известной базовой структуры – индольной или индазольной. Поэтому, зная структуры конкретных каннабиноидов и основные пути метаболизма, можно предположить набор молекулярных и псевдомолекулярных ионов метаболитов, а, исходя из исходной, базовой структуры аналита, можно предположить некоторые общие продукт-ионы (таблица 76) и рассчитать их точную массу.

Таблица 76 – Массы некоторых фрагментов и их структурные формулы, соответствующие ряду наиболее распространенных синтетических каннабиметиков

| Точная масса фрагмента (а.е.м) | Структурная формула фрагмента |
|--------------------------------|---|
| 145.0396 |  |
| 144.0443 |  |
| 217.0608 |  |

| Точная масса фрагмента (а.е.м) | Структурная формула фрагмента |
|--------------------------------|---|
| 216.0655 |  |
| 244.0968 |  |
| 245.0921 |  |
| 155.0491 |  |
| 231.1128 |  |
| 230.1176 |  |
| 213.1022 |  |

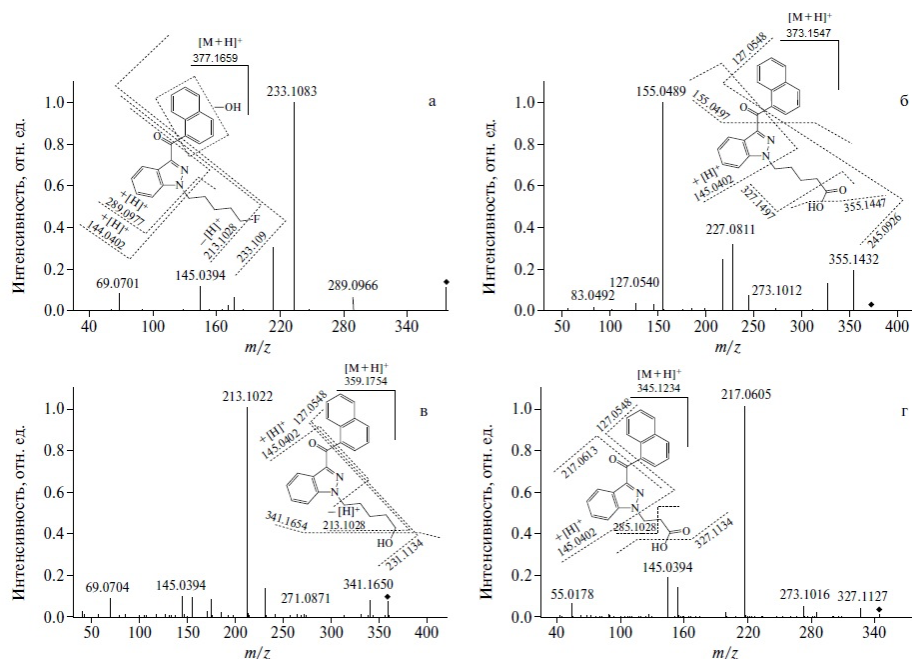
| Точная масса фрагмента (а.е.м) | Структурная формула фрагмента |
|--------------------------------|---|
| 212.1069 |  |
| 214.1226 |  |
| 215.1179 |  |
| 233.1085 |  |
| 232.1132 |  |
| 304.1819 |  |

| Точная масса фрагмента (а.е.м) | Структурная формула фрагмента |
|--------------------------------|---|
| 303.1867 |  |
| 285.1961 |  |
| 303.1867 |  |
| 318.1976 |  |
| 312.2070 |  |

Для уменьшения количества вероятных кандидатов предлагается использовать также и точность определяемых масс: для молекулярных и псевдомолекулярных ионов удовлетворительным является расхождение в массах не более 10, а продукт-ионов – не более 20 ppm.

Особо следует отметить, что обязательным условием рассматриваемого варианта скрининга является наличие общих ионов, характеризующих базовую структуру нативного соединения или ионов, связанных с ними структурно с учетом возможных протекающих процессов в ходе обмена веществ, так как вещества могут претерпевать изменения относительно своего первоначального строения и продукт-ионы будут иметь соответствующие точные значения m/z .

С учетом изложенного алгоритма скрининга был проведен поиск и идентификация метаболитов AM(N)-2201 (рисунок 70) в моче. Исходя из структуры каннабиметика и известных путей метаболизма предположили, что протонированные формы основных метаболитов будут иметь следующие значения m/z (приведены только наиболее вероятные метаболиты) (таблица 77).

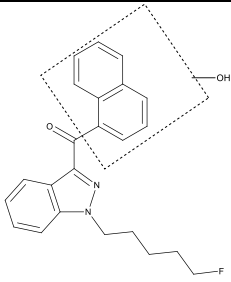
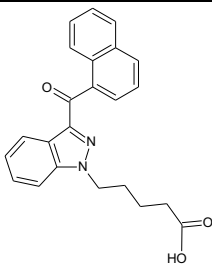
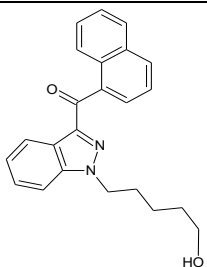


а – моногидроксилированный метаболит, б – C_5 -карбокси- метаболит, в – C_5 -дезфторгидрокси-метаболит, г – дезэтилкарбокси-метаболит

Рисунок 70 – MS/MS спектры вероятных метаболитов синтетического каннабиметика AM(N)-2201

С учетом возможных путей образования гидроксированных метаболитов синтетических каннабиметиков в случае AM(N)-2201 предположили, что гидроксирование протекает в нафтоильный радикал, индольную часть молекулы или алкильный радикал. При этом псевдомолекулярные массы метаболитов будут абсолютно одинаковы, однако, при получении масс-спектров второго поколения ионов возможно наблюдение ионов, соответствующих по точному значению m/z указанным частям молекулы, претерпевшим соответствующие метаболитические изменения.

Таблица 77 – Структуры и псевдомолекулярные массы наиболее вероятных метаболитов синтетического каннабиметика AM(N)-2201

| Структура | Метаболит ($[M+H]^+$), m/z |
|---|---|
|  | <p>моногидроксированный метаболит M1 (377.1659 Да)</p> |
|  | <p>C5-карбоксии-метаболит M2 (373.1547 Да)</p> |
|  | <p>C5-дезфторгидрокси-метаболит M3 (359.1754 Да)</p> |

| Структура | Метаболит ($[M+H]^+$), m/z |
|---|---|
|  | <p style="text-align: center;">дезэтилкарбоксит-метаболит M4 (345.1234 Да)</p> |

После вычитания фона из хроматограммы (в данном случае, в качестве фона выступает бланковый образец – образец, аналогичный исследуемому, но не содержащий искомым соединений) и выделения ионов потенциальных метаболитов, можно сделать вывод об их присутствии в образце. Масс-спектры продукт-ионов вероятных метаболитов AM(N)-2201 приведены на рисунок 70. Как видно, полученные данные m/z продукт-ионов удовлетворительно совпадают с расчетными данными, приведенными в таблице 77, разница в массовых числах наблюдаемых ионов не превышает 5 ppm от их расчетных значений. Появление ионов с m/z 217.0966 и 227.0811 в масс-спектре C_5 -карбоксит метаболита, вероятно, обусловлено элиминированием соответственно гидроксид- и карбонильной группы из карбокситильной группы метаболита.

Таким образом, с использованием данного подхода возможно определение вероятных метаболитов синтетических каннабиноидов, но для повышения надежности идентификации необходимо подтверждение с использованием стандартных образцов веществ или других, подтверждающих методов анализа. Кроме того, реализация данного подхода возможна только с применением масс-спектрометрии высокого разрешения.

2.15 Поиск метаболитов ноотропного препарата унифирама в режиме нецелевого скрининга с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения

Унифирам (рисунок 71) относится к новому поколению ноотропных препаратов, для которых заявленная эффективность существенно превышает широкораспространенный пирацетам. Несмотря на то, что в ряде стран он уже прошел клинические испытания и допущен к применению (например, в США), его метаболизм не изучен. Известно, что он лишь частично выводится в нативном виде, а значит, весьма актуален поиск его метаболитов. Оптимальным методом для этого представляется использование масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с УВЭЖХ разделением, а для подтверждения установления формы выведения (конъюгированная или свободная) необходимо сочетание нескольких методических подходов: «разбавил и вколол» и различные виды гидролиза [621].

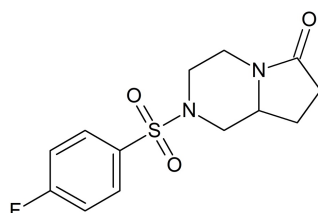


Рисунок 71 – Структурная формула унифирама

Поиск вероятных метаболитов проводили с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact, оснащенного источником электрораспылительной ионизации (ЭРИ), соединенного с УВЭЖХ-системой Bruker Elute под управлением программного обеспечения Bruker Compass HyStar 4.1. Анализ полученных данных осуществляли с использованием ПО Bruker Data Analysis 4.4. Хроматографическое разделение осуществляли с использованием аналитической колонки Bruker Intensity Solo-2 C₁₈ (75 × 2.1 мм, 2.6 мкм), термостатируемой при 40°C и оснащенной

предохранительной колонкой с идентичным сорбентом. Условия масс-спектрометрического детектирования и градиентного элюирования приведены в таблица 78 и таблица 79.

Таблица 78 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | Подвижная фаза А (5 мМ водный раствор формиата аммония с 1% метанола и 0.05% муравьиной кислоты), % | Подвижная фаза В (5 мМ метанольный раствор формиата аммония и 0.05% муравьиной кислоты), % | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин |
|------------|---|--|--|
| 0.0 | 96.0 | 4.0 | 0.20 |
| 0.1 | 96.0 | 4.0 | |
| 1.0 | 81.7 | 18.3 | |
| 2.5 | 50.0 | 50 | 0.22 |
| 14.0 | 0.1 | 99.9 | 0.40 |
| 16.0 | 0.1 | 99.9 | 0.48 |
| 16.1 | 96.0 | 4.0 | |
| 19.0 | 96.0 | 4.0 | |
| 19.1 | 96.0 | 4.0 | 0.20 |
| 20.0 | 96.0 | 4.0 | |

Таблица 79 – Условия детектирования унифирама и его потенциальных метаболитов

| Параметр | Значение |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Источник ионизации | Электрораспылительная ионизация |
| Полярность | Положительная |
| Напряжение на капилляре, В | 3500 |
| Напряжение на экстрагирующей линзе, В | 400 |
| Температура источника ионизации, °С | 200 |
| Давление газа-распылителя, МПа | 0.2 |
| Расход газа-осушителя, л/мин | 8 |
| Диапазон сканирования масс, Да | 140-600 |
| Скорость сканирования, Гц | 2 |
| Газ-мишень | Азот |

| | |
|--|-----|
| Давление газа-мишени, мТорр | 1.5 |
| Энергия соударительной диссоциации, эВ | 20 |

Подготовленные к анализу образцы термостатировали в автосамплере при 5 °С. Подготовку проб к анализу проводили посредством простого разбавления проб, а также ферментативного и минерального гидролиза, используя ферменты *E. Coli* и *H. Pomatia*. После ферментативного гидролиза с использованием *E. Coli*, происходит деконъюгация исключительно глюкуроноидов, в то время как применение *H. Pomatia* позволяет деконъюгировать как глюкуроноиды, так и сульфаты благодаря наличию арилсульфатазы, однако эффективность работы фермента сильно зависит не только от температуры инкубации проб после его добавления, но и от значения рН образца. Оптимальная активность фермента *E. Coli* проявляется при рН 6.5-6.8, а наибольшая активность *H. Pomatia* – при рН 4.5. В обоих случаях поддержание необходимого значения рН осуществляется с использованием буферных растворов – фосфатного и ацетатного соответственно. Для реализации этого подхода к аликвоте пробы мочи объемом 3 мл добавляли 1 мл буферного раствора и 30 мкл фермента, тщательно перемешивали, после чего инкубировали при 50°С в течение 1 часа, затем охлаждали до комнатной температуры, отбирали 1 мл гидролизата и центрифугировали 10 мин в эппендорфе объемом 1.5 мл при 10000 об./мин, после чего супернатант переносили в стеклянные вials для последующего анализа.

Минеральный гидролиз позволяет разрушать практически все возможные виды конъюгатов, что является его несомненным преимуществом, однако ферментативные способы являются гораздо более мягкими и щадящими по отношению к образцу и прибору (при дальнейшем анализе полученных проб). Минеральный гидролиз проводили следующим образом: аликвоту мочи объемом 3 мл помещали в стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой, добавляли 500 мкл концентрированной соляной кислоты, герметично закрывали, перемешивали, после чего инкубировали при 80°С в течение часа, затем отбирали 1.5 мл гидролизата, переносили в эппендорф

через воронку, заполненную гидрокарбонатом натрия (для нейтрализации кислоты), и центрифугировали 10 мин при 10000 об./мин с последующим переносом супернатанта в стеклянную виалу для анализа.

Разбавление проб проводили с использованием смеси 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде : ацетонитрил (50 : 50, v/v) следующим образом: 200 мкл пробы мочи помещали в эппендорф и добавляли 800 мкл разбавителя, перемешивали на вортексе в течение 1 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 10000 об./мин.

Учитывая среднюю полярность унифирама, применение обращено-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) является оптимальным решением. Исходя из структуры нативного вещества и базируясь на известных особенностях протекания метаболизма в организме человека можно предположить структуры некоторых метаболитов (рисунок 72).

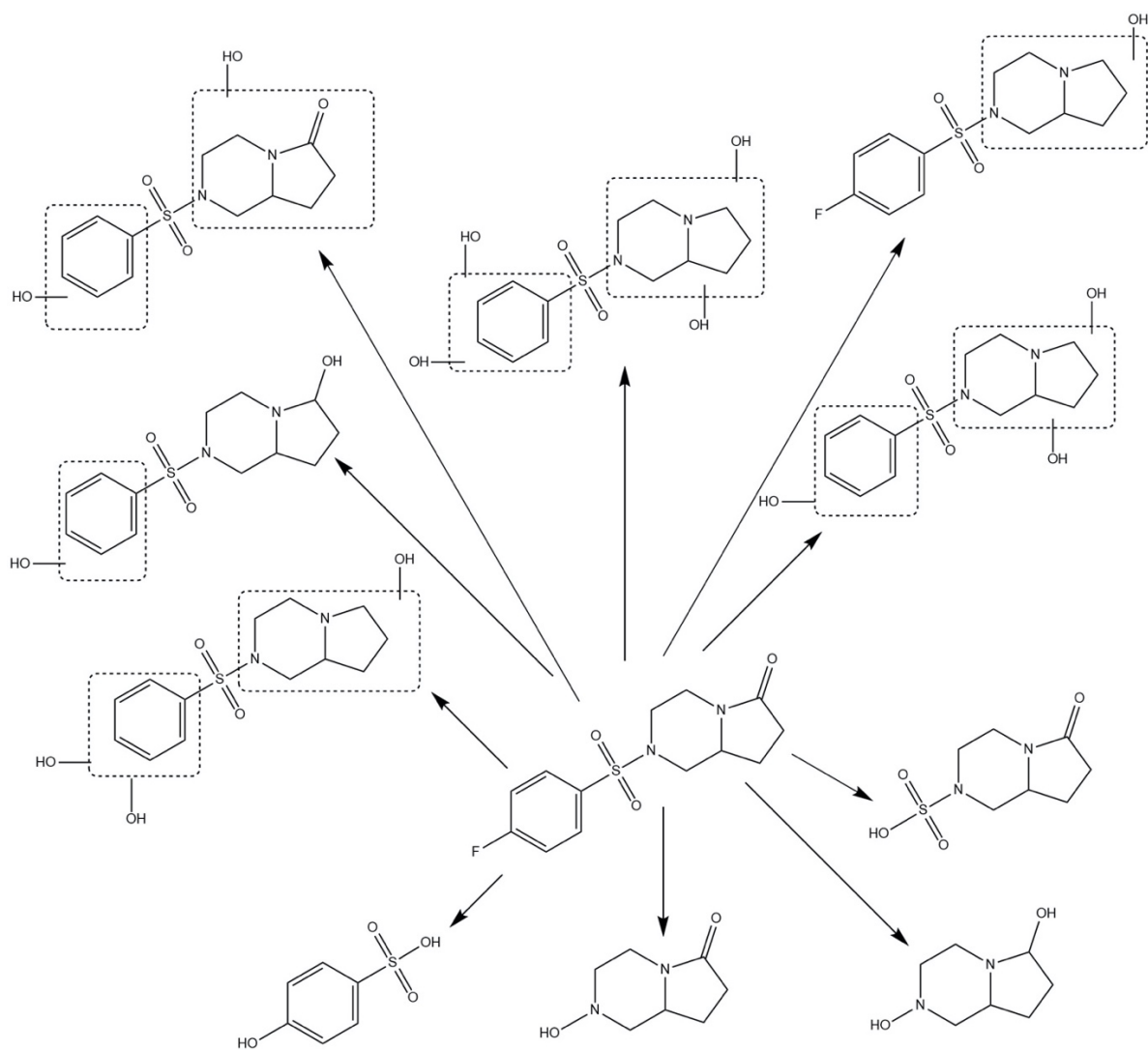


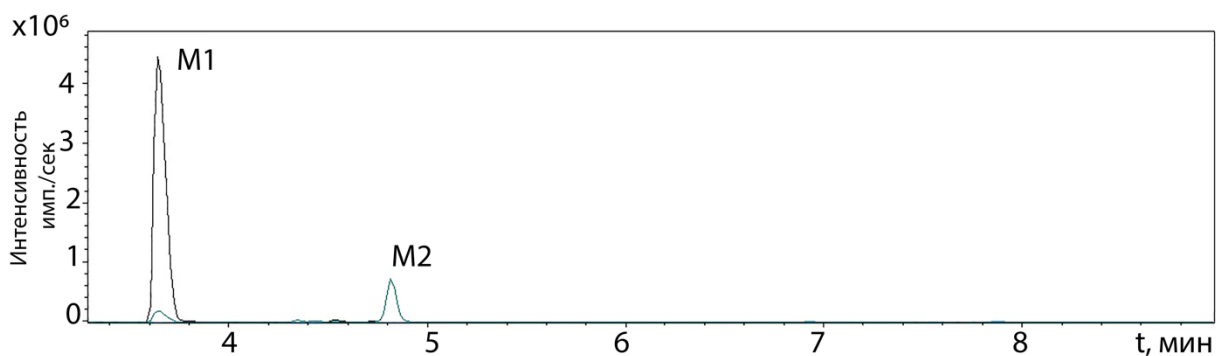
Рисунок 72 – Теоретически возможные пути метаболизма унифирама

Данные по предположенным структурам базируются как на протекании основных стадий метаболизма ксенобиотиков, так и на расчетах с применением программно-аппаратных комплексов, таких как MetWorks (Thermo Scientific) и GLORY (университет Гамбурга). Следует отметить, что несмотря на постоянное совершенствование подобных программных продуктов, их точность по-прежнему остается относительно невысокой. Кроме того, вышеописанные подходы зачастую позволяют предположить лишь наиболее очевидные метаболиты. Поэтому применение метода *in vitro* по-прежнему остается наиболее надежным способом решения подобных задач.

С другой стороны, применение программных продуктов для прогнозирования путей метаболизма представляет интерес из-за отсутствия в ряде случаев возможности проведения экспериментов с использованием клеточных культур. Такой подход требует ряда дополнительных предосторожностей для снижения риска возникновения ложноположительного результата. Среди них – требования к отсутствию пиков эндогенных соединений, имеющих близкие значения параметров удерживания к предполагаемым метаболитам, а также минимизация ошибки определения масс (менее 5 ppm для режима сканирования ионов-прекурсоров и не более 10 ppm в режиме сканирования ионов-продуктов). Дополнительным и немаловажным способом проверки корректности первичных выводов является также оценка изотопного распределения, особенно для таких соединений, как унифирам, имеющих несколько разных гетероатомов в исходной структуре.

Исходя из описанных выше соображений, анализ проб мочи проводился до и после употребления унифирама. Полученные пробы анализировали с использованием нескольких режимов сканирования: автоматического выбора ионов-прекурсоров с последующим получением спектра ионов продуктов (**auto MS/MS**), сканирования полного спектра ионов-прекурсоров (**full MS**), а также с применением режима широкополосного пропускания ионов с последующей соударительной диссоциацией (**bbCID**) с привлечением библиотек Target Screener, содержащих спектры ряда ксенобиотиков и их метаболитов, пестицидов для минимизации возникновения ложноположительных результатов.

После анализа хроматограмм (рисунок 73) с применением описанных выше критериев удалось выделить два потенциально возможных метаболита унифирама (рисунок 74).



M1 – m/z 313.0853, M2 – m/z 315.0809

Рисунок 73 – Хроматограмма образца мочи (четвертый день после употребления унифирама), содержащего предполагаемые метаболиты по выделенным протонированным молекулярным ионам

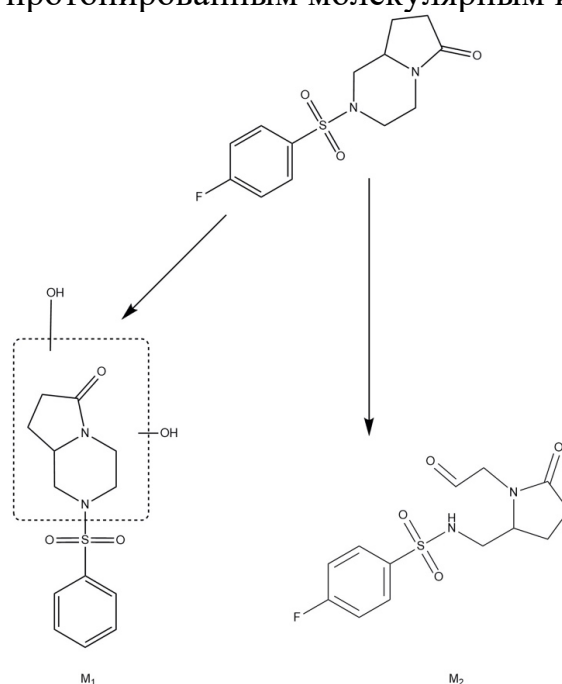


Рисунок 74 – Предполагаемые метаболиты унифирама

Анализируя полученные ионы-прекурсоры и соответствующие им ионы-продукты, можно сделать вывод о том, что образование дефтордигидроксилированного метаболита (M1) происходит именно подобным образом, а не путем замещения фтора на гидроксильную группу, о чем свидетельствует наблюдаемая фрагментация (рисунок 75, рисунок 76).

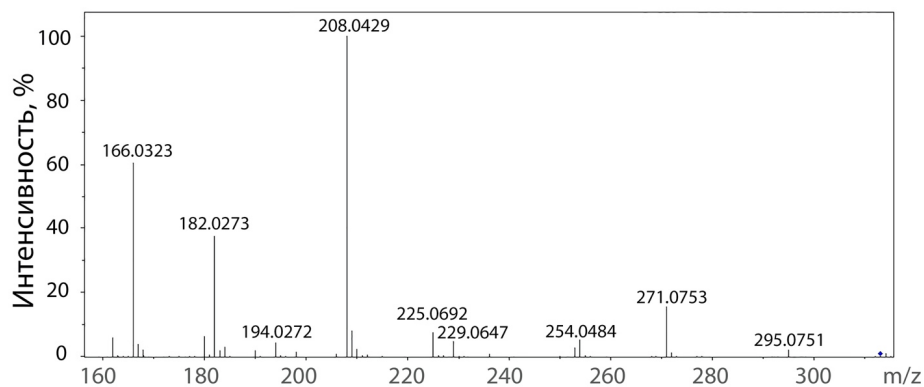


Рисунок 75 – Масс-спектр продукт-ионов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама М1

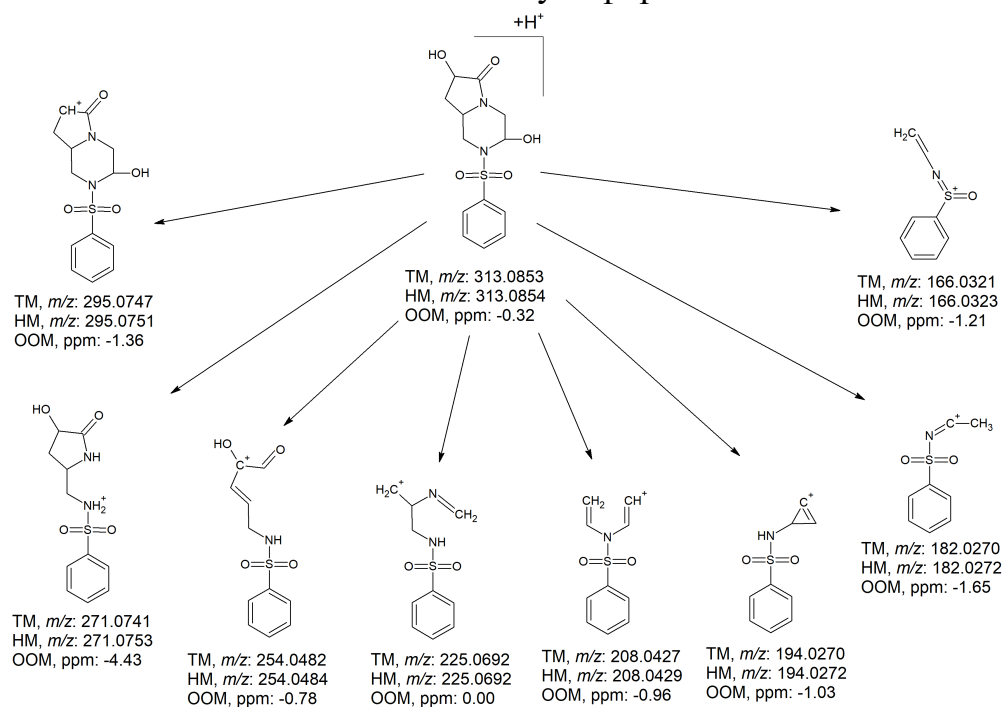


Рисунок 76 – Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама М1 (ТМ – теоретическая масса, НМ – наблюдаемая масса, ООМ – ошибка определения массы)

Положение гидроксильных групп в приведенной схеме фрагментации является допущением и приведено для удобства расчета масс.

Исходя из точной массы второго потенциального метаболита и закономерностей протекания метаболизма ксенобиотиков можно сделать вывод о том, что это моногидроксилированный метаболит или сформировавшийся в результате деалкилирования и карбонилирования метаболит. В пользу

последнего варианта выступает наблюдаемая фрагментация (рисунок 77, рисунок 78).

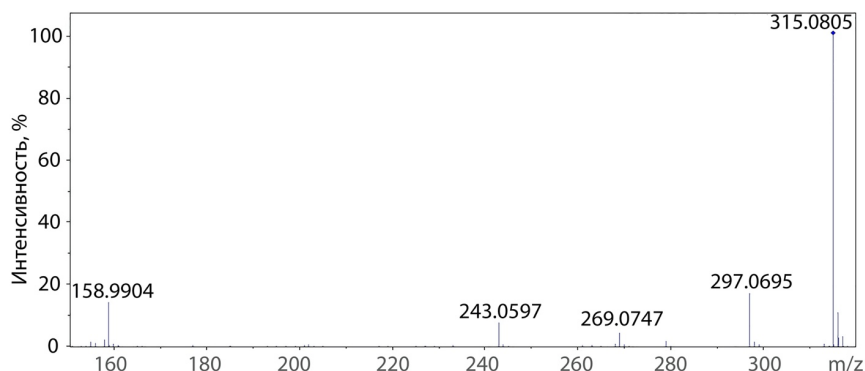


Рисунок 77 – Масс-спектр продукт-ионов, полученный для предполагаемого метаболита унифирама М2

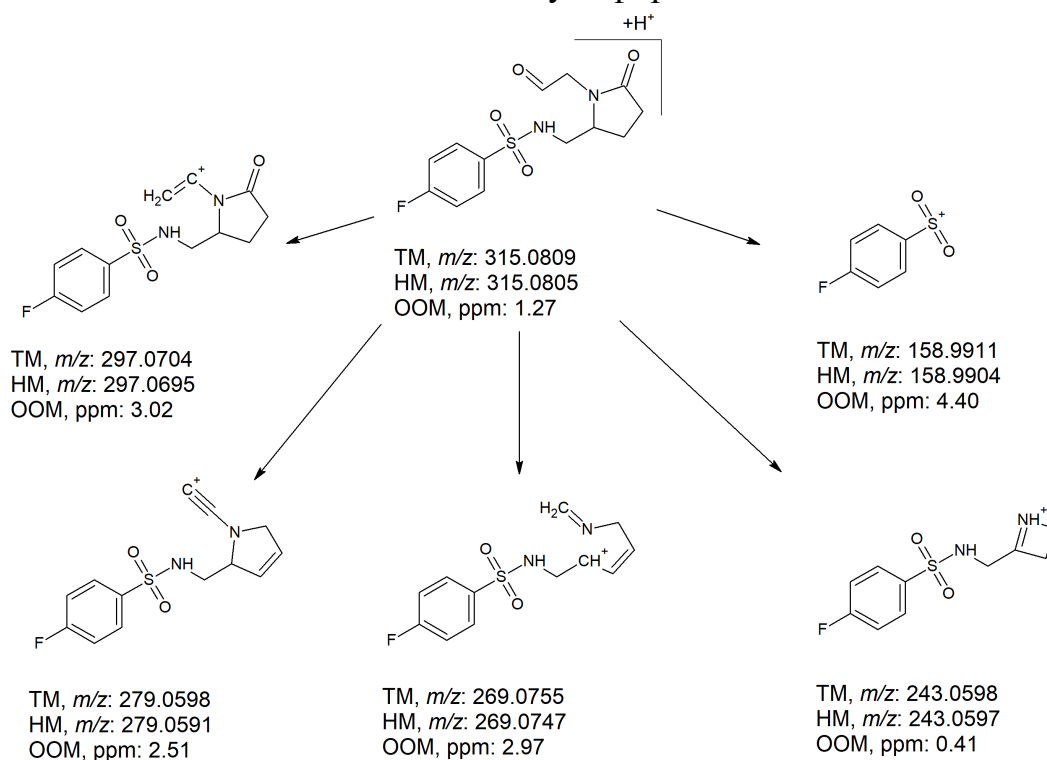


Рисунок 78 – Предлагаемая интерпретация зарегистрированного масс-спектра вероятного метаболита унифирама М1 (ТМ – теоретическая масса, НМ – наблюдаемая масса, ООМ – ошибка определения массы)

Все предположения базируются на соотношении наблюдаемых и теоретических масс и их изотопного распределения (таблица 80).

Таблица 80 – Теоретические и наблюдаемые массы унифирама и предполагаемых метаболитов, полученные для УВЭЖХ-МСВР с использованием ЭРИ в режиме регистрации положительных ионов

| Компонент | Элементная композиция | Теоретическая масса протонированного иона, m/z | Наблюдаемая масса протонированного иона, m/z | Ошибка определения массы, ppm | Время удерживания, мин |
|-----------|------------------------|--|--|-------------------------------|------------------------|
| Унифирам | $C_{13}H_{15}FN_2O_3S$ | 299.0860 | 299.0865 | -1.67 | 5.23 |
| M1 | $C_{13}H_{16}N_2O_5S$ | 313.0853 | 313.0854 | -0.32 | 3.65 |
| M2 | $C_{13}H_{15}FN_2O_4S$ | 315.0809 | 315.0805 | 1.27 | 4.82 |

Полученные результаты справедливы в отношении проб после ферментативного гидролиза. Образцы, подвергшиеся минеральному гидролизу, были исключены из рассмотрения ввиду их деградации в процессе инкубирования с соляной кислотой. В этих условиях, вероятно, происходит разрушение аналитов, поскольку в ряде случаев не удалось обнаружить даже стероидные гормоны, также склонные к деградации в условиях высокотемпературного и продолжительного минерального гидролиза.

К сожалению, зачастую применение масс-спектрометрии не позволяет установить точное местоположение заместителя (в частности, гидроксильной группы), а достоверное подтверждение возможно исключительно лишь после достаточного препаративного выделения предполагаемых метаболитов с дальнейшим описанием методами ЯМР- и ИК-спектроскопии (помимо масс-спектрометрии) или путем встречного синтеза предполагаемых метаболитов и сопоставления их параметров удерживания и масс-спектральных характеристик с наблюдаемыми в образце.

Методология нецелевого поиска метаболитов для такого случая строится на постепенном увеличении элюирующей силы подвижной фазы при использовании хроматографического разделения с быстрой регистрацией спектра ионов-прекурсоров и ионов-продуктов. Для повышения экспрессности анализа, а также уменьшения ширины хроматографических пиков

помимо градиента по составу подвижной фазы, возможно также изменение скорости её подачи. Подобная плавная развертка градиента позволяет уменьшить количество коэлюирующихся соединений и обеспечить лучшую работу масс-спектрометра для нецелевого поиска соединений ввиду меньшего гашения ионизации, для которого, в случае масс-спектрометрии высокого разрешения, оптимальным выбором является применение режима auto MS/MS. В случае его применения особое внимание стоит уделить критериям выбора ионов-прекурсоров и условиям их динамического исключения. Для проведения экспериментов в рамках поставленной задачи использовали 7 наиболее интенсивных ионов-прекурсоров с их динамическим исключением после 3 циклов сканирования и возможностью повторного сканирования при выполнении одного или всех следующих условий: интенсивность иона возрастает до 1 млн имп./сек или по прошествии 30 сек после последнего сканирования данного иона. Весь цикл сканирования ионов-продуктов и ионов-прекурсоров осуществлялся за 2 сек, что при оптимизации метода на быстрое разделение могло бы привести к возникновению ложноотрицательных результатов из-за низкой скорости сканирования, в то время как её существенное повышение привело бы к значительному падению интенсивности сигналов.

Недостатком режима auto MS/MS является достаточно высокая вероятность захвата в качестве ионов-прекурсоров фоновых сигналов, обусловленных матрицей или грязными растворителями. Так, при плавном изменении элюирующей силы и растворителях невысокой чистоты, зачастую наблюдается серия пиков, характерных для полиэтиленгликолей, имеющих высокую эффективность ионизации и создающих высокий полный ионный ток. Подобный фон приведет к ложному захватыванию ионов прекурсоров вместо целевых аналитов, а широкополосное пропускание позволит получить полный набор ионов-продуктов от всех присутствующих в момент элюирования ионов-прекурсоров. Основной сложностью в случае применения

режима bbCID является то, что установить соответствие иона-продукта и иона-прекурсора можно лишь опосредованно, сделав лишь предположение о том, что в спектре всех ионов-продуктов ряд принадлежит искомому иону-прекурору с дальнейшим целевым подтверждением.

Несомненным преимуществом, в этом случае, становится возможность поиска на основе структурного подобия, когда ряд соединений имеет свойственный для них одинаковый ион-продукт, что является удобным признаком для дальнейшего группового, классификационного анализа, в частности, для растительного сырья, при поиске групп соединений.

Применение режима сканирования full MS, в свою очередь, позволяет зачастую добиться максимальной чувствительности для QTOF-систем (ввиду отсутствия потерь в процессе соударительной ионизации), что немаловажно при оценке временных окон обнаружения потенциальных метаболитов после употребления нативного вещества после подтверждения их структуры.

В то же время градиент по скорости подачи подвижной фазы может негативно сказаться на чувствительности анализа, поскольку параметры температуры источника ионизации, напряжения на капилляре и расхода газов на распыление и осушение напрямую зависят от скорости потока ПФ.

При постановке метода для проведения качественного и количественного анализа, уточнение окон обнаружения, как правило, проводится на рутинном для лаборатории методе. В предложенных нами условиях определение нативного унифирама в моче возможно до трех суток с момента его однократного употребления с использованием процедуры разбавления проб мочи. Обнаружение M2 возможно с третьих по пятые сутки, M1 – с третьего по шестой день после применения ферментативного гидролиза.

Выводы

1. Показана возможность применения методологии твердофазной аналитической дериватизации для анализа биологических жидкостей на примере модификации катехоламинов на поверхности ионнообменного сорбента, обеспечивающей одновременную очистку и модификацию аналитов для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Изучены особенности применения методологии твердофазной аналитической дериватизации к реальным объектам, проведено её сопоставление с известным подходом дериватизации в растворе.

2. Рассмотрены различные варианты применения методологии нецелевого скрининга с использованием квадруполь-времяпролетных масс-спектрометров для решения задач аналитической токсикологии и изучения метаболизма ксенобиотиков, основанные на автоматическом выборе ионов-прекурсоров и ионов-продуктов, а также широкополосном пропускании ионов-прекурсоров в ячейку соударений. В зависимости от задачи нецелевого скрининга предпочтение может отдаваться одному из описанных алгоритмов исследования.

3. С использованием методологии нецелевого скрининга изучен метаболизм нового ноотропного препарата унифирама, выявлены два потенциальных метаболита, которые могут определяться в широких временных рамках, особенно при курсовом употреблении препарата. Оценка метаболизма проводилась с использованием смешанного подхода пробоподготовки с целью выявления наличия конъюгатов и их типа – глюкуронидные или сульфатные. Установлено, что после минерального гидролиза определить унифирам или его метаболиты ввиду их деградации не представляется возможным.

4. Рассмотрены возможности дисперсионной жидкость-жидкостной микроэкстракции для концентрирования и количественного определения некоторых андрогенных анаболических стероидов, эстрагенов и глюкокортикоидов в моче. Изучено влияние различных диспергентов, экстрагентов и их соотношений, оценено влияние солевого фона, рН среды и условий

деконъюгирования на эффективность экстракции и чувствительность определения аналитов, изучена стабильность образцов и воспроизводимость результатов при хранении проб.

5. Обоснована необходимость применения полного цикла исследования в вопросах пищевой безопасности профессиональных спортсменов: отмечены потенциальные источники запрещенных ВАДА соединений не только в биологически активных добавках, но и продуктах питания. Показано, что термическая обработка этих продуктов не всегда позволяет избавиться от запрещенных препаратов, а употребление загрязненной ими продукции способно привести к дисквалификации спортсмена.

6. Предложен полный аналитический цикл обнаружения наркотических и психоактивных веществ от растительного сырья до биологических жидкостей человека, приведены метрологические характеристики разработанных методик, обсуждены вопросы концентрирования аналитов в различных объектах, приведены методы их определения с использованием различных методов хроматографии и хроматомасс-спектрометрии для целей аналитической токсикологии, криминалистической экспертизы и допинг-контроля.

7. Разработана, валидирована и аттестована методика определения мельдония в моче с использованием УВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией в режиме гидрофильной хроматографии. Аттестованная методика МИ 02067847.02-2017 «Массовая концентрация мельдония в моче человека методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием» внесена в Федеральный реестр аттестованных методик (методы) измерений ФР.1.31.2018.29251 (приложение 4).

8. Выявлены и идентифицированы представители новых классов допинг-агентов: рилизинг-пептидов гормона роста, селективных модуляторов андрогенных рецепторов, некоторых стимуляторов и наркотических

веществ. Показано, что в отношении селективных модуляторов андрогенных рецепторов и их метаболитов, а также исследованных стимуляторов и наркотических веществ возможна унификация методик, направленных на скрининг широкого спектра допинг-агентов, таких как анаболические стероиды, глюкокортикостероиды, наркотики и стимуляторы, описанных ранее.

9. Разработаны методики целевого скрининга наиболее распространенных наркотических и психоактивных веществ в растительном сырье и биологических жидкостях человека, включая «аптечные наркотики».

10. Проведено сравнение методологии «Wrong-way round ionization» с известными методами определения рилизинг-пептидов гормона роста в режиме гидрофильной хроматографии и классическим определением с использованием обращено-фазовой УВЭЖХ-МС/МС. Показано, что несмотря на возможность переноса протона в газовой среде от аммиака на молекулы аналита и формирование преимущественно монозарядных ионов добиться большей чувствительности по сравнению с использованием подкисленной подвижной фазы не удастся. Кроме того, применение подщелоченной подвижной фазы требует подбора подходящей хроматографической колонки, способной длительное время обеспечивать устойчивость системы в щелочной среде.

11. Проведено сравнение эффективности различных сорбентов для извлечения рилизинг-пептидов гормона роста и селективных модуляторов андрогенных рецепторов из мочи, оценена их емкость, фактор концентрирования для их последующего УВЭЖХ-МС/МС определения.

12. Оценена эффективность применения неэндкепированного октадецильного сорбента для извлечения тропановых алкалоидов и ряда фенольных соединений из растительного сырья для последующего анализа методами газовой и жидкостной хроматографии. Показано, что применение ТФЭ позволяет достичь предела обнаружения 10 мкг/мл при их ВЭЖХ определении с использованием диодноматричного детектора.

Список литературы

- 1 The Japanese Pharmacopoeia, 15th ed. – Tokyo: Ministry of Health, Labor, and Welfare. 2007. – 1802 p.
- 2 European Pharmacopoeia 7.0. –Strasbourg: Council of Europe. 2007. – Vol. 2. 3307 p.
- 3 British Pharmacopoeia. – London: Crown Copyright. 2008. – Vol. 3. 3500 p.
- 4 Moffat, A. C., Osselton M. D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / A.C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – Pharmaceutical Press. 2011. – 2609 p.
- 5 Mechtler, K. Variations of Δ^9 -THC content in single plants of hemp varieties / K. Mechtler, J. Bailer, Hueber K. // Ind. Crops Prod. – 2004. – Vol. 19. – P. 19–24.
- 6 Pellegrini, M. A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry / M. Pellegrini, E. Marchei, R. Pacifici // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 36. – P. 939–946.
- 7 De Backer, B. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material / B. De Backer, B. Debrus, P. Lebrun, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2009. – Vol. 877. – P. 4115–4124.
- 8 Saito, K. Determination of psilocybin in hallucinogenic mushrooms by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection / K. Saito, T. Toyooka, M. Kato, [et al.] // Talanta. – 2005. – Vol. 66. – P. 562–568.
- 9 Hank, H. Investigation of Tropane Alkaloids in Genetically Transformed *Atropa belladonna* L. Cultures / H. Hank, Szoke, K. Toth, [et al.] // Chromatographia. – 2004. – Vol. 60. – P. 55–59.

10 Zhanpin, W. A simple and rapid method for the extraction of five major alkaloids from opium / W. Zhanpin // *Forensic Sci. Int.* – 1994. – Vol. 64. – P. 103–106.

11 Pedersen-Bjergaard, S. Determination of psilocybin in *Psilocybe semilanceata* by capillary zone electrophoresis / S. Pedersen-Bjergaard, E. Sannes, K.E. Rasmussen, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 1997. – Vol. 694. – P. 375–381.

12 Ye, N. Determination of scopolamine, atropine and anisodamine in *Flos daturae* by capillary electrophoresis / N. Ye, R. Zhu, X. Gu, [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2001. – Vol. 15. – P. 509–512.

13 Dresen, S. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds / S. Dresen, N. Ferreiros, M. Putz, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 45. – P. 1186–1194.

14 Dresen, S. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples / S. Dresen, S. Kneisel, W. Weinmann, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2011. – Vol. 46. – P. 163–171.

15 Lindigkeit, R. Spice: A never ending story? / R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2009. – Vol. 191. – P. 58–63.

16 Kneisel, S. Identification and structural characterization of the synthetic cannabinoid 3-(1-adamantoyl)-1-pentylindole as an additive in ‘herbal incense’ / S. Kneisel, F. Westphal, P. Bisel, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 195–200.

17 Kato, N. Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography/fluorescence detection / N. Kato, T. Kojima, S. Yoshiyagawa, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – Vol. 1145. – P. 229–233.

18 Lewis Mander, L. *Comprehensive Natural Products II* / L. Lewis Mander, H.-W. Liu // Elsevier Science; 1 edition. – 2010. – 7388 p.

19 Amar, M. B. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential / M.B. Amar // *J. Ethnopharm.* – 2006. – Vol. – 105. – P. 1–25.

20 Nadulski, T. Simple and sensitive determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry / T. Nadulski, F. Pragst // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – Vol. 846. – P. 78–85.

21 Míguez-Framil, M. An improved method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / M. Míguez-Framil, J.A. Cocho, M.J. Tabernero, [et al.] // *Microchem. J.* – 2014. – Vol. 117. – P. 7–17.

22 Choe, S. Genetic and chemical components analysis of *Papaver setigerum* naturalized in Korea / S. Choe, E. Lee, G. Jin, [et. al] // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – VOL. 222. – P. 387–393.

23 Kozelj, G. Simple validated LC–MS/MS method for the determination of atropine and scopolamine in plasma for clinical and forensic toxicological purposes / G. Kozelj, L. Perharic, L. Stanovnik, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – Vol. 96. – P. 197–206.

24 Shulgin, A. Phenethylamines I Have Known and Loved: A Chemical Love Story (PIHCAL) / A. Shulgin, A. Shulgina. – Transform Press. USA. – 1991. – 978 p.

25 Kesha, K. Methylenedioxypropylone (“Bath Salts”), Related Death: Case Report and Review of the Literature / K. Kesha, C.L. Boggs, M. G. Ripple, [et. al] // *J. Forensic Sci.* – 2013. – Vol. 58. – № 6. – P. 1654–1659.

26 Wiessman, A. Cannabimimetic Activity from CP-47,497, a Derivative of 3-Phenylcyclohexanol / A. Wiessman, G.M. Milne, L.S. Melvin // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 1982. – Vol. 223. – №2. – P. 516–523.

27 Mechoulam, R. Synthesis of the individual, pharmacologically distinct, enantiomers of a tetrahydrocannabinol derivative / Mechoulam R., Lander N., Breuer A., Zahalka J. // *Tetrah. Asym.* – 1990. – Vol. 1. – №5. – P. 315–318.

28 Reggio, P. H. *The Cannabinoid Receptors*. – NJ: Humana Press, 2009. – 416 p.

29 Bell, M.R. Antinociceptive (aminoalkyl)indoles / M.R. Bell, T.E. D'Ambra, VOL. Kumar, [et. al.] // *J. Med. Chem.* – 1991. – Vol. 34. – P. 1099–1110.

30 D'Ambra, T.E. Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor / T.E. D'Ambra, K.G. Estep, M.R. Bell, [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1992. – Vol. 35. – P. 124–135.

31 Makriyannis, A., Khanolkar, A., Lu, D. Cannabinoids selective for the CB2 receptor // US Patent Application. Patent No. US6166066A1. 2000.

32 Makriyannis, A., Lu, D., Khanolkar, A. Novel analgesic and immunomodulatory cannabinoids // US Patent Application Patent No. US2003120094A1. 2003.

33 Makriyannis, A. Novel bicyclic cannabinoid agonists for the cannabinoid receptor // Mexico Patent Application Patent No. MXPA02005104A. 2003.

34 Makriyannis, A., Liu, Q. Heteroindanes a new class of potent cannabimimetic ligands // US Patent Application Patent No. US2004236101A1. 2004.

35 Makriyannis, A., Lai, X.-Z., Lu, D. Novel biphenyl and biphenyl-like cannabinoids // International Patent Application Patent No. WO2004017920A2. 2004.

36 Makriyannis, A., Deng, H. Novel cannabimimetic ligands // US Patent Application Patent No. US2004077649A1. 2004.

37 Makriyannis, A., Khanolkar, A. Bicyclic cannabinoid agonists for the cannabinoid receptor // US Patent Application Patent No. US2005137173A1. 2005.

38 Makriyannis, A., Lu, D., Khanolkar, A., Meng, Z. Novel analgesic and immunomodulatory cannabinoids // US Patent Application Patent No. US2005239874A1. 2005.

39 Makriyannis, A., Lui, Q., Thotapally, R. Novel pyrazole analogs acting on cannabinoid receptor // US Patent Application Patent No. US2006030563A1. 2006.

40 Makriyannis, A., Nikas, S.P., Khanolkar, A. Novel bicyclic and tricyclic cannabinoids // US Patent Application Patent No. US2006199957A1. 2006.

41 Makriyannis, A., Khanolkar, A. Peripheral cannabinoid receptor (CB2) selective ligands // US Patent Application Patent No. US2006189610A1. 2006.

42 Makriyannis, A., Lui, Q., Thotapally, R. Pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists // US Patent Application Patent No. US2006100208A1. 2006.

43 Makriyannis, A., Khanolkar, A., Goutopolus, A. Cannabimimetic lipid amines as useful medications // US Patent Application Patent No. US7161016B1. 2007.

44 Makriyannis, A. Cannabimimetic lipid ligands // Mexico Patent Application Patent No. MX2007004536A. 2007.

45 Makriyannis, A., Lu, D. Keto cannabinoids with therapeutic indications // US Patent Application Patent No. US2007155701A1. 2007.

46 Makriyannis, A., Nikas, S.P., Khanolkar, A., Thakur G.A., Lu D. Novel bicyclic cannabinoids // US Patent Application Patent No. US2007135388A1. 2007.

47 Makriyannis, A., Deng, H. Receptor selective cannabimimetic aminoalkylindoles // US Patent Application Patent No. US2007243134A1. 2007.

48 Makriyannis, A., Liu, Q., Goutopolus, A. Retro-anandamides, high affinity and stability receptor ligands // US Patent Application Patent No. US7276613B1. 2007.

49 Makriyannis, A., Deng, H. Cannabimimetic indole derivatives // US Patent Application Patent No. US208009087A1. 2008.

50 Makriyannis, A., Vemuri, VOL.K. CB1 receptor antagonists and uses thereof // International Patent Application Patent No. WO2008154015A1. 2008.

51 Makriyannis, A., Vemuri, VOL.K., Thotapally, R., Olszewska, T. Novel hetero pyrrole analogs acting on cannabinoid receptors // International Patent Application Patent No. WO2010104488A1. 2010.

52 Zayed, M. A. Spectrophotometric studies of reactions between pseudoephedrine with different inorganic and organic reagents and its micro-determination

in pure and in pharmaceutical preparations / M. A. Zayed, G. A. El-Rasheedy // *A Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2012. – Vol. 88. – P. 156–161.

53 Pellati, F. Determination of ephedrine alkaloids in *Ephedra* natural products using HPLC on a pentafluorophenylpropyl stationary phase / F. Pellati, S. Benvenuti // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – Vol. 48. – P. 254–263.

54 Сорокин, В.И. Определение вида наркотических средств, получаемых из конопли и мака: Методические рекомендации / В.И. Сорокин, В.Г. Савенко, Е.П. Семкин, [и др.]. – М.: ЭКЦ МВД России, РФЦСЭ МЮ России, 1995. – 24 с.

55 Рекомендуемые методы идентификации и анализа каннабиса и продуктов каннабиса. – Нью-Йорк: ООН. – 2010. – 62 с.

56 Jordan, M. *In vitro* shoot and root organogenesis, plant regeneration and production of tropane alkaloids in some species of *Schizanthus* / M. Jordan, M. Humam, S. Bieri, [et al.] // *Phytochem.* – 2006. – VOL. 67. – P. 570–578.

57 Temerdashev, A.Z. Chromatographic determination of some tropane alkaloids in *Datura metel* / A.Z. Temerdashev, I.A. Kolychev, N.VOL. Kiseleva // *J. Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 67. – P. 960–966.

58 Eeva, M., Salo J., Oksman-Caldentey K. Determination of the main tropane alkaloids from transformed *Hyoscyamus muticus* plants by capillary zone electrophoresis / M. Eeva, J. Salo, K. Oksman-Caldentey // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – Vol. 16. – P. 717–722.

59 Keller, T. Analysis of psilocybin and psilocin in *Psilocybe subcubensis* GUZMÁN by ion mobility spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry / T. Keller, A. Schneider, P. Regenscheit, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 1999. – Vol. 99. – P. 93–105.

60 Acevska, J. Development and Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for determination of Alkaloids from *Papaver somniferum* / J. Acevska, A. Dimitrovska, G. Stefkov, [et al.] // *J. AOAC Int.* – 2012. – Vol. 95. – P. 399–405.

61 Ren, X. Determination of tropane alkaloids in *Przewalskia tangutica Maxim.* using capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection / X. Ren, Y. Ma, M. Zhou, [et al.] // Chinese J. Chromatogr. – 2008. – Vol. 26. – P. 223–227.

62 Kauppila, T.J. Direct analysis of cannabis samples by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry / T.J. Kauppila, A. Flink, U.M. Laakkonen, [et al.] // Drug Test. Anal. 2013. – Vol. 5. – P. 186–190.

63 De Backer, B. Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type cannabis cuttings and seedlings during growth of plants / B. De Backer, K. Maebe, A. G. Verstraete, [et al.] // J. Forensic Sci. – 2012. – Vol. 57. – P. 918–922.

64 Zhou, J.-L. Fingerprint Analysis of *Daturae Flos* Using Rapid Resolution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Combined with Stoichiometry / J.-L. Zhou, W. Liu, Z.-X. Guo, [et al.] // J. Liquid Chromatogr. Rel. Tech. – 2014. – Vol. 38. – P. 137–142.

65 Costin, J. W. Rapid determination of *Papaver somniferum* alkaloids in process streams using monolithic column high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection / J.W. Costin, S.W. Lewis, S.D. Purcell, [et al.] // Anal Chim Acta. – 2007. – Vol. 597. – P. 19–23.

66 Okamura, N. Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in Kampo medicines by high-performance liquid chromatography / N. Okamura, H. Miki, T. Harada, [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – Vol. 20. – P. 363–372.

67 Anastos, N. Determination of psilocin and psilocybin using flow injection analysis with acidic potassium permanganate and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection respectively / N. Anastos, N.W. Barnett, S.W. Lewis, [et al.] // Talanta. – 2005. – Vol. 67. – P. 354–359.

68 Tsujikawa, K. Morphological and chemical analysis of magic mushrooms in Japan / K. Tsujikawa, T. Kanamori, Y. Iwata, [et al.] *Forensic Sci. Int.* – 2003. – Vol. 138. – P.85–90.

69 Reid, R.G. Differentiation of opium and poppy straw using capillary electrophoresis and pattern recognition techniques / R.G. Reid, D.G. Durham, S.P. Boyle, [et al.] // *Anal Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 605. – P. 20–27.

70 Mroczek, T. Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of Datura and related alkaloids / T. Mroczek, K. Glowniak, J. Kowalska // *J. Chromatogr. A.* – 2006. – Vol. 1107. – P. 9–18.

71 Stolker, A.A. M. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography–ion trap mass spectrometry / A.A. M. Stolker, J. van Schoonhoven, A.J. de Vries, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – Vol. 1058. – P. 143–151.

72 Choi, Y.H. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers / Y. H. Choi, Y. W. Chin, J. Kim, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – Vol. 863. – P. 47–55.

73 Brachet, A. Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves / A. Brachet, P. Christen, J.Y. Gauvrit, [et al.] // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2000. – Vol. 43. – P. 353–366.

74 Caligiani, A. A validated GC–MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods / A. Caligiani, G. Palla, F. Bonzanini, [et al.] // *Food Chem.* – 2011. – Vol. 127. – P. 204–209.

75 Jakabova, S. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of Datura species / S. Jakabova, L. Vincze, A. Farkas, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1232. – P. 295–301.

76 McIlhenny, E.H. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry / E.H. McIlhenny, K.E. Pipkin, L.J. Standish, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216. – P. 8960.

77 Happyana, N. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR / N. Happyana, S. Agnolet, R. Muntendam, [et al.] // *Phytochem.* – 2013. – Vol. 87. – P. 51–59.

78 Chen, B.H. A general approach to the screening and confirmation of tryptamines and phenethylamines by mass spectral fragmentation / B.H. Chen, J.T. Liu, W.X. Chen, [et al.] // *Talanta.* – 2008. – Vol. 74. – P. 512–517.

79 Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes, WADA Technical Document – TD2015IDCR. – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf (дата обращения: 30.01.2021)

80 FDA Foods Program Guidelines for Chemical Methods. – Режим доступа: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM298730.pdf> (дата обращения: 31.01.2021)

81 El Bazaoui, A. Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS / A.El Bazaoui, M.A. Bellimam, A. Soulaymani // *Fitoterapia.* – 2011. – Vol. 82. – P. 193–197.

82 LeBelle, M.J. Chiral identification and determination of ephedrine, pseudoephedrine, methamphetamine and methcathinone by gas chromatography and nuclear magnetic resonance / M.J. LeBelle, C. Savard, B.A. Dawson, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 1995. – Vol. 71. – P. 215–223.

83 Jin, L. Chiral resolution of atropine, homatropine and eight synthetic troponyl and piperidinyll esters by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin additives / L. Jin, Y. Wang, R. Xu, [et al.] // *Electrophoresis.* – 1999. – Vol. 20. – P. 198–203.

84 Phinney, K.W. Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis / K.W. Phinney, T. Ihara, L. C. Sander // *J. Chromatogr. A.* – 2005. – Vol. 1077. – P. 90–97.

85 Haddi, Z. A portable electronic nose system for the identification of cannabis-based drugs / Z. Haddi, A. Amari, H. Alami, [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chem.* – 2011. – Vol. 155. – P. 456–463.

86 Ахунбабаев, Ю.Ш. Перспективы применения методов спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии) для обнаружения и идентификации взрывчатых веществ, наркотических средств и контрафактных фармацевтических препаратов: сборник докладов / Ю.Ш. Ахунбабаев, И.В. Рыбальченко, В.А. Соболев. – М.: ГУ НПО "СТиС" МВД России 2013. – С. 60.

87 *Rapid Testing Methods of drugs of abuse.* – NY: UN. – 1994. – 116 p.

88 Еремин, С.К. Анализ наркотических средств / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль. – 1993. – 274 с.

89 Nakamura, M. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing *Scopolia* extract / M. Nakamura, M. Ono, T. Nakajima, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – Vol. 37. – P. 231–237.

90 Temerdashev, A.Z. Evolution of new narcotic substances and methods of their determination / A.Z. Temerdashev, A.M. Grigor'ev, I.V. Rybal'chenko // *J. Anal. Chem.* – 2014. – Vol. 69. – P. 817–844.

91 Consideration of the major cannabinoid agonists. Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD). – Режим доступа: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/119149/acmd-report-agonists.pdf (дата обращения: 31.01.2021)

92 Министерство внутренних дел – Режим доступа: <https://www.mvd.ru> (дата обращения: 31.01.2021)

93 Uchiyama, N. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer

drugs in herbal products / N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, J. Ogata, Y. Goda // Forensic Sci. Int. – 2010. – Vol. 198. – P. 31–38.

94 Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Website. – режим доступа: <http://www.swgdrug.org/> (дата обращения: 31.01.2021)

95 Cayman Chemical. – Режим доступа: <https://www.caymanchem.com/> (дата обращения: 31.01.2021)

96 NIST Standard Reference Database 1A v14. – Режим доступа: <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm> (дата обращения: 31.01.2021)

97 Maurer, H.H. Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites 2011. – Режим доступа: <http://www.wiley-vch.de/publish/en/books/bySubjectCH00/ISBN3-527-32398-8/> (дата обращения: 31.01.2021)

98 Randox Toxicology. – Режим доступа: <http://www.randoxtoxicology.com/toxicology-drug-test-ELISA> (дата обращения: 31.01.2021)

99 Meyer, M.R. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System for GC-MS Screening for Drugs, Poisons, and Metabolites in Urine / M.R. Meyer, F.T. Peters, H.H. Maurer // Clin. Chem. – 2010. – Vol. 56. – P. 575–584.

100 Meyer, M.R. Current status of hyphenated mass spectrometry in studies of the metabolism of drugs of abuse, including doping agents / M.R. Meyer, H.H. Maurer // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – Vol. 402. – P. 195–208.

101 Wissenbach, D.K. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MSⁿ screening concept / D.K. Wissenbach, M.R. Meyer, D. Remane, [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – Vol. 400. – P. 3481–3489.

102 Dresen, S. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching / S. Dresen, N. Ferreirós, H. Gnann, [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 396. – P. 2425–2434.

103 Liu, H. Rapid screening and confirmation of drugs and toxic

compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry and automated library search / H. Liu, R. Liu, D. Lin, [et al.] // *Rap. Comm. Mass Spec.* – 2010. – VOL. 24. – P. 75–84.

104 Савчук, С.А. Применение метода фиксации времен удерживания при хромато-масс-спектрометрическом и хроматографическом определении наркотических средств / С.А. Савчук, Е.А. Симонов, В.И. Сорокин, [и др.] // *Журн. аналит. химии.* – 2004. – Т. 59. – №. 10. – С. 1059–1069.

105 Sundström, M. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine / M. Sundström, A. Pelander, V. Angerer // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 8463–8474.

106 Gottardo, R. Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS / R. Gottardo, A. Chiarini, I. Dal Prà, [et al.] // *J. Mass. Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 141–146.

107 Higuchi, M. Rapid Screening for Synthetic Cannabinoids and Cathinones Using Direct Analysis in Real Time (DART)-TOF-MS / M. Higuchi, K. Saito // *Bunseki Kagaku.* – 2012. – Vol. 61. – P. 705–711.

108 Musah, R.A., Direct analysis in real time mass spectrometry with collision-induced dissociation for structural analysis of synthetic cannabinoids / R.A. Musah, M.A. Domin, R.B. Cody, [et al.] // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 26. – P. 2335–2342.

109 Musah, R.A. Rapid identification of synthetic cannabinoids in herbal samples via direct analysis in real time mass spectrometry / R.A. Musah, M.A. Domin, M.A. Walling, [et al.] // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1109–1114.

110 Lesiak, A.D. DART-MS as a Preliminary Screening Method for “Herbal Incense”: Chemical Analysis of Synthetic Cannabinoids / A.D. Lesiak, R.A. Musah, M.A. Domin // *J. Forensic Sci.* – 2013. – Vol. 59. – P. 337–343.

111 Nakajima, J. Identification and quantitation of two benzoylindoles AM-694 and (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanone, and three cannabimimetic naphthoylindoles JWH-210, JWH-122, and JWH-019 as adulterants in illegal products obtained via the Internet / J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 95–110.

112 Шевырин, В.А. Информационное письмо для экспертных подразделений / В. А. Шевырин, В. П. Мелкозеров. – Екб.: 2010. – 34 с.

113 Шевырин, В.А. Информационное письмо для экспертных подразделений / В.А. Шевырин, В.П. Мелкозеров. – Екб.: 2011. – 36 с.

114 Шевырин, В.А. Информационное письмо для экспертных подразделений / В.. Шевырин, В.П. Мелкозеров. – Екб.: 2012. – 15 с.

115 Степущенко, О.А. Определение некоторых эндоканнабиноидов в растительных ароматических смесях «Спайс» / О.А. Степущенко, И.М. Фицев, И.Ю. Горшунов, [и др.] // *Судебная экспертиза.* – 2010. – № 1. – С. 40–50.

116 Ogata, J. DNA sequence analyses of blended herbal products including synthetic cannabinoids as designer drugs / J. Ogata, N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri // *Forensic Sci. Int.* – 2013. – Vol. 227. – P. 33–41.

117 Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health / A.M. Weinstein, P. Rosca, L. Fattore, [et al.] // *Front. Psychiatry.* – 2017. – Vol. 8. – 156.

118 Peters, F.T. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography–mass spectrometry to forensic and clinical toxicology—a review / F.T. Peters, D. Remane // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 403. – P. 2155–2172.

119 Taylor, P.J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry / P.J. Taylor // *Clin. Biochem.* – 2005. – Vol. 38. – P. 328–334.

120 Eeckhaut, A.VOL. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects / A.V. Eeckhaut, K. Lanckmans, S. Sarre // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – Vol. 877. – P. 2198–2207.

121 Trufelli, H. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry / H. Trufelli, P. Palma P., G. Famiglini // *Mass Spectrom. Revol.* – 2011. – Vol. 30. – P. 491–509.

122 Capiello, A. Overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry / A. Capiello, G. Famiglini, P. Palma, [et al.] // *Anal. Chem.* – 2008. – Vol. 80. – P. 9343–9348.

123 Kneisel, S. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction / S. Kneisel, VOL. Auwarter // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 825–835.

124 Hudson, S. Use of High-Resolution Accurate Mass Spectrometry to Detect Reported and Previously Unreported Cannabinomimetics in “Herbal High” Products / S. Hudson, J. Ramsey, L. King, [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2010. – Vol. 34. – P. 252–260.

125 Westphal, F. Ein neuer Wirkstoff in SPICE-artigen Kräutermischungen: Charakterisierung von JWH-250, seinen Methyl- und Trimethylsilylderivaten / F. Westphal, T. Junge, F. Sönnichsen, [et al.] // *Toxichem Krimtech.* – 2010. – Vol. 77. – P. 8–22.

126 Bononi, M. Analytical Data for Identification of the Cannabimimetic Phenylacetylindole JWH-203 / M. Bononi, P. Belgi, F. Tateo // *J. Anal. Toxicol.* – 2011. – Vol. 35. – P. 360–363.

127 Ernst, L. Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in “Spice-like” herbal incenses / L. Ernst, H.-M. Schiebel, C. Theuring // *Forensic Sci. Int.* – 2011. – Vol. 208. – P.e31–e35.

128 Hudson, S. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids / S. Hudson, J. Ramsey // *Drug Test. and Anal.* – 2011. – Vol. 3. – P. 466–478.

129 Kneisel, S. Cannabinoidmimetika: Massenspektren und IR-ATR-Spektren neuer Verbindungen aus den Jahren 2009/2010 / S. Kneisel, F. Westphal, P. Rösner // *Toxichem Krimtech.* – 2011. – Vol. 78. – P. 23–35.

130 Nakajima, J. Identification and quantitation of a benzoylindole (2-methoxyphenyl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanone and a naphthoylindole 1-(5-fluoropentyl-1*H*-indol-3-yl)-(naphthalene-1-yl)methanone (AM-2201) found in illegal products obtained via the Internet and their cannabimimetic effects evaluated by in vitro [³⁵S]GTPγS binding assays / J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto // *Forensic Toxicol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 132–141.

131 Nakajima, J. Identification and quantitation of cannabimimetic compound JWH-250 as an adulterant in products obtained via the Internet / J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 51–55.

132 Penn, H.J. Detection of synthetic cannabinoids in herbal incense products / H.J. Penn, L.J. Langman, D. Unold, [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 44. – P. 1163–1165.

133 Uchiyama, N. Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri // *Forensic Toxicol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 25–37.

134 Uchiyama, N. Identification of a Novel Cannabimimetic Phenylacetylindole, Cannabipiperidiethanone, as a Designer Drug in a Herbal Product and Its Affinity for Cannabinoid CB₁ and CB₂ Receptors / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri // *Chem. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 59. – №9. – P. 1203–1205.

135 Wende, M. Qualitative and quantitative analysis of synthetic cannabinoids in smoking mixtures of the “Spice” type using LC-MS/MS / M. Wende, J. Schaper // *Toxichem Krimtech.* – 2011. – Vol. 78. – P. 297–301.

136 Zuba, D. Rapid detection of *Aspergillus flavus* in rice using biofunctionalized carbon nanotube field effect transistors / D. Zuba, B. Byrska, M. Maciow // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 400. – P. 119–126.

137 Couch, R. A. Phenazepam and cannabinomimetics sold as herbal highs in New Zealand / R. A. Couch, H. Madhavaram // *Drug Test. Anal.* – 2012. – Vol. 4. –

P. 409–414.

138 Use of SPME-HS-GC–MS for the Analysis of Herbal Products Containing Synthetic Cannabinoids / A. O. Cox, R. C. Daw, M. D. Mason, [et. al] // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 293–302.

139 Dunham, S.J.B. Identification, extraction and quantification of the synthetic cannabinoid JWH-018 from commercially available herbal marijuana alternatives / S.J.B. Dunham, P.D. Hooker, R.M. Hyde // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 223. – P. 241–244.

140 Ernst, L. Synthetic cannabinoids in “spice-like” herbal blends: First appearance of JWH-307 and recurrence of JWH-018 on the German market / L. Ernst, K. Krüger, R. Lindigkeit // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 222. – P. 216–222.

141 Ginsburg, B.C. Purity of Synthetic Cannabinoids Sold Online for Recreational Use / B.C. Ginsburg, L.R. McMahon, J.J. Sanchez // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 66–68.

142 Grabenauer, M. Analysis of synthetic cannabinoids using high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering: Implications for non-targeted screening of designer drugs / M. Grabenauer, W.L. Krol, J.L. Wiley // *Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 84. – P. 5574–5581.

143 Jankovics, P. Detection and identification of the new potential synthetic cannabinoids 1-pentyl-3-(2-iodobenzoyl)indole and 1-pentyl-3-(1-adamantoyl)indole in seized bulk powders in Hungary / P. Jankovics, A. Varadi, L. Tolgyesi // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 214. – P. 27–32.

144 Kneisel, S. Identification of the cannabimimetic AM-1220 and its azepane isomer (*N*-methylazepan-3-yl)-3-(1-naphthoyl)indole in a research chemical and several herbal mixtures / S. Kneisel, P. Bisel, VOL. Brecht // *Forensic Toxicol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 126–134.

145 Comprehensive review of the detection methods for synthetic cannabinoids and cathinones / A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2015. – Vol. 33. – № 2. – P. 175–194.

146 Logan, B.K. Identification of synthetic cannabinoids in herbal incense blends in the United States / B.K. Logan, L.E. Reinhold, A.Xu. [et al.] // *J. Forensic Sci.* – 2012. – Vol. 57. – P. 1168–1180.

147 Merola, G. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography / G. Merola, Z. Aturki, G. D'Orazio // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 71. – P. 45–53.

148 Moosman, B. Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[(5-fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl]-(4-methylnaphthalen-1-yl)methanone using GC–MS, NMR analysis and a flash chromatography system / B. Moosman, S. Kneisel, U. Girreser // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 220. – P. e17–e22.

149 Moosmann, B. A fast and inexpensive procedure for the isolation of synthetic cannabinoids from ‘Spice’ products using a flash chromatography system / B. Moosman, S. Kneisel, A. Wohlfarth // *Anal Bioanal Chem.* – 2012. – Vol. 405. – P. 3929–3929.

150 Nakajima, J. Identification and quantitation of two new naphthoylindole drugs-of-abuse, (1-(5-hydroxypentyl)-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone (AM-2202) and (1-(4-pentenyl)-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanone, with other synthetic cannabinoids in unregulated “herbal” products circulated in the Tokyo area / J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 33–44.

151 Sekuła, K. Identification of naphthoylindoles acting on cannabinoid receptors based on their fragmentation patterns under ESI-QTOF MS / K. Sekuła, D. Zuba, R. Stanaszek // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 632–643.

152 Shanks, K.G. Analysis of First and Second Generation Legal Highs for Synthetic Cannabinoids and Synthetic Stimulants by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Time of Flight Mass Spectrometry / K. G. Shanks, T. Dahn, G. Behonick // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 360–371.

153 Simolka, K. Analysis of synthetic cannabinoids in “spice-like” herbal

highs: snapshot of the German market in summer 2011 / K. Simolka, R. Lindigkeit, H.M. Schiebel // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 404. – P. 157–171.

154 Uchiyama, N. Identification of two new-type synthetic cannabinoids, *N*-(1-adamantyl)-1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxamide (APICA) and *N*-(1-adamantyl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (APINACA), and detection of five synthetic cannabinoids, AM-1220, AM-2233, AM-1241, CB-13 (CRA-13), and AM-1248, as designer drugs in illegal products / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 114–125.

155 Uchiyama, N. URB-754: A new class of designer drug and 12 synthetic cannabinoids detected in illegal products / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2013. – Vol. 227. – P. 21–32.

156 Valoti, E. Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole detected for the first time in “herbal high” products on the Italian market / E. Valoti, E. Casagni, L. Dell'acqua // *Forensic Sci Int.* – 2012. – Vol. 223. – P. e42–e46.

157 Westphal, F. Identification of 1-butyl-3-(1-(4-methyl)naphthoyl)indole in a herbal mixture / F. Westphal // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 215. – P. 8–13.

158 Choi, H. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS / H. Choi, S. Heo, S. Choe, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 3937–3944.

159 Choi, H. Identification of (1-pentylindol-3-yl)-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone and its 5-pentyl fluorinated analog in herbal incense seized for drug trafficking / H. Choi, S. Heo, E. Kim, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 86–92.

160 Denooz, R. Identification and Structural Elucidation of Four Cannabimimetic Compounds (RCS-4, AM-2201, JWH-203 and JWH-210) in Seized Products / R. Denooz, J.-C. Vanheugen, M. Frederich // *J. Anal. Toxicol.* – 2013. – Vol. 37. – P. 56–63.

161 Gregori, A. Identification of two cannabimimetic compounds WIN48098 and AM679 in illegal products / A. Gregori, F. Damiano, M. Bonavia, [et al.] // *Sci.*

Justice. – 2013. – Vol. 53. – P. 286–292.

162 Ibáñez, M. Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry screening for synthetic cannabinoids in herbal blends / M. Ibáñez, L. Bijlsma, A.L. van Nuijs, [et al.] // J. Mass Spectrom. – 2013. – Vol. 48. – P. 685–694.

163 Langer, N. Identification and quantification of synthetic cannabinoids in ‘spice-like’ herbal mixtures: A snapshot of the German situation in the autumn of 2012 / N. Langer, R. Lindigkeit, H. M. Schiebel, [et al.] // Drug Test. Anal. 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 59–71.

164 Park, Y. Identification of a new synthetic cannabinoid in a herbal mixture: 1-butyl-3-(2-methoxybenzoyl)indole / Y. Park, C. Lee, H. Lee, [et. al] // Forensic Toxicol. – 2013. – Vol. 31. – P. 187–196.

165 Shanks, K.G. Identification of novel third-generation synthetic cannabinoids in products by ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry / K.G. Shanks, G.S. Behonick, T. Dahn, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2013. – Vol. 37. – № 8. – P. 517–525.

166 Shevyrin, V. Identification and analytical properties of new synthetic cannabinimimetics bearing 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarbonyl moiety / V. Shevyrin, V. Melkozerov, A. Nevero, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2013. – Vol. 226. – P. 62–73.

167 Shevyrin, V. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid / V. Shevyrin, V. Melkozerov, A. Nevero, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2013. – Vol. 232. – P. 1–10.

168 Kavanagh, P. UR-144 in products sold *via* the Internet: Identification of related compounds and characterization of pyrolysis products / P. Kavanagh, A. Grigoryev, S. Savchuk, [et al.] // Drug Test. Anal. – 2013. – Vol. 5. – P. 683–692.

169 Takahashi, K. Identification and quantitation of JWH-213, a cannabinimimetic indole, as a designer drug in a herbal product / K. Takahashi, N. Uchiyama, T. Fukiwake, [et. al] // Forensic Toxicol. – 2013. – Vol. 31. – P. 145–150.

170 Thomas, B.F. Analytical surveillance of emerging drugs of abuse and

drug formulations / B.F. Thomas, G.T. Pollard, M. Grabenauer // *Life Sci.* – 2013. – Vol. 92. – P. 512–519.

171 Uchiyama, N. Two new-type cannabimimetic quinolinyl carboxylates, QUPIC and QUCHIC, two new cannabimimetic carboxamide derivatives, ADB-FUBINACA and ADBICA, and five synthetic cannabinoids detected with a thiophene derivative α -PVT and an opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 223–240.

172 Uchiyama, N. New cannabimimetic indazole derivatives, *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products / N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri // *Forensic Toxicol.* 2013. Vol. 31. P. 93–100.

173 Identification of two new-type designer drugs, piperazine derivative MT-45 (I-C6) and synthetic peptide Noopept (GVS-111), with synthetic cannabinoid A-834735, cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP, and phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal products / N. Uchiyama, S. Matsuda, M. Kawamura, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 32. – P. 9–18.

174 Identification of a synthetic cannabinoid A-836339 as a novel compound found in a product / N. Uemura, H. Fukaya, C. Kanai, [et. al] // *Forensic Toxicol.* – 2013. Vol. 32. – P. 45–50.

175 [1-(Tetrahydropyran-4-ylmethyl)-1*H*-indol-3-yl]-(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanone: a new synthetic cannabinoid identified on the drug market / D. Zuba, B. Gepper, K. Sekuła, [et al.] // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 281–291.

176 Uchiyama, N. Two new synthetic cannabinoids, AM-2201 benzimidazole analog (FUBIMINA) and (4-methylpiperazin-1-yl)- (1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanone (MEPIRAPIM), and three phenethylamine derivatives, 25H-NBOMe 3,4,5-

trimethoxybenzyl analog, 25B-NBOMe, and 2C-N-NBOMe, identified in illegal products / N. Uchiyama, Y. Shimokawa, S. Matsuda // *Forensic Toxicol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 105–115.

177 Химическая структура и идентификация новых синтетических наркотических средств, входящих в состав курительных смесей / В. П. Мелкозеров, А. С. Неверо, А. В. Торицин, [и др.] // *Судебная экспертиза.* – 2012. – № 1. – С. 107–120.

178 Tsujikawa, K. Thermal degradation of a new synthetic cannabinoid QUPIC during analysis by gas chromatography–mass spectrometry / K. Tsujikawa, T. Yamamuro, K. Kuwayama // *Forensic Toxicol.* – 2014. – VOL. 32. – P. 201–207.

179 Неверо, А.С. Масс-спектрометрические характеристики новых психоактивных веществ – «дизайнерских наркотиков» / А.С. Неверо, И.М. Фицев, В.П. Мелкозеров, [и др.] // *Судебный эксперт.* – 2012. – № 1. – С. 119–135.

180 The use of cyclohexanone as a “derivatizing” reagent for the GC–MS detection of amphetamines and ephedrines in seizures and the urine / B.M. El-Haj, A. M. Al-Amri, M. H. Hassan, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – Vol. 135. – P. 16–26

181 Mass and NMR spectroscopic characterization of 3,4-methylenedioxypropiovalerone: A designer drug with α -pyrrolidinophenone structure / F. Westphal, T. Junge, P. Rosner, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2009. – Vol. 190. – P. 1–8.

182 Mass spectral and NMR spectral data of two new designer drugs with an α -aminophenone structure: 4'-Methyl- α -pyrrolidinohexanophenone and 4-methyl- α -pyrrolidinobutyrophenone / F. Westphal, T. Junge, P. Rosner, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2007. – Vol. 169. – P. 32–42.

183 Identification of ten new designer drugs by GC-MS, UPLC-QTOF-MS, and NMR as part of a police investigation of a Danish Internet company / L.A. Reitzel, P.W. Dalsgaard, I.B. Müller, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2012. – Vol. 4. – P. 342–354.

184 Hays, P.A. The Characterization of 2-(3-Methoxyphenyl)-2-

(ethylamino)cyclohexanone (Methoxetamine) / P.A. Hays, J.F. Casale, A.L. Berrier // *Microgram J.* – 2012. – Vol. 9. – №1. – P. 3–17.

185 Мелкозеров, В.П. Аналитические характеристики 4-метилэтакатина (4-МЕС) и N-метилбутилона (bkMMBDB), двух распространенных «структурных аналогов» наркотических средств мефедрона и метилона / В.П. Мелкозеров, В.А. Шевырин // *Судебная экспертиза.* – 2011. – № 1. – С. 10–18

186 Шевырин, В.А. Новые «дизайнерские наркотики» 4'-метил- α -пирролидинопропиофенон (MPPP) и 3',4'-метилендиокси- α -пирролидинобутирофенон (MDPBP) – «структурные аналоги» психотропного вещества пировалерона, их идентификация и аналитические характеристики / В.А. Шевырин, В. П. Мелкозеров // *Судебная экспертиза.* – 2011. – № 3. – С. 67–78.

187 Шевырин, В.А. Дизайнерские наркотики. Аналитические характеристики новых наркотических средств пентедрона и 3,4-диметилметкатина / В.А. Шевырин, В. П. Мелкозеров // *Судебная экспертиза.* – 2012. – № 1. – С. 125–137.

188 Analysis of NRG 'legal highs' in the UK: identification and formation of novel cathinones / S.D. Brandt, S. Freeman, H.R. Sumnall, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3. – P. 569–575.

189 Analyses of second-generation 'legal highs' in the UK: Initial findings / S.D. Brandt, S. Freeman, H.R. Sumnall, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2010. – Vol. 2. – P. 377–382.

190 Favretto, D. New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the "New Psychoactive Substances" / D. Favretto, J.P. Pascali, F. Tagliaro // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1287. – P. 84–95.

191 Clinical experience with and analytical confirmation of "bath salts" and "legal highs" (synthetic cathinones) in the United States / H.A. Spiller, M.L. Ryan, R.G. Weston, [et al.] // *Clin. Toxicol.* 2011. Vol. 49. P. 499–505.

192 Temerdashev, A.Z. Screening and determination of some natural and synthetic drugs using chromatographic methods / A.Z. Temerdashev, N.V. Kiseleva,

V.G. Matvienko // Тез. докл. 8th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications. Салоники (Греция). 2013. – С. 116.

193 Zadik Z. Hormonal and metabolic effects of nutrition in athletes / Z. Zadik, D. Nemet, A. Eliakim // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 22. – № 9. – P. 769–777.

194 Jenkinson D.M., Supplements and sports / D.M. Jenkinson, A.J. Harbert // Am. Fam. Physician – 2008. – Vol. 78. – № 9. – P.1039–1046.

195 Bishop D. Dietary supplements and team-sport performance / D. Bishop // Sports Med. – 2010. – Vol. 40. – № 12. – P. 995–1017.

196 Geyer H., A-Z of dietary supplements: Dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance – Part 22 // H. Geyer, H. Braun, L.M. Burke, [et al.] // Br. J. Sports Med. – 2011. – Vol. 45. – № 9 – P. 752–754.

197 World Anti-Doping Code, World Anti-Doping Agency. – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf (дата обращения: 27.01.2021).

198 Nutraceuticals Product Market is Expected to Reach USD 204.8 Billion Globally in 2017, Transparency Market Research. – Режим доступа: <https://www.transparencymarketresearch.com/global-nutraceuticals-product-market.html> (дата обращения: 27.01.2021).

199 FDA 101: Dietary Supplements, Food and Drug Administration. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/fda-101-dietary-supplements#:~:text=The%20law%20defines%20dietary%20supplements,used%20to%20supplement%20the%20diet> (дата обращения: 27.01.2021).

200 Sundgot-Borgen J., Dietary supplements in Norwegian elite athletes – impact of international ranking and advisors / J. Sundgot-Borgen, B. Berglund, K.M. Torstveit // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 2003. – Vol. 13. – № 2. – P. 138–144.

201 Sobal J., Vitamin/mineral supplement use among athletes: A review of the literature / J. Sobal, L.F. Marquart // *Int. J. Sport. Nutr.* – 1994. – Vol. 4. – № 4. – P. 320–334.

202 Erdman K.A., Influence of performance level on dietary supplementation in elite Canadian athletes / K.A. Erdman, T.S. Fung, R.A. Reimer // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2006. – Vol. 38. – № 2. – P. 349–356.

203 Maughan R.J., The use of dietary supplements by athletes / R.J. Maughan, F. Depiesse, H. Geyer // *J. Sports Sci.* – 2007. – Vol. 25. – P. 103–113.

204 Striegel H., The use of dietary supplements among master athletes / H. Striegel, P. Simon, C. Wurster, [et al.] // *Int. J. Sports Med.* – 2006. – Vol. 27. – № 3. – P. 236–241.

205 Geyer H., Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances / H. Geyer, M.K. Parr, K. Koehler, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2008. – Vol. 43. – № 7 – P. 892–902.

206 Harel Z., The frequency and characteristics of dietary supplement recalls in the United States / Z. Harel, S. Harel, R. Wald, [et al.] // *JAMA Intern. Med.* – 2013. – Vol. 173. – № 10. P. 926–928.

207 Bell D.G., Effect of ingesting caffeine and ephedrine on 10 km run performance / D.G. Bell, T.M. McLellan, C.M. Sabiston // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2002. – Vol. 34. – № 2. – P. 344–349.

208 Bell D.G., Effect of caffeine and ephedrine ingestion on anaerobic exercise performance / D.G. Bell, I. Jacobs, K. Ellerington // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2001. – Vol. 33. – № 8. – P. 1399–1403.

209 Shekelle P.G., Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: A meta-analysis / P.G. Shekelle, M.L. Hardy, S.C. Morton, [et al.] // *JAMA.* – 2003. – Vol. 289. – № 12. – P. 1537–1545.

210 Chu K.S., A moderate dose of pseudoephedrine does not alter muscle contraction strength or anaerobic power / K.S. Chu, T.J. Doherty, G. Parise // *Clin. J. Sport Med.* – 2002. – Vol. 12. – № 6 – P. 387–390.

211 Gillies H., Pseudoephedrine is without ergogenic effects during prolonged exercise / H. Gillies, W.E. Derman, T.D. Noakes, [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1996. – Vol. 81. – № 6. – P. 2611–2617.

212 Hodges K., Pseudoephedrine enhances performance in 1500 m runners / K. Hodges, S. Hancock, K. Currell, [et al.] // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2006. – Vol. 38. – № 2. – P. 329–333.

213 Jung J., Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss / J. Jung, M. Hermanns-Clausen, W. Weinmann // *Forensic Sci. Int.* – 2006. – Vol. 161. – № 2–3. P. 221–222.

214 Vidal C., Identification of a sibutramine-metabolite in patient urine after intake of a “pure herbal” Chinese slimming product / C. Vidal, S. Quandt // *Ther. Drug. Monit.* – 2006. – Vol. 28. – № 5. – P. 690–692.

215 Stimulants and doping in sport / M. Thevis, G. Sigmund, H. Geyer, [et al.] // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 2010. – Vol. 39. – № 1. – P. 89–105.

216 Eliason M.J., Case reports: Death of active duty soldiers following ingestion of dietary supplements containing 1,3-dimethylamylamine (DMAA) / M.J. Eliason, A. Eichner, A. Cancio, [et al.] // *Mil. Med.* – 2012. – Vol. 177. – № 12. – P. 1455–1459.

217 Mass spectrometric analysis of residual clenbuterol enantiomers in swine, beef and lamb meat by liquid chromatography tandem mass spectrometry / Z. L. Wang, J. L. Zhang, Y. N. Zhang, [et al.] // *Anal. Meth.* – 2016. – Vol 8. – P. 4127–4133.

218 The use of a valid and straightforward method for the identification of higenamine in dietary supplements in view of anti-doping rule violation cases / K. Grucza, K. Kowalczyk, M. Wicka, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2019. – Vol. 11. – P. 912–917.

219 Yun J. Monitoring of the amphetamine-like substances in dietary supplements by LC-PDA and LC-MS/MS / J. Yun, K. Kwon, J. Choi, [et al.] // *Food Sci. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 26. – № 5. – P. 1185–1190.

220 ElSohly M.A. LC–MS-MS Analysis of Dietary Supplements for N-ethyl-a-ethyl-phenethylamine (ETH), N, N-diethylphenethylamine and Phenethylamine / M.A. ElSohly, W. Gul // *J. Anal. Tox.* – 2014. – Vol. 38. – P. 63–72.

221 Lisi A. Studies of methylhexaneamine in supplements and geranium oil / A. Lisi, N. Hasick, R. Kazlauskas // *Drug Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3. – P. 873–876.

222 Rapid assessment of the illegal presence of 1,3-dimethylamylamine (DMAA) in sports nutrition and dietary supplements using ¹H NMR spectroscopy / Y.B. Monakhova, M. Ilse, J. Hengen, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2014. – Vol. 6. – P. 944–948.

223 Gurley B.J. Ephedrine-Type Alkaloid Content of Nutritional Supplements Containing Ephedra sinica (Ma-huang) As Determined by High Performance Liquid Chromatography / B.J. Gurley, P. Wang, S.F. Gardner // *J. Pharm. Sci.* – 1998. – Vol. 12. – № 12. – P. 1547–1553.

224 Stepan R. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the determination of anabolic steroids and related compounds in nutritional supplements / R. Stepan, R. Cuhra, S. Barsova // *Food Add. Cont.: Part A.* – 2008. – Vol. 25. – № 5. – P. 557–565.

225 Research of stimulants and anabolic steroids in dietary supplements / N. Baume, N. Mahler, M. Kamber [et al.] // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 2006. – Vol. 16. – P. 41–48.

226 Detection and determination of anabolic steroids in nutritional supplements / K.J.S. De Cock, F.T. Delbeke, P. Van Eenoo [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2001. – Vol. 25. – P. 843–852.

227 Analysis of Non-Hormonal Nutritional Supplements for Anabolic-Androgenic Steroids – Results of an International Study / H. Geyer, M.K. Parr, U. Mareck, [et al.] // *Int. J. Sports Med.* – 2004. – Vol. 25. – P. 124–129.

228 Application of UHPLC and GC/MS for Detection of Hidden Drugs in Traditional Hand-Made Herbal Slimming Products / T. Tahamtan, M. Akhgari, Z. Mousavi, [et al.] // *J. Nat. Pharm. Prod.* – 2020. – Vol. 15. – № 3. – e82992.

229 Judkins C.M.G The role of banned substance residue analysis in the control of dietary supplement contamination / C.M.G. Judkins, P. Teale, D.J. Hall // *Drug Test. Anal.* – 2010. – Vol. 2 – P. 417–420

230 Judkins C.M.G Supplements and Inadvertent Doping – How Big Is the Risk to Athletes? / C.M.G. Judkins, P. Prock // *Med. Sport Sci.* – 2013. – Vol. 59. – P. 143–152.

231 Van der Bijl P. Dietary supplements containing prohibited substances: A review (Part 1) / P. van der Bijl // *South African J Sports Med.* – 2014. – Vol. 26. – № 2. – P. 59–61.

232 Van der Bijl P. Dietary supplements containing prohibited substances: A review (Part 2) / P. van der Bijl // *South African J Sports Med.* – 2014. – Vol. 26. – № 3. – P. 87–90.

233 Intended or Unintended Doping? A Review of the Presence of Doping Substances in Dietary Supplements Used in Sports / J.M. Martinez-Sanz, I. Sospedra, C.M. Ortiz, [et al.] // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 9. – P.1–22.

234 Mathews N.M. Prohibited Contaminants in Dietary Supplements / N.M. Mathews // *Sports Health.* – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 19–30.

235 Use of nutritional supplements contaminated with banned doping substances by recreational adolescent athletes in Athens, Greece / K. Tsarouhas, N. Kioukia-Fougia, P. Papalexis, [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2018. – Vol. 115. – P. 447–450.

236 Protein Supplements and Their Relation with Nutrition, Microbiota Composition and Health: Is More Protein Always Better for Sportspeople? / A. Karlund, C. Gomez-Gallego, A.M. Turpeinen // *Nutrients.* – 2019. – Vol. 11. – P. 829–848.

237 Dietary Supplement and Food Contaminations and Their Implications for Doping Controls / K. Walpurgis, A. Thomas, H. Geyer, [et al.] // *Foods*. – 2020. – Vol. 9. – P. 1012–1033.

238 The nuclear receptor superfamily: the second decade / D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato [et al.] // *Cell*. – 1995. – Vol. 83, N 6. – P. 835–839.

239 Gao, W. Chemistry and structural biology of androgen receptor / W. Gao, C.E. Bohl, J.T. Dalton // *Chem Rev*. – 2005. – Vol. 105, N 9. – P. 3352–3370.

240 McEwan, I.J. Androgen receptor modulators: a marriage of chemistry and biology / I.J. McEwan // *Fut. Med. Chem*. – 2013. – Vol. 5, N 10. – P. 1109–1120.

241 Androgen receptor: an overview / C. Chang, A. Saltzman, S. Yeh [et al.] // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. – 1995. – Vol. 5, N 2. – P. 97–125.

242 Chengalvala, M. Selective androgen receptor modulators / M. Chengalvala, T. Oh, A.K. Roy // *Expert Opin. Ther. Patents*. – 2003. – Vol. 13. – P. 59–66.

243 Davey, R.A. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside / R.A. Davey, M. Grossmann // *Clin. Biochem. Rev*. – 2016. Vol. 37, N 1. – P. 3–15.

244 Gao, W. Expanding the therapeutic use of androgens via selective androgen receptor modulators (SARMs) / W. Gao, G.T. Dalton // *Drug. Discov. Today*. – 2007. – Vol. 12, N 5-6. – P. 241–248.

245 Palvimo, J.J. The androgen receptor / J.J. Palvimo // *Mol. Cell. Endocrinol*. – 2012. – Vol. 352, N 1-2. – P. 1–3.

246 Narayanan, R. Development of selective androgen receptor modulators (SARMs) / R. Narayanan, C.C. Coss, J.T. Dalton // *Mol. Cell. Endocrinol*. – 2018. – Vol. 465. – P. 134–142.

247 Thevis, M. Screening for metabolically stable aryl-propionamide derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes / M. Thevis, M. Kamber, W. Schänzer // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom*. – 2006. – Vol. 20, N 5. – P. 870–876.

248 A selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception / J. Chen, D.J. Hwang, C.E. Bohl [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 312, N 2. – P. 546–553.

249 Choi, S.M. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids / S.M. Choi, B.M. Lee // *Expert Opin. Drug Saf.* – 2015. – Vol. 14, N 11. – P. 1773–1785.

250 The para substituent of S-3-(phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamides is a major structural determinant of in vivo disposition and activity of selective androgen receptor modulators / J. Kim, D. Wu, D.J. Hwang [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 315, N 1. – P. 230–239.

251 Pharmacokinetics of S-3-(4-acetylamino-phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamide in rats, a non-steroidal selective androgen receptor modulator / J. D. Kearbey, D. Wu, W. Gao [et al.] // *Xenobiotica.* – 2004. – Vol. 34, N 3. – P. 273–280.

252 Design, Synthesis, and Biological Characterization of Metabolically Stable Selective Androgen Receptor Modulators / C.A. Marhefka, W. Gao, K. Chung K [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47, N 4. – P. 993–998.

253 Absorption, distribution, metabolism and excretion of the novel SARM GTx-024 [(S)-N-(4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-cyanophenoxy)-2-hydroxy-2-methylpropanamide] in rats / J. Kim, R. Wang, K.A. Veverka [et al.] // *Xenobiotica.* – 2013. – Vol. 43, N 11. – P. 993–1009.

254 Preclinical characterization of a (S)-N-(4-cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-3-(3-fluoro, 4-chlorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propanamide: a selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception / A. Jones, J. Chen, D.J. Hwang [et al.] // *Endocrinology.* – 2009. – Vol. 150, N 1. – P. 385–395.

255 An orally active selective androgen receptor modulator is efficacious on bone, muscle, and sex function with reduced impact on prostate / J.N. Miner, W.

Chang, M.S. Chapman [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148, N 1. – P. 363–73.

256 Zhang, X. Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm / X. Zhang, Z. Sui // *Expert. Opin. Drug. Discov.* – 2013. – Vol. 8, N 2. – P. 191–218.

257 In vitro metabolism studies on the selective androgen receptor modulator (SARM) LG121071 and its implementation into human doping controls using liquid chromatography-mass spectrometry / A. Knoop, O. Krug, M. Vincenti [et al.] // *Eur. J. Mass. Spectrom. (Chichester)*. – 2015. – Vol. 21, N 1. – P. 27–36.

258 Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation after single and multiple ascending doses of a novel selective androgen receptor modulator in healthy subjects / I. Bhattacharya, S. Tarabar, Y. Liang [et al.] // *Clin. Ther.* – 2016. – Vol. 38, N 6. – P. 1401–1416.

259 Mechanism of the tissue-specific action of the selective androgen receptor modulator S-101479 / K. Furuya, N. Yamamoto, Y. Ohyabu [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2013. – Vol. 36, N 3. – P. 442–451.

260 Synthesis and SAR of novel hydantoin derivatives as selective androgen receptor modulators / X. Zhang, G.F. Allan, T. Sbriscia [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – Vol. 16, N 22. – P. 5763–5766.

261 Nique, F. et al. Identification of a 4-(hydroxymethyl)diarylhydantoin as a selective androgen receptor modulator / F. Nique, S. Hebbe, N. Triballeau [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55, N 19. – P. 8236–8247.

262 Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer / J.T. Dalton, R.P. Taylor, M.L. Mohler [et al.] // *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* – 2013. – Vol. 7, N 4. – P. 345–351.

263 Krug, O. et al. Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010–2013 / O. Krug, A. Thomas, K. Walpurgis [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 70, N 11. – P. 1303–1311.

264 A selective androgen receptor modulator with minimal prostate hypertrophic activity restores lean body mass in aged orchidectomized male rats / G. Allan, T. Sbriscia, O. Linton [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 110, N 3-5. – P. 207–213.

265 Design, Synthesis, and Preclinical Characterization of the Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) RAD140 / C.P. Miller, M. Shomali, C.R. Lyttle [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 2, N 2. – P. 124–129.

266 World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2008 Prohibited List. International Standard. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf (дата обращения: 27.01.2021).

267 Synthesis of potent, substituted carbazoles as selective androgen receptor modulators (SARMs) / C.P. Miller, P. Bhaket, N. Muthukaman [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20, N 24. – P. 7516–7520.

268 Disposition and metabolism of LY2452473, a selective androgen receptor modulator, in humans / P. Yi, J.F. Rehmel, K. Cassidy [et al.] // *Drug. Metab. Dispos.* – 2012. – Vol. 40, N 12. – P. 2354–2364.

269 Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs) Part III: Discovery of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzotrile derivative 2f as a clinical candidate / K. Aikawa, M. Asano, K. Ono [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 25, N 13. – P. 3330–3349.

270 Akita, K. et al. A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate / K. Akita, K. Harada, J. Ichihara [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 720, N 1-3. – P. 107–114.

271 Comprehensive plasma-screening for known and unknown substances in doping controls / A. Thomas, S. Guddat, M. Kohler, [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24. – № 8. – P. 1124–1132.

272 Thevis, M. Detection of SARMs in doping control analysis / M. Thevis, W. Schänzer // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2018. – Vol. 464. – P. 34–45.

273 Discovery of the selective androgen receptor modulator MK-0773 using a rational development strategy based on differential transcriptional requirements for androgenic anabolism versus reproductive physiology / A. Schmidt, D.B. Kimmel, C. Bai [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 22. – P. 17054–17064.

274 Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) for routine doping control purposes / M. Thevis, A. Thomas, G. Fusshöller [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2010. – Vol. 24, N 15. – P. 2245–2254.

275 SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: A case report / E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy [et al.] // *Forensic. Sci. Int.* – 2011. – Vol. 213, N 1-3. – P. 104–108.

276 Starcevic, B. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample / B. Starcevic, B.D. Ahrens, A.W. Butch [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2013. – Vol. 5, N 5. – P. 377–379.

277 Detection of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) in a routine equine blood doping control sample / A.T. Cawley, C. Smart, C. Greer [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2016. – Vol. 8, N 2. – P. 257–261.

278 High-throughput screening for various classes of doping agents using a new dilute-and-shoot liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach / S. Guddat, E. Solymos, A. Orlovius [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2011. – Vol. 3, N 11-12. – P. 836–850.

279 Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performance liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry / C. Görgens, S. Guddat, A. Thomas [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 131. – P. 482–496.

280 Применение УВЭЖХ-МС/МС для определения в моче некоторых анаболических агентов и ноотропов / Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22, № 1. – С. 28–34.

281 Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens / M. Thevis, E. Gerace, A. Thomas [et al.] // Drug. Test. Anal. – 2010. – Vol. 2. N 11-12. – P. 589–598.

282 Determination of benzimidazole- and bicyclic hydantoin-derived selective androgen receptor antagonists and agonists in human urine using LC–MS/MS / M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – Vol. 391. N 1. – P. 251–261.

283 Doping control analysis of emerging drugs in human plasma – identification of GW501516, S-107, JTV-519, and S-40503 / M. Thevis, S. Beuck, A. Thomas [et al.] // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. – 2009. – Vol. 23, N 8. – P. 1139–1146.

284 Investigation of the selective androgen receptor modulators S1, S4 and S22 and their metabolites in equine plasma using high-resolution mass spectrometry / A. Hansson, H. Knych, S. Stanley [et al.] // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. – 2016. – Vol. 30, N 7. – P. 833–842.

285 Pharmacokinetics and metabolism of a selective androgen receptor modulator in rats: implication of molecular properties and intensive metabolic profile to investigate ideal pharmacokinetic characteristics of a propanamide in preclinical study / D. Wu, Z. Wu, J. Yang [et al.] // Drug. Metab. Dispos. – 2006. – Vol. 34, N 3. – P. 483–494.

286 Investigation of stability of selective androgen receptor modulators in urine / E. Ventura, A. Gadaj, T. Buckley, [et al.] // Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Asses. – 2020. – Vol. 37, № 8. – P. 1253–1263.

287 Cox, H.D. Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples / H.D. Cox, D. Eichner // Drug. Test. Anal. – 2017. – Vol. 9, N 1. – P. 127–134.

288 Starcevic, B. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample / B. Starcevic, B.D. Ahrens, A.W. Butch [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2013. – Vol. 5, N 5. – P. 377–379.

289 Doping control analysis of tricyclic tetrahydroquinoline-derived selective androgen receptor modulators using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / M. Thevis, M. Kohler, A. Thomas [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2008. – Vol. 22, N 16. – P. 2471–2478.

290 Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis / M. Thevis, M. Kohler, J. Maurer [et al.] // *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* – 2007. – Vol. 21, N 21. – P. 3477–3486.

291 Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes / A. Hansson, H. Knych, S. Stanley [et al.] // *Drug. Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7, N 8. – P. 673–683.

292 Hulme, S. The source and diversion of pharmaceutical drugs for nonmedical use: A systematic review and meta-analysis / S. Hulme, D. Bright, S. Nielsen // *Drug Alcohol Depend.* – 2018. – V. 86. – P. 242-256.

293 World Drug Report 2020, United Nations publication. – Режим доступа: https://wdr.unodc.org/wdr2020/field/WDR20_BOOKLET_6.pdf (дата обращения 27.01.2021)

294 Порсева, Н. Регламентация, обращения лекарственных препаратов, производных бензодиазепина / Н. Порсева, О. Дворская, А. Солонина // *Современ. проблемы науки и обр.* – 2013. - №3.- С.3-9.

295 Manchester, K.R. The emergence of new psychoactive substance (NPS) benzodiazepines: A review / K.R. Manchester, E.C. Lomas, L. Waters, F.C. Dempsey, P.D. Maskell // *Drug. Test. Anal.* – 2018. – V. 10. – P. 37-53.

296 Elessawy, A.M. Determination of Pregabalin in Tissues and Fluids by Using GC-MS / A.M. Elessawy, R.H. Abdel Elaziz, M.A. Ahmed Shihata // *Chem. Sci. J.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P.1–2.

297 Gabapentin, Pregabalin and Vigabatrin Quantification in Human Serum by GC-MS After Hexyl Chloroformate Derivatization / T. Hlozek, M. Bursova, P. Coufal, [et al.] // *J. Anal. Tox.* – 2016. – Vol. 40. – № 9. – P. 749–753.

298 Determination of pregabalin in human plasma using LC-MS-MS / U.K. Mandal, A.K. Sarkar, K.V. Gowda [et al.] // *Chromatographia.* – 2008. – Vol. 67. – № 3. – P. 237–243.

299 Shah, G.R. Determination of pregabalin in human plasma by electrospray ionisation tandem mass spectroscopy / G.R. Shah, C. Gnosh, B.T. Thaker // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* – 2010. – Vol. 1. – № 3. – P. 354–357.

300 Dworkin, R.H. Pregabalin / R.H. Dworkin, P. Kirkpatrick // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2005. – V. 4. – P. 455-456.

301 Bahrami, G. Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate / G. Bahrami, A. Kiani // *J. Chromatogr. B.* – 2006 – V. 835. – P. 123-126.

302 Krivanek, P. Simultaneous isocratic HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in human plasma by dansyl derivatization / P. Krivanek, K. Koppatz, K. Turnheim // *Ther Drug Monit.* – 2003. – V. 25. – P. 374-377.

303 Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum / D.F. Chollet, L. Goumaz, C. Juliano, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2000. – V. 746. – P. 311-314.

304 High-performance liquid chromatographic determination of tramadol in human plasma / M. Noblhs, J. Pastera, P. Anzenbacher, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 1996. – V. 681. – P. 177-183.

305 Gas chromatographic method using nitrogen-phosphorus detection for the measurement of tramadol and its O-desmethyl metabolite in plasma and brain tissue of mice and rats / Q. Tao, D.J. Stone Jr, M.R. Borenstein, [et al.] // *J Chromatogr. B* – 2001. – V. 763. – P. 165-171.

306 Determination of tramadol by capillary gas chromatography with flame ionization detection. Application to human and rabbit pharmacokinetic studies / S.T. Ho, J.J. Wan, W.J. Liaw, [et al.] // *J Chromatogr. B* – 1999. – V. 736. – P. 89-96.

307 Hadidi, K.A. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS / K.A. Hadidi, J.K. Almasad, T. Al-Nsour, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – V. 135. – P. 129-136.

308 Sha, Y.F. Rapid determination of tramadol in human plasma by head-space solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry / Y.F. Sha, S. Shen, G.L. Duan // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37. – P. 143-147.

309 Elsing, B. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its major metabolites in urine after oral administration of racemic tramadol / B. Elsing, G. Blaschke // *J. Chromatogr.* – 1993. – V. 612. – P. 223-230. 116.

310 Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of tramadol and its O-demethylated (M1) and N,O-demethylated (M5) metabolites in human plasma / R. Mehvar, K. Elliott, R. Parasrampur, [et al.] // *J. Chromatogr. B* – 2007. – V. 852. – P. 152-159.

311 Küçük, A. Investigation of the pharmacokinetics and determination of tramadol in rabbit plasma by a high-performance liquid chromatography-diode array detector method using liquid-liquid extraction / A. Küçük, Y. Kadioğlu, F. Celebi // *J. Chromatogr. B* – 2005. – V. 816. – P. 203-208.

312 Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Gergov, P. Nokua, E. Vuori, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2009. – V. 186. – P. 36-43.

313 Gunnar, T. Validated toxicological determination of 30 drugs of abuse as optimized derivatives in oral fluid by long column fast gas chromatography/electron

impact mass spectrometry / T. Gunnar, K. Ariniemi, P. Lillsunde // *J Mass Spectrom.* – 2005. – V. 186. – P. 36-43.

314 Bergstrand, M.P. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry / M. P. Bergstrand, O. Becka, A. Helander // *Clin. Mass Spectrom.* – 2018. – V. 40. – P. 739-753.

315 Cheze, M. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS. Application to forensic cases of drug facilitated crimes / M. Cheze, M. Villain, G. Pepin // *Forensic Sci. Int.* – 2004. – Vol. 145. – P. 123-130.

316 Scott, K.S. A study into the rate of incorporation of eight benzodiazepines into rat hair / K. S. Scott, Y. Nakahara // *Forensic Sci. Int.* – 2003. – Vol. 133. – P. 47- 56.

317 Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers / V. Vindenes, H.M.E. Lund, W. Andresen, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 219. – P. 165-171.

318 Development and validation of an EI–GC–MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology / I.I. Papoutsis, S.A. Athanaselis, P.D. Nikolaou, [et al.] // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 53.- P. 609-614.

319 Simultaneous quantification of urine flunitrazepam, nimetazepam and nitrazepam by using liquid chromatography tandem mass spectrometry / H.H. Lee, J.F. Lee, S.Y. Lin, [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* - 2013.- Vol. 420.- P. 134-139.

320 Ming, D.S. A rapid and accurate UPLC-MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine / D.S. Ming, J. Heathcote // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 421-428.

321 Direct quantitative analysis of benzodiazepines, metabolites, and analogs in diluted human urine by rapid resolution liquid chromatography - tandem mass spectrometry / R.-Y. Hsu, S.-A. Chan, S.-L. Lin, [et al.] // *J. Food Drug Anal.* – 2013. – Vol. 21. – P. 376-383.

322 Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column / T. Ishida, K. Kudo, M. Hayashida, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – V. 877. – P. 2652-2657.

323 A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography–tandem mass spectrometry / S. Kinani, S. Bouchonnet, N. Milan, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – V. 1141. – P. 131-137.

324 Zhou, J. Quantitative analysis of quazepam and its metabolites in human blood, urine, and bile by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / J. Zhou, K. Yamaguchi, Y. Ohno // *Forensic Sci. Int.* – 2014. – V. 241. – P. 95-103.

325 Dahl, S. R. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gammabutyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC–MSMS / S. R. Dahl, K. M. Olsen, D. H. Strand // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – V. 885-886. – P. 37-42.

326 Bahrami, G. Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study / G. Bahrami, B. Mohammadi // *J. Chromatogr. B.* – 2006. – V. 837. – P. 24-28.

327 Simultaneous determination of tramadol, Odesmethyltramadol and N-desmethyltramadol in human urine by gas chromatography– mass spectrometry / A.A.Y. El-Sayed, K. M. Mohamed, A.Y. Nasserc, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2013. – V. 926. – P. 9-15.

328 Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Hutter, S. Kneisel, V. Auwärter, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – Vol. 903. – P. 95–101.

329 Salomone, A. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples / A.

Salomone, E. Gerace, F. D'Urso, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 604–610.

330 Screening for synthetic cannabinoids in hair by using LC-QTOF MS: A new and powerful approach to study the penetration of these new psychoactive substances in the population / R. Gottardo, D. Sorio, G. Musile, [et al.] // *Med. Sci. Law.* – 2013. – Vol. 54. – № 1. – P. 22–27.

331 Simultaneous identification and quantification of synthetic cannabinoids (cannabimimetics) in serum, hair, and urine by rapid and sensitive HPLC tandem mass spectrometry screenings: Overview and experience from routine testing / A. Goebel, M. Boehm, H. Kirchherr, [et al.] // *J. Lab. Med.* – 2013. – Vol. 37. – № 4 – P. 167–180.

332 Salomone, A. Hair analysis as a tool to evaluate the prevalence of synthetic cannabinoids in different populations of drug consumers / A. Salomone, C. Luciano, D. Di Corcia // *Drug Test. Anal.* 2014. – Vol. 6. – P. 126–134.

333 Martin, M., Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS / M. Martin, J.F. Muller, K. Turner, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 218. – P. 44–48.

334 Coulter, C. Synthetic cannabinoids in oral fluid / C. Coulter, M. Garnier, C. Moore // *J. Anal Toxicol.* – 2011. – VOL. 35. – P. 424–430.

335 Ultra high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid / S. Strano-Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignano, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1258. – P. 37–42.

336 Quantification of selected synthetic cannabinoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / A. de Castro, B. Piñeiro, B. Lendoiro, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1295. – P. 99–106.

337 Kneisel, S. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / S. Kneisel,

VOL. Auwarter, J. Kempf // Drug Test. Anal. – 2013. – Vol. 5. – P. 657–669.

338 Stability of 11 prevalent synthetic cannabinoids in authentic neat oral fluid samples: glass versus polypropylene containers at different temperatures / S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, [et al.] // Drug Test. Anal. – 2013. – Vol. 5. – P. 602–606.

339 LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows / S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2013. – Vol. 405. – P. 4691–4706.

340 Screening of synthetic cannabinoids in preserved oral fluid by UPLC-MS/MS / E. L. Oiestad, U. Johansen, A. S. Christophersen, [et al.] // Bioanal. – 2013. – Vol. 5. – P. 2257–2268.

341 Detection of Synthetic Cannabinoids in Oral Fluid Using ELISA and LC-MS-MS / W. C. Rodrigues, P. Catbagan, S. Rana, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2013. – Vol. 37. – P. 526–533.

342 Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / J. Teske, J.-P. Weller, A. Fieguth, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2010. – Vol. 878. – P. 2659–2663.

343 Challenges and Opportunities in Preclinical Research of Synthetic Cannabinoids for Pain Therapy / B.I. Tamba, G.D. Stanciu, C.M. Uritu, [et al.] // Medicina. – 2020. – Vol. 56. – № 1. – 24.

344 Scheduled multiple reaction monitoring algorithm as a way to analyse new designer drugs combined with synthetic cannabinoids in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. Dziadosz, J.-P. Weller, M. Klintschar, [et al.] // J Chromatogr. B. – 2013. – Vol. 929. – P. 84–89.

345 Kneisel, S. Analysis of synthetic cannabinoids in abstinence control: long drug detection windows in serum and implications for practitioners / S. Kneisel, J. Teske, V. Auwärter // Drug Test. Anal. – 2014. – Vol. 6. – P. 135–136.

346 Distinctive features and symptoms of deficiency of drivers with blood samples positive for JWH-018, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses (“Spice”), in suspected DUID cases / T. Kraemer, M. Meyer, D. Wissenbach, [et al.] // *Toxichem Krimtech.* – 2009. – Vol. 76. – P. 91–97.

347 Kacinko, S.L. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of JWH-018, JWH-073, JWH-019, and JWH-250 in human whole blood / S.L. Kacinko, A.Xu, J.W. Homan // *J. Anal. Toxicol.* – 2011. – Vol. 35. – P. 386–393.

348 Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 1 – Synthetic Cannabinoids / J. Ammann, J.M. McLaren, D. Gerostamoulos, [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 372–380.

349 Shanks K.G. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in postmortem whole blood casework / K.G. Shanks, T. Dahn, A.R. Terrell // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 145–152.

350 Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization / J. Beyer, F. T. Peters, T. Kraemer, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2007. – Vol. 42. – P.150–160.

351 Detection and Quantification of New Designer Drugs in Human Blood: Part 2 – Designer Cathinones / J. Ammann, J.M. McLaren, D. Gerostamoulos, [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2012. – Vol. 36. – P. 381–389.

352 Lavagnini, I. Quantitative Applications of Mass Spectrometry / I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, [et al.]. – Chichester (England): John Wiley & Sons Ltd., 2006. – 145 p.

353 A rapid analytical method based on microwave-assisted extraction for the determination of drugs of abuse in vitreous humor / P. Fernandez, S. Seoane, C. Vazquez, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – P. 2177–2186.

354 Microwave-Assisted Extraction and HPLC-DAD Determination of Drugs of Abuse in Human Plasma / P. Fernandez, M. Lago, R.A. Lorenzo, [et al.] // *J. Anal.*

Toxicol. – 2007. – Vol. 31. – P. 388–393.

355 Microwave assisted extraction of drugs of abuse from human urine / P. Fernandez, M. Lago, R.A. Lorenzo, [et al.] // J. Appl. Toxicol. – 2007. – Vol. 27. – P. 373–379.

356 Marais, A. Rapid GC–MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation / A. Marais, J. Laurens // Forensic Sci. Int. – Vol. 183. – P. 78–86.

357 Simultaneous Analysis of New Designer Drug, Methylone, and Its Metabolites in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry / H.T. Kamata, N. Shima, K. Zaitso, [et al.] // JAFST. – 2007. – Vol. 12. – №1. – P. 97–106.

358 Идентификация метилendioксипировалерона и его метаболитов в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, Е.А. Крылова, Н.Б. Зеленина, [и др.] // Проблемы экспертизы в медицине. – 2010. – Т.10. №3–4. – С. 32–35.

359 New cathinone-derived designer drugs 3-bromomethcathinone and 3-fluoromethcathinone: studies on their metabolism in rat urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and their detectability in urine / M.R. Meyer, C. Volmar, A.E. Schwaninger, [et al.] // J. Mass Spectrom. – 2012. – Vol. 47. – P. 253–262.

360 The Identification, Metabolism and Toxicity of an Unknown Component Found in a New Clandestine Drug Tablet / H.T. Kamata, N. Shima, K. Zaitso, [et al.] // JAFST. – 2010. – Vol. 15. – №2. – P. 75–84.

361 Metabolism and toxicological detection of the designer drug N-(1-phenylcyclohexyl)-3-methoxypropanamine (PCMPA) in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry / C. Sauer, F.T. Peters, R.F. Staack, [et al.] // Forensic Sci. Int. – Vol. 181. – P. 47–51.

362 Studies on the metabolism of the α -pyrrolidinophenone designer drug methylenedioxy-pyrovalerone (MDPV) in rat and human urine and human liver microsomes using GC–MS and LC–high-resolution MS and its detectability in urine by GC–MS / M. R. Meyer, P. Du, F. Schuster, [et al.] // J. Mass. Spectrom. – 2010.

– Vol. 45. – P. 1426–1442.

363 Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylvalerone (MPDV) by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry / S. Strano-Rossi, A. B. Cadwallader, X. de la Torre, [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24. – P. 2706–2714.

364 The in vivo and in vitro metabolism and the detectability in urine of 3',4'-methylenedioxy- α -pyrrolidinobutyrophenone (MDPBP), a new pyrrolidinophenone-type designer drug, studied by GC-MS and LC-MSⁿ / M.R. Meyer, S. Maurer, G. M. J. Meyer, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2014. – Vol. 6. – P. 746–756.

365 Springer, D. Metabolism of the new designer drug α -pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry / D. Springer, G. Fritschi, H.H. Maurer // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – Vol. 796. – P. 253–266.

366 Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB₂) by HPLC-MS/MS / Q. Zhang, P. Ma, R.B. Cole, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol. 386. – P. 1345–1355.

367 Studies on the metabolism of JWH-018 and of a homologue of CP 47,497, pharmacologically active ingredients of different misused incense (“Spice”) using GC-MS and LCMSⁿ techniques / T. Kraemer, K.Y. Rust, M.R. Meyer, [et al.] // *Ann. Toxicol. Anal.* – 2009. – Vol. 21(S1). – P. 43–45.

368 Studies on the metabolism of JWH-18, the pharmacologically active ingredient of different misused incenses / T. Kraemer, M. Meyer, D. Wissenbach, [et al.] // *Toxichem Krimtech.* – 2009. – Vol. 76. – P. 90–93

369 In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018 / A. Wintermeyer, I. Möller, M. Thevis, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – Vol. 398. – P. 2141–2153.

370 Sobolevsky, T. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine / T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov // *Forensic Sci. Int.* – 2010. – Vol. 200. – P. 141–147.

371 Sobolevskii, T.G. Application of Mass Spectrometry to the Structural Identification of the Metabolites of the Synthetic Cannabinoid JWH-018 and the Determination of Them in Human Urine / T.G. Sobolevskii, I.S. Prasolov, G.M. Rodchenkov // *J. Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 66. – № 13. – P. 1314–1323

372 Grigoryev, A. Chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures/ A. Grigoryev, A. Melnik, S. Savchuk, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 1126–1136.

373 Синтетические каннабиноиды в растительных смесях «Spice». Идентификация метаболитов JWH-018 как маркеров употребления в биологических жидкостях крыс и человека / Б.Н. Изотов, С.А. Савчук, А.М. Григорьев, [и др.] // *Наркология.* – 2011. – №2. – С. 73–84.

374 Установление факта приема синтетического каннабиноида JWH-018 хромато-масс-спектрометрическими методами / А.М. Григорьев, С.А. Савчук, А.А. Мельник, [и др.] // *Журн. аналит. химии.* – 2012. – Т. 67. – №11. – С. 995–1004.

375 Определение факта употребления синтетических каннабимиметиков JWH-018 и JWH-073 методом газовой хромато-масс-спектрометрии дезалкилированных метаболитов / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, С.А. Савчук, [и др.] // *Сорбц. хроматогр. проц.* – 2013. – Т. 13. – №6. – С. 839–849.

376 Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures / A. Grigoryev, A. Melnik, S. Savchuk, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 2519–2526.

377 Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях

человека и крыс / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, С.А. Савчук, [и др.] // Наркология. – 2012. – Т. 11. – С. 75–86.

378 Grigoryev, A. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry / A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik // Drug Test. Anal. – 2012. – Vol. 4. – P. 519–524.

379 Grigoryev, A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl)methanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography – mass spectrometry / A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik // Drug Test. Anal. 2013. Vol. 5. P. 110–115.

380 The Identification of the Urinary Metabolites of 3-(4-Methoxybenzoyl)-1-Pentylindole (RCS-4), a Novel Cannabimimetic, by Gas Chromatography – Mass Spectrometry / P. Kavanagh, A. Grigoryev, A. Melnik, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2012. – Vol. 36. – P. 303–311.

381 Gas and liquid chromatography-mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis product / A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2013. – Vol. 37. – P. 265–276.

382 Обнаружение психоактивного компонента курительных смесей CP47,497 (C8) в моче методом хромато-масс-спектрометрии / А.М. Григорьев, А.А. Мельник, С.А. Савчук, [и др.] // Сорбционно-хроматографические процессы. – 2012. – Vol. 12. – P. 97–104.

383 Савчук, С.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике / С.А. Савчук, А.М. Григорьев. – М.: URSS, 2013. – 224 с.

384 Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics JWH-203 and JWH-251, by GC–MS and LC–MS/MS / P. Kavanagh, A. Grigoryev, A. Melnik, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2013. – Vol. 934. – P. 102–108.

385 Structure characterization of urinary metabolites of the cannabimimetic

JWH-018 using chemically synthesized reference material for the support of LC-MS/MS-based drug testing / S. Beuck, I. Moller, A. Thomas, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – P. 493–505.

386 Sobolevsky, T. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids / T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov // *Drug Test. Anal.* – 2012. – Vol. 4. – P. 745–753.

387 Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in “herbal mixtures” using LC-MS/MS techniques / M. Hutter, S. Broecker, S. Kneisel, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2012. – Vol. 47. – P. 54–65.

388 Tentative identification of phase I metabolites of HU-210, a classical synthetic cannabinoid, by LC-MS/MS / U. Kim, M. J. Jin, J. Lee, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 64. – P. 26–34.

389 In vivo and in vitro metabolism of the synthetic cannabinoid JWH-200 / N. De Brabanter, S. Esposito, E. Tudela, [et al.] // *Rap. Comm. Mass Spec.* – 2013. – Vol. 27. – P. 2115–2126.

390 First Characterization of AKB-48 Metabolism, a Novel Synthetic Cannabinoid, Using Human Hepatocytes and High-Resolution Mass Spectrometry / A.S. Gandhi, M. Zhu, S. Pang, [et al.] // *AAPS J. BMC Biol.* – 2013. – Vol. 15. – P.1091–1098.

391 Characteristics of the designer drug and synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201 regarding its chemistry and metabolism / M. Hutter, B. Moosmann, S. Kneisel, [et al.] // *J. Mass Spec.* – 2013. – Vol. 48. – P. 885–894.

392 Determination of AM-2201 metabolites in urine and comparison with JWH-018 abuse / M. Jang, W. Yang, I. Shin, [et al.] // *Int. J. Legal Med.* – 2014. – Vol. 128. – P. 285–294.

393 Characterization of in vitro metabolites of CP 47,497, a synthetic cannabinoid, in human liver microsomes by LC-MS/MS / M.J. Jin, J. Lee, M.K. In, [et al.] // *J. Forensic Sci.* – 2013. – Vol. 58. – P. 195–199.

394 Structure elucidation and identification of a common metabolite for naphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference standard / D.P. Lovett, E.G. Yanes, T.W. Herbelin, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2013. – Vol. 226. – P. 81–87

395 Targeted Metabolomic Approach for Assessing Human Synthetic Cannabinoid Exposure and Pharmacology / A.L. Patton, K.A. Seely, K.C. Chimalakonda, [et. al] // *Anal. Chem.* – 2013. – Vol. 85. – P. 9390–9399.

396 Катаев, С.С. Идентификация маркеров каннабимиметиков РВ-22 и РВ-22F в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, Н.Б. Борисова, О.Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т. 34. – №4. – С. 116–122.

397 Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика АВ-PINACA в моче методом ГХ-МС / С.С. Катаев, Н.Б. Борисова, О.Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т. 35. – №9. – С. 131–138.

398 Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика РВ-22 в моче / С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев, О.Н. Дворская // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т. 36. – №10. – С. 29–36.

399 Cytochrome P450-mediated Oxidative Metabolism of Abused Synthetic Cannabinoids Found in "K2/Spice": Identification of Novel Cannabinoid Receptor Ligands / K.C. Chimalakonda, K.A. Seely, S.M. Bratton, [et. al] // *Drug Metab. Dispos.* – 2012. – Vol. 40. – P. 2174–2184.

400 Conjugation of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073, Metabolites by Human UDP-Glucuronosyltransferases / Chimalakonda, K.A. Seely, S.M. Bratton, [et. al] // *Drug Metab. Dispos.* – 2011. – Vol. 39. – P. 1967–1976.

401 Solid-Phase Extraction and Quantitative Measurement of Omega and Omega-1 Metabolites of JWH-018 and JWH-073 in Human Urine / K.C. Chimalakonda, C.L. Moran, P.D. Kennedy, [et. al] // *Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 83. – P. 6381–6388.

402 Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls / I. Möller, A. Wintermeyer, K. Bender, [et al.] //

Drug Test. Anal. – 2011. – Vol. 3. – P. 609–620.

403 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites / M.A. ElSohly, W. Gul, K.M. ElSohly, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2011. – Vol. 35. – P. 487–495.

404 Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine / C.L. Moran, VOL.-H. Le, K.C. Chimalakonda, [et al] // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83. – P. 4228–4236.

405 LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine – An Australian perspective / A.D. de Jager, J.VOL. Warner, M. Henman, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2012. – Vol. 897. – P. 22–31.

406 Validation of a Novel Immunoassay for the Detection of Synthetic Cannabinoids and Metabolites in Urine Specimen / A. Arntson, B. Ofsa, D. Lancaster, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2013. – Vol. 37. – P. 284–290.

407 Monitoring of urinary metabolites of JWH-018 and JWH-073 in legal cases / M. Jang, W. Yang, H. Choi, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2013. – Vol. 231. – P. 13–19.

408 Yanes, E.G. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample / E.G. Yanes, D.P. Lovett // J. Chromatogr. B. – 2012. – Vol. 909. – P. 42–50.

409 Gas chromatography–mass spectrometry of JWH-018 metabolites in urine samples with direct comparison to analytical standards / B. Emerson, B. Durham, J. Gidden, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2013. – Vol. 229. – P. 1–6.

410 Kroner, L. A pragmatic approach to detect SPICE-metabolites in urine with HPLC-MS/MS / L. Kroner, VOL.C. Spencer // Toxicchem Krimtech. – 2013. – Vol. 80. – P. 375–380.

411 Qualitative Confirmation of 9 Synthetic Cannabinoids and 20 Metabolites in Human Urine Using LC-MS/MS and Library Search / A. Wohlfarth, K.B. Scheidweiler, X. Chen, [et al.] // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85. – № 7 – P. 3730–

3738.

412 Ioannides, C. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics / C. Ioannides. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2001. – 566 p.

413 Three Fatal Intoxications Due to Methylone / J.M. Pearson, T.L. Hargraves, L.S. Hair, [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2012. – Vol. 36. – № 6. – P. 444–451.

414 Determination of THC, THC-COOH, CBN and CBD in hair with application of derivatisation and chromatographic techniques / M. Wiergowski, M. Patelczyk, K. Galer, [et al.] // Prob. Forensic Sci. – 2005. – Vol. 112. – P. 188–203.

415 Hair analysis for Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI Comparison with GC/MS-NCI for Δ^9 -THC-COOH / M.J. Baptista, P.V. Monsanto, E.G. Pinho Marques, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2002. – Vol. 128. – P. 66–72.

416 Emidio, E.S. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry / E.S. Emidio, M. Prata, H.S. Dorea // Anal. Chim. Acta. – 2010. – Vol. 670. – P. 63–71.

417 Morphine and its metabolites: analytical methodologies for its determination / M.E. Bosch, A.R. Sanchez, F.S. Rojas, [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 43. – P. 799–815.

418 Rana, S. Rapid analysis of urinary opiates using fast gas chromatography–mass spectrometry and hydrogen as a carrier gas / S. Rana, R.K. Garg, A. Singla // Egyptian J. Forensic Sci. – 2014. – Vol. 4. – P. 100–107.

419 Simultaneous determination of opiates, methadone, buprenorphine and metabolites in human urine by superficially porous liquid chromatography tandem mass spectrometry / H.R. Lin, C.L. Chen, C.L. Huang, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2013. – Vol. 925. – P. 10–15.

420 A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites) /

M. Fernandez, VOL. Di Fazio, S.M. Wille, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2014. – Vol. 965. – P. 7–18.

421 Yamada, H. Metabolism of Drugs of Abuse: Its contribution to the Toxicity and the Inter-individual Differences in Drug sensitivity / H. Yamada, Y. Ishii, K. Oguri // J. Health Sci. – 2005. – Vol. 51. – P. 1–7.

422 HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma / P. Fernandez, L. Morales, C. Vazquez, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2006. – Vol. 161. – P. 31–35.

423 Pizzolato, T. LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine / T. Pizzolato, M. J. de Alda, D. Barcelo // TrAC Trends in Anal. Chem. – 2007. – Vol. 26. – P. 609–624.

424 Elimination of Cocaine and Metabolites in Plasma, Saliva and Urine Following Repeated Oral Administration to Human Volunteers / R.A. Jufer, A. Wstadik, S.L. Walsh, [et al.] // J. Anal. Tox. – 2000. – Vol. 24. – P. 467–477.

425 Major and Minor Metabolites of Cocaine in Human plasma following Controlled Subcutaneous Cocaine Administration / E.A. Kolbrich, A.J. Barnes, D.A. Gorelick, [et al.] // J. Anal. Tox. – 2006. – Vol. 30. – P. 501–510.

426 Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry / P.A. Steenkamp, N.M. Harding, F.R. van Heerden, [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2004. – Vol. 145. – P. 31–39.

427 Scopolamine Poisoning From Homemade 'Moon Flower' Wine / E.A. Smith, C.E. Melon, J.E. Pickell, [et al.] // J. Anal. Tox. – 1991. – VOL. 15. – P. 216–219.

428 Testing for Atropine and Scopolamine in Hair by LC-MS-MS after *Datura innoxia* Abuse / P. Kintz, M. Villain, Y. Barguil, [et al.] // J. Anal. Tox. – 2006. – Vol. 30. – P. 454–457.

429 Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography/fluorescence detection / N. Kato,

T. Kojima, S. Yoshiyagawa, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2007. – Vol. 1145. – P. 229–233.

430 Cordero, R. Distribution of Concentrations of Cocaine and its metabolites in hair Collected Postmortem from Cases with Diverse Causes/Circumstances of Death / R. Cordero, S. Lee, S. Paterson // *J. Anal. Toxicol.* – 2010. – Vol. 34. – P. 543–548.

431 Weinmann, W. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC-MS/MS / W. Weinmann, S. Vogt, R. Goerke // *Forensic Sci. Int.* – 2000. – Vol. 113. – P. 381–387.

432 Simultaneous determination of thirteen plant alkaloids in a human specimen by SPE and HPLC / J. Pietsch, J. Gunther, T. Henle, [et al.] // *J. Sep. Sci.* – 2008. – Vol. 31. – P. 2410–2416.

433 Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine / Z. Zhang, C. Zhang, X. Su, [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2008. – Vol. 621. – P. 185–192.

434 Liquid chromatographic–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric analysis of opiates and metabolites in rat urine after inhalation of opium / R. Kikura-Hanajiri, N. Kaniwa, M. Ishibashi, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – Vol. 789. – P. 139–150.

435 Renal excretion profiles of psilocin following oral administration of psilocybin: a controlled study in man / F. Hasler, D. Bourquin, R. Brenneisen, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 30. – P. 331–339.

436 Integration of GC/EI-MS and GC/NCI-MS for simultaneous quantitative determination of opiates, amphetamines, MDMA, ketamine, and metabolites in human hair / Y.H. Wu, K. L. Lin, S.C. Chen, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2008. – Vol. 870. – P. 192–202.

437 Yang, R. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry / R. Yang, W. Xie // *Forensic Sci. Int.* – 2006. – Vol. 162. – P. 135–139.

438 Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography–mass spectrometry / A. Namera, M. Yashiki, Y. Hirose, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2002. – Vol. 130. – P. 34–43.

439 Simultaneous, quantitative determination of opiates, amphetamines, cocaine and benzoylecgonine in oral fluid by liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry / K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – Vol. 779. – P. 321–330.

440 Lachenmeier, K. Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic-mass spectrometric (GC-MS) confirmation / K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea // *Forensic Sci. Int.* – 2006. – Vol. 159. – P. 189–199.

441 Usefulness of multi-parameter opiates-amphetamines-cocainics analysis in hair of drug users for the evaluation of an abuse profile by means of LC-APCI-MS-MS / M. Klys, S. Rojek, J. Kulikowska, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – Vol. 854. – P. 299–307.

442 Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use / M. Montagna, C. Stramesi, C. Vignali, [et al.] // *Forensic Sci. Int.* – 2000. – Vol. 107. – P. 157–167.

443 Comparison of Four Derivatizing Reagents for 6-Acetylmorphine GC-MS Analysis / M.M. Kushnir, D.K. Crockett, G. Nelson, [et al.] // *J. Anal. Tox.* – 1999. – Vol. 23. – P. 262–269.

444 Hsu, M.-C. Detection of Abused Drugs in Urine by GC-MS / M.-C. Hsu, D. Chen, R. H. Liu // *J. Food Drug Anal.* – 2009. – Vol. 17. – N. 4. – P. 233–245.

445 Simultaneous determination of ephedrines, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC-MS / T. Saito, H. Mase, S. Takeichi, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 43. – P. 358–363

446 Reid, M.J. Cannabinoid-induced alterations in brain disposition of drugs of abuse / M.J. Reid, L.M. Bornheim // *Biochem. Pharm.* – 2001. – Vol. 61. – P. 1357–1367.

447 Andrews, R. A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid-liquid extraction and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry / R. Andrews, S. Paterson // *Forensic Sci. Int.* – 2012. – Vol. 222. – P. 111–117.

448 Development and validation of a liquid chromatography–mass spectrometry assay for the determination of opiates and cocaine in meconium / S. Pichini, R. Pacifici, M. Pellegrini, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – Vol. 794. – P. 281–292.

449 Hassan, S.S. New potentiometric sensors based on selective recognition sites for determination of ephedrine in some pharmaceuticals and biological fluids / S.S. Hassan, A.H. Kamel, H. Abd El-Naby // *Talanta.* – 2013. – Vol. 103. – P. 330–336.

450 Optimization of a rapid microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of opiates, cocaine and their metabolites in human hair / P. Fernandez, M. Lago, R.A. Lorenzo, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2009. – Vol. 877. – P. 1743–1750.

451 Pharmacokinetic comparisons of five ephedrine alkaloids following oral administration of four different Mahuang-Guizhi herb-pair aqueous extracts ratios in rats / P. Wei, H. L. Huo, Q.H. Ma, [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2014. – Vol. 155. – P. 642–648.

452 Shamsipur, M. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography / M. Shamsipur, N. Fattahi // *J. Chromatogr. B.* – 2011. – Vol. 879. – P. 2978–2983.

453 Comparison of conventional hollow fiber based liquid phase microextraction and electromembrane extraction efficiencies for the extraction of ephedrine from biological fluids / L. Fotouhi, Y. Yamini, S. Molaei, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2011. – Vol. 1218. – P. 8581–8586.

454 Determination of ephedrine and codeine in human urine by cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography / L.J. Li, S. G. Li, H. Y. Li, [et al.] // *Chinese Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 20. – P. 84–87.

455 Sensitive determination of ephedrine and norephedrine in human plasma samples using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography / G. Aymard, B. Labarthe, D. Warot, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2000. – Vol. 744. – P. 25–31.

456 Determination of L-Ephedrine, Pseudoephedrine, and Caffeine in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry / S.D. Cooper, B.L. Fletcher, M.A. Rehder Silinski, [et al.] // *J. Anal. Tox.* – 2011. – Vol. 35. – P. 341–348.

457 Ultra high-performance liquid chromatography–time-of-flight high resolution mass spectrometry in the analysis of hexabromocyclododecane diastereomers: Method development and comparative evaluation versus ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry and triple quadrupole tandem mass spectrometry / D. Zacs, J. Rjabova, I. Pugajeva, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2014. – Vol. 1366. – P. 73–83.

458 Immunoassay and GC-MS Procedures for the Analysis of Drugs of Abuse in Meconium / M.A. ElSohly, D.F. Stanford, T.P. Murphy T.P., [et al.] // *J. Anal. Tox.* – 1999. – Vol. 23. – P. 436–445.

459 Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications / M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J.-L. Veuthey, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2013. – Vol. 1292. – P. 2–18.

460 Зверева И.О. Прогнозирование метаболитов рилизинг-пептидов гормона роста в организме человека для разработки методики их определения в

целях антидопингового контроля : специальность 02.00.10 «биоорганическая химия» : специальность 02.00.02 «аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических и химических наук / Зверева Ирина Олеговна : ФГБОУ ВО Московский технологический университет. – 2017. – 161 с. – Библиогр.: с. 135–157.

461 A high-throughput LC-MS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography / M. Timms, N. Hall, V. Levina, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2014. – Vol. 6. – P. 985–995.

462 Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry / A. Thomas, S. Hoppner, H. Geyer, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – № 2. – P. 507–516.

463 On the use of cells or membranes for receptor binding: growth hormone secretagogues / A. Pinyot, Z. Nikolovski, J. Bosch, [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2010. – Vol. 399. – № 2. – P. 174–181.

464 Analytical strategies for doping control purposes: needs, challenges, and perspectives / R. Nicoli, D. Guillarme, N. Leuenberger, [et al.] // *Anal. Chem.* – 2016. – Vol. 88. – № 1. – P. 508–523.

465 Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010-2013 / O. Krug, A. Thomas, K. Walpurgis, [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 70. – № 11. – P. 1303–1311.

466 Holt, R.I.G. The history of doping and growth hormone abuse in sport / R.I.G Holt, I. Erotokritou-Mulligan, P.H. Sonksen // *Growth Horm. IGF Res.* – 2009. – Vol. 19. – № 4. – P. 320–326.

467 Stutz, H. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection / *Electrophoresis.* – 2005. – Vol. 26. – № 7–8. – P. 1254–1290.

468 Hettiarachchi, K Capillary electrophoretic determination of acetic acid and trifluoroacetic acid in synthetic peptide samples / K. Hettiarachchi, S. Ridge // *J. Chromatogr. A.* – 1998. – Vol. 817. – № 1–2. P. 153–161.

469 Monitoring the purity of a synthetic peptide by capillary electrophoresis: utilization of an on-line preconcentration method for improved separation and detection sensitivity / N.M. Vizioli, C.N. Carducci, C. Pena, [et al.] // *J. Capill. Electrophor. Microchip Technol.* – 1999. – Vol. 6. – № 3–4. P. 109–118.

470 Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction / C. Sylvester-Hvid, N. Kristensen, T. Blicher, [et al.] // *Tissue Antigens.* – 2002. – Vol. 59. – № 4. – P. 251–258.

471 Fit-for-Purpose Radio Receptor Assay for the Determination of Growth Hormone Secretagogues in Urine / P. Ferro, R.G. Gallego, J. Bosch, [et al.] // *J. Biomol. Scr.* – 2015. – Vol. 20. – № 10. – P. 1268–1276.

472 Identification of Ghrelin Receptor Blocker, D-[Lys3] GHRP-6 as a CXCR4 Receptor Antagonist / K. Patel, V.D. Dixit, J.H. Lee, [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 8. – № 1. – P. 108–117.

473 Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS / T. Lange, A. Thomas, K. Walpurgis [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2020. – Vol. 412. – № 15. – P. 3765–3777.

474 Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry / A. Thomas, K. Walpurgis, O. Krug, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1259. – P. 251–257.

475 Doping control analysis of seven bioactive peptides in horse plasma by liquid chromatography-mass spectrometry / W.H. Kwok, E.N.M. Ho, M.Y. Lau, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – № 8. – P. 2595–2606.

476 Characterization of in vitro generated metabolites of selected peptides <2 kDa prohibited in sports / A. Thomas, A. Knoop, W. Schanzer, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9. – P. 1799–1803

477 Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin / E. Semenistaya, I. Zvereva, A. Thomas, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2015. – Vol. 7. – P. 919–925.

478 Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performance liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry / C. Gorgens, S. Guddat, A. Thomas, [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol. 131. – P. 482–496.

479 Doping control analysis of TB-500, a synthetic version of an active region of thymosin β_4 , in equine urine and plasma by liquid chromatography–mass spectrometry / E.N.M. Ho, W.H. Kwok, M.Y. Lau, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2012. – Vol. 1265. – P. 57–69.

480 Determination of growth hormone secretagogue pralmorelin (GHRP-2) and its metabolite in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / M. Okano, M. Sato, A. Ikekita, [et al.] // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 24. – P. 2046–2056.

481 DMSO Assisted Electrospray Ionization for the Detection of Small Peptide Hormones in Urine by Dilute-and-Shoot-Liquid-Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry / P. Judak, J. Grainger, C. Goebel, [et al.] // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2017. – Vol. 28 – P. 1657–1665.

482 Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accurate–mass quadrupole time-of-flight LC–MS / D. Cuervo, C. Loli, M. Fernandez-Alvarez, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2017. – Vol. 1065–1066. – P. 134–144.

483 Guan, F. Comprehensive solid-phase extraction of multitudinous bioactive peptides from equine plasma and urine for doping detection / F. Guan, M.A. Robinson // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – Vol. 985. – P. 79–90.

484 Timms, M. A method for confirming CJC-1295 abuse in equine plasma samples by LC–MS/MS / M. Timms, K. Ganio, R. Steel // *Drug Test. Anal.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1248–1257.

485 Testing for the erythropoiesis-stimulating agent Sotatercept/ACE-011 (ActRIIA-Fc) in serum by means of Western blotting and LC-HRMS / K. Walpurgis, A. Thomas, M. Vogel, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2016. – Vol. 8. – P. 1152–1161.

486 A high throughput approach for determination of dermorphin in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry for doping control purposes / J. de L. Castro, M.E.P. Martucci, H.M.G. Pereira, [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2020. – Vol. 55. – e4593.

487 Ney, L.J. Reproducibility of saliva progesterone measured by immunoassay compared to liquid chromatography mass spectrometry / L.J. Ney, K.L. Felmingham, D. Nichols // *Anal. Biochem.* – 2020. – Vol. 610. – 113984.

488 Accuracy of a Direct Progesterone Immunoassay / N. Shankara-Narayana, S. Zawada, K.A. Walters, [et al.] // *J. App. Lab. Med.* – 2016. – Vol. 1. – № 3. – P. 294–299.

489 The art of measuring steroids. Principles and practice of current hormonal steroid analysis / S.A. Wudy, G. Schuler, A. Sanchez-Guijo, [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 179. – P. 88–103.

490 A microsphere-based duplex competitive immunoassay for the simultaneous measurements of aldosterone and testosterone in small sample volumes: Validation in human and mouse plasma / M. Sun, J. Manolopoulou, A. Spyroglou, [et al.] // *Steroids.* – 2010. – Vol. 75. – P. 1089–1096.

491 Assessment of urinary total testosterone production by a highly sensitive time-resolved fluorescence immunoassay / S. Bao, Y. Peng, S. Sheng, [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2008. – Vol. 22. – P. 403–408.

492 Automated chemiluminescence-immunoassay for aldosterone during dynamic testing: comparison to radioimmunoassays with and without extraction steps

/ C. Schirpenbach, L. Seiler, C. Maser-Gluth, [et al.] // Clin. Chem. – 2006. – Vol. 52. – P. 1749–1755.

493 Ruth, A. Mass spectrometry: Future opportunities for profiling and imaging steroids and steroid metabolites / A. Ruth, N.Z.M. Homer // Curr. Opin. Endocr. Metabol. Res. – 2020. – Vol. 15. – P. 71–78.

494 Matysik, S. Determination of steroid hormones in human plasma by GC–triple quadrupole MS / S. Matysik, G. Schmitz // Steroids. 2015. – Vol. 99. – P. 151–154.

495 Assessment of circulating sex steroid levels in prepubertal and pubertal boys and girls by a novel ultrasensitive gas chromatography–tandem mass spectrometry method / F. Courant, L. Aksglaede, J.P. Antignac, [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2010. – Vol. 95. – P. 82–92.

496 Determination of steroid hormones in blood by GC–MS/MS / M. Hansen, N.W. Jacobsen, F.K. Nielsen, [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – Vol. – 400. – P. 3409–3417.

497 Matysik, S., Application of gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry to the determination of sterol components in biological samples in consideration of the ionization mode / S. Matysik, G. Schimtz // Biochimie. – 2013. – Vol. 95. – P. 489–495.

498 Selective LC-MRM/SIM-MS based profiling of adrenal steroids reveals metabolic signatures of 17 α -hydroxylase deficiency / C. Lee, J.H. Kim, S.J. Moon, [et al.] // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2020. – Vol. 198. – 105615.

499 Quantification of endogenous steroid sulfates and glucuronides in human urine after intramuscular administration of testosterone esters / G. Forsdahl, K. Zanitzer, D. Erceg, [et al.] // Steroids. – 2020. – Vol. 157. – 108614.

500 Andersen, D.W. Screening for Anabolic Steroids in Urine of Forensic Cases Using Fully Automated Solid Phase Extraction and LC–MS-MS / D.W. Andersen, K. Linnet // J. Anal. Tox. – 2014. – Vol. 38. – P. 637–644.

501 Zhang, Y. Steroid isotopic standards for gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry (GCC-IRMS) / Y. Zhang, H.J. Tobias, T. Brenna // Steroids. – 2009. – Vol. 74. – № 3 – P. 369–378.

502 Aguilera, R. A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and etiocholanolone delta(13)C (per thousand) values by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry / R. Aguilera, T.E. Chapman, D.H. Catlin // Rapid Comm. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 2294–2299.

503 Isotope ratio mass spectrometry in antidoping analysis: The use of endogenous reference compounds / X. de la Torre, D. Jardines, D. Curcio, [et al.] // Rapid Comm. Mass Spectrom. – 2019. – Vol. 33. – № 6. – P. 579–586.

504 Development and validation of a multidimensional gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry-based test method for analyzing urinary steroids in doping controls / M. Putz, T. Piper, A. Casilli, [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2018. – Vol. 1030. – P. 105–114.

505 Use of LC-MS/MS for the Open Detection of Steroid Metabolites Conjugated with Glucuronic Acid / A. Fabregat, O.J. Pozo, J. Marcos, [et al.] // Anal. Chem. – 2013. – Vol. 85. – P. 5005–5014.

506 A new sulphate metabolite as a long-term marker of metandienone misuse / C. Gomez, O.J. Pozo, L. Garrosta, [et al.] // Steroids. – 2013. – Vol. 78. – P. 1245–1253.

507 Quantification of endogenous steroid sulfates and glucuronides in human urine after intramuscular administration of testosterone esters / G. Forsdahl, K. Zanitzer, D. Erceg, [et al.] // Steroids. – 2020. – Vol. 157. – 108614.

508 Steroid profiling in urine of intact glucuronidated and sulfated steroids using liquid chromatography-mass spectrometry / L. De Wilde, K. Roels, P. Van Renterghem // J. Chromatogr. A. – 2020. – Vol. 1624. – 461231.

509 Кочнова Е.А. Определение профиля эндогенных стероидов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии : специальность специальность 02.00.02 «аналитическая химия» : диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук / Кочнова Елизавета Александровна : ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – 2012. – 169 с. – Библиогр.: с. 149–162.

510 Van Renterghem, P. Population based evaluation of a multi-parametric steroid profiling on administered endogenous steroids in single low dose / P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke // *Steroids*. – 2010. – Vol. 75. – P. 1047–1057.

511 Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio / P.-E. Sottas, N. Baume, C. Saudan, [et al.] // *Biostatistics*. – 2007. Vol. 8. – № 2. – P. 285–296.

512 Аналитическая химия. В 3 т. Т. 3 Инструментальные методы анализа. Часть 2 / Под ред. проф. А.А. Ищенко. — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2020 — 504 с. — ISBN 978-5-9221 1867-5.

513 Luque-Cordoba, D. Fully automated method for quantitative determination of steroids in serum: An approach to evaluate steroidogenesis / D. Luque-Cordoba, F. Priego-Capote // *Talanta*. – 2021. – Vol. 224. – 121923.

514 Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS / P. Van Renterghem, W. Viaene, W. Van Gansbeke, [et al.] // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – Vol. 1141. – 122026.

515 Steroid profiling in urine of intact glucuronidated and sulfated steroids using liquid chromatography-mass spectrometry / L. De Wilde, L. Roels, P. Van Renterghem, [et al.] // *J. Chromatogr. A*. – 2020. – Vol. 1624. – 461231.

516 Steroid profile analysis by LC-HRMS in human seminal fluid / E. Olesti, A. Garcia, R. Rahban, [et al.] // *J. Chromatogr. B*. – 2020. – Vol. 1136. – 121929.

517 Selective LC-MRM/SIM-MS based profiling of adrenal steroids reveals T metabolic signatures of 17 α -hydroxylase deficiency / C. Lee, J.H. Kim, S.J. Moon, [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 198. – 105615.

518 Development and application of analytical procedures for the GC–MS/MS analysis of the sulfates metabolites of anabolic androgenic steroids: The pivotal role of chemical hydrolysis / M. Iannone, F. Botre, D. Martinez-Brito, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – Vol. 1155. – 122280.

519 Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry / A. Gomez-Gomez, J. Miranda, G. Feixas, [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – Vol. 197. – 105520.

520 An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples / T.-F. Yuan, J. Le, S.-T. Wang, [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2020. – Vol. 61. – 580–586.

521 Analysis of steroids in urine by gas chromatography-capillary photoionization-tandem mass spectrometry / P. Poho, K. Scholz, N. Karkkainen, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2019. – Vol. 1598. – 175–182.

522 Simultaneous quantification of endocannabinoids, oleoylethanolamide and steroid hormones in human plasma and saliva / L.J. Ney, K.L. Felmingham, R. Bruno // *J. Chromatogr. B.* – 2020. – Vol. 1152. – 122252.

523 Sobolevsky, T. Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine / T. Sobolevsky, G. Rodchenkov // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 128. – P. 121–127.

524 Stabilization of human urine doping control samples: II. Microbial degradation of steroids / M. Tsivou, D. Livadara, D.G. Georgakopoulos, [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2009. – Vol. 388. – P. 146–154.

525 Stabilization of human urine doping control samples: a current opinion / M. Tsivou, D.G. Georgakopoulos, H.A. Dimopoulou, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2011. – Vol. 401. – P. 553–561.

526 Doping control container for urine stabilization: a pilot study / M. Tsivou, E. Giannadaki, F. Hooghe, [et al.] // *Drug Test. Anal.* – 2017. – Vol. 9. – P. 699–712.

527 Anti-doping analyses at the Sochi Olympic and Paralympic Games 2014 / T. Sobolevsky, G. Krotov, M. Dikunets, [et al.] // Vol. 6. – P. 1087–1101.

528 Georgakopoulos, C. Detecting – the 2004 Athens Olympic Games / C. Georgakopoulos // Drug Test. Anal. – 2020. – Vol. 12. – P. 641–646.

529 Chronicle of an unintentional MDMA intoxication of a field hockey team to prevent its qualification for the Beijing 2008 Olympics: A case report / G. Baltazar–Martins, M. del Mar Plata, J. Munoz-Guerra, [et al.] // Drug Test. Anal. – 2020. – Vol. 12. – P. 647–650.

530 Doping control analysis at the Rio 2016 Olympic and Paralympic Games / H.M.G. Pereira, V.F. Sardela, M.C. Padilha, [et al.] // Drug Test. Anal. – 2017. – Vol. 9. – P. 1658–1672.

531 Athlete Biological Passport. Operation Guidelines & Compilation of Required Elements, World Anti-Doping Agency [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-abp-operating-guidelines-v5.0-en.pdf> (дата обращения: 29.01.2021)

532 Jung–Klawitter, S. Analysis of Catecholamines and Pterins in Inborn Errors of Monoamine Neurotransmitter Metabolism—From Past to Future / S. Jung–Klawitter, O.K. Hubschmann // Cells. – 2019. – Vol. 8. – P. 867–911.

533 Kumar, A. Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection / A. Kumar, J.P. Hart, D.V. McCalley // J. Chromatogr. A. – 2011. – Vol. 1218. – № 25. – P. 3854–3861.

534 High-performance liquid chromatographic assay for catecholamines and metanephrines using fluorimetric detection with pre-column 9- fluorenylmethylloxycarbonyl chloride derivatization / E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2000. – Vol. 749. – P. 179–189.

535 A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / R. Nigori, P. Komarneni, V. Kandikere, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2013. – Vol. 913–914. P. 41–47.

536 Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS / F. Gosetti, E. Mazzucco, M.C. Gennaro, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 405. – P. 907–916.

537 Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultraperformance liquid chromatography– tandem mass spectrometry: utility for diagnosis of dopamine- producing metastatic pheochromocytoma / M. Peitzsch, A. Prejbisz, M. Kroiß, [et al.] // *Ann. Clin. Biochem.* – 2013. – Vol. 50. – P. 147–155.

538 Development and validation of a specific and sensitive LC-MS/MS method for quantification of urinary catecholamines and application in biological variation studies / X. Li, S. Li, P. Wynveen, [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – Vol. 406. – P. 7287–7297.

539 Comprehensive, robust, and sensitive UPLC-MS/MS analysis of free biogenic monoamines and their metabolites in urine / Z. Xie, P. Lorkiewicz, D.W. Riggs, [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2018. – Vol. 1099. – P. 83–91.

540 Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / S. Bourcier, J.-F. Benoist, F. Clerc, [et al.] // *Rapid Comm. Mass Spectrom.* – 2006. – Vol. 20. – P. 1405–1421.

541 Whiting, M. J. Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection / M.J. Witing // *Ann. Clin. Biochem.* – 2009. – Vol. 46. – P. 129–136

542 Simultaneous liquid chromatography tandem mass spectrometric determination of urinary free metanephrines and catecholamines, with comparisons of free and deconjugated metabolites / M. Peitzsch, D. Pelzel, S. Glockner, [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – Vol. 418. – P. 50–58.

543 Comprehensive profiling analysis of bioamines and their acidic metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry combined with

selective derivatization / N.-H. Park, J.Y. Hong, H.J. Shin, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2013. – Vol. 1305. – P. 234–243.

544 Automated mass spectrometric analysis of urinary free catecholamines using on-line solid phase extraction / W.H.A. de Jong, E.G.E. de Vries, B.H.R. Wolffnbuttel, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2010. – Vol. 878. – № 19. – P. 1506–1512.

545 Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid–liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples / L. Konieczna, A. Roszkowska, M. Niedzwiecki, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2016. – Vol. 1431. – P. 111–121.

546 Selective Determination of Native Fluorescent Bioamines through Pre-column Derivatization and Liquid Chromatography Using Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Detection / M. Yoshitake, H. Nohta, H. Yoshida // Anal. Chem. – 2006. – Vol. 78. – P. 920–927.

547 Evaluation of an ELISA for metanephrines in feline urine / T. Srithunyarat, A. Svensson, S. Hanas, [et al.] // J. Vet. Diagn. Invest. – 2018. – Vol. 30, № 6. – P. 887–893.

548 Christensen, T.T. Comparison of plasma metanephrines measured by a commercial immunoassay and urinary catecholamines in the diagnosis of pheochromocytoma / T.T. Christensen, J. Frystyk, P.L. Pooulsen // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2011. – Vol. 71. – № 8. – P. 695–700.

549 Measurements of Plasma-Free Metanephrines by Immunoassay Versus Urinary Metanephrines and Catecholamines by Liquid Chromatography with Amperometric Detection for the Diagnosis of Pheochromocytoma/Paraganglioma / W. Raber, H. Kotal, R. Marculescu, [et al.] // J. Clin. Med. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – 3108.

550 Human fluorescent profile of urine as a simple tool of mining in data from autofluorescence spectroscopy / A. Birkova, J. Oboril, R. Kreta, [et al.] // *Biomed. Signal Proc. Contr.* – 2020. Vol. 56. – 101693.

551 Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS / C. Su, C. Li, K. Sun, [et al.] // *Food Chem.* – 2020. – Vol. 331. – 127180.

552 High throughput analysis of 21 perfluorinated compounds in drinking water, tap water, river water and plant effluent from southern China by supramolecular solvents-based microextraction coupled with HPLC-Orbitrap HRMS / M. Liang, Y. Xian, B. Wang, [et al.] // *Env. Pol.* – 2020. – Vol. 263. – 114389.

553 Development and validation of a LC-HRMS method for the quantification of cannabinoids and their metabolites in human plasma / M.K. Mohamed, J. Takyi-Williams, B. Baudot, [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2021. – Vol. 159. – 105705.

554 Towards harmonized criteria in Quality Assurance and Quality Control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring / N. Caballero-Casero, L. Belova, P. Vervliet, [et al.] // *TrAC Trends in Anal. Chem.* – V. 136. – 116201.

555 Recent advances in non-targeted screening analysis using liquid chromatography - high resolution mass spectrometry to explore new biomarkers for human exposure / Z. Guo, S. Huang, J. Wang, [et al.] // *Talanta.* – 2020. – Vol. 219. – 121339.

556 Rapid detection of asperphenamate in a hay batch associated with constipation and deaths in dairy cattle. The application of DART-HRMS to veterinary forensic toxicology / N. Pozzato, E. Piva, I. Pallante, [et al.] // *Toxicon.* – 2020. – Vol. 187. – P. 122–128.

557 Multi-class analysis of 46 antimicrobial drug residues in pond water using UHPLC-Orbitrap-HRMS and application to freshwater ponds in Flanders, Belgium

/ T. Goessens, S. Huysman, N. De Troyer, [et al.] // *Talanta*. – 2020. – Vol. 220. – 121326.

558 Аналитические характеристики синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F и его маркеров в биологическом материале / С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гафенберг, [и др.] // *Фармация и фармакология*. – 2019. – Т. 7. – № 4. – С. 184–197.

559 Identification of Furanoylfentanyl and its Metabolites in Human Urine / A.V. Labutin, A.Z. Temerdashev, O.A. Dukova, [et al.] // *J Env. Anal. Toxicol.* – 2017. – Vol. 7. – № 3. – 1000456.

560 Rapid screening and identification of targeted or non-targeted antitussive adulterants in herbal medicines by Q-Orbitrap HRMS and screening database / C. Guo, L. Gong, W. Wang, [et al.] // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2020. – Vol. 447. – 116250.

561 Analysis of heterocyclic aromatic amine profiles in Chinese traditional bacon and sausage based on ultrahigh-performance liquid chromatography–quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC–Q-Orbitrap-HRMS) / H. Dong, Y. Xian, H. Li, [et al.] // *Food Chem.* – Vol. 310. – 125937.

562 Targeted and non-targeted forensic profiling of black powder substitutes and gunshot residue using gradient ion chromatography – high resolution mass spectrometry (IC-HRMS) / M.D. Gallidabino, R.C. Irlam, M.C. Salt, [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2019. – Vol. 1072. – P. 1–14.

563 Determination of capsaicinoids and carotenoids for the characterization and geographical origin authentication of paprika by UHPLC–APCI–HRMS / A. Arrizabalaga–Larranaga, G. Campmajo, J. Saurina, [et al.] // *LWT*. – Vol. 139. – 110533.

564 LC-HRMS/MS-based phytochemical profiling of Piper spices: Global association of piperamides with endocannabinoid system modulation / S.V. Luca, M. Minceva, J. Gertsch, [et al.] // *Food Res. Int.* – 2021. – Vol. 141. – 110123.

565 A UHPLC-HRMS based metabolomics and chemoinformatics approach to chemically distinguish ‘super foods’ from a variety of plant-based foods / F. Di Ottavio, J.M. Gauglitz, M. Ernst, [et al.] // Food Chem. – 2020. – Vol. 313. – 126071.

566 Bardarov, K. HPLC–HRMS method for fast phytochelatin determination in plants. Application to analysis of *Clinopodium vulgare* L. / K. Bardarov, M. Naydenov, R. Djingova // Talanta. – 2015. – Vol. 142. – P. 20–27.

567 Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Food and Drug Administration. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bio-analytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (дата обращения 29.01.2021)

568 Патент № 2695033 Российская Федерация, МПК G01N 30/72. Способ стабилизации шкалы масс и калибрانت для его осуществления : № 2018114008 : заявл. 16.04.2018 : опубл. 18.07.2019 / Темердашев А.З., Азарян А.А., Дмитриева Е.В., Гашимова Э.М. : заявитель ФГБОУ ВО КубГУ. – 7 с. : ил.

569 Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS / M.H. Tang, C.K. Ching, C.Y. Lee, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2014. – Vol. 969. – P. 272–284.

570 Molecularly imprinted solid-phase extraction of (–)-ephedrine from Chinese Ephedra / X. Dong, W. Wang, S. Ma, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2005. – Vol. 1070. – P. 125–130.

571 Poole, C. F. Gas chromatography on wall-coated open-tubular columns with ionic liquid stationary phases / C. F. Poole, N. Lenca // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 87–109.

572 Recent advances in the application of core–shell structured magnetic materials for the separation and enrichment of proteins and peptides / M. Zhao, Y. Xie, C. Deng, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 182–193.

573 Chaudhuri, R.G. Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications / R.G. Chaudhuri, S. Paria // Chem. ReVol. – 2012. – Vol. 112. – P. 2373–2433.

574 Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography / R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 36–52.

575 Recent advances of ionic liquids and polymeric ionic liquids in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography / S. Tang, S. Liu, Y. Guo, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 147–157.

576 Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry / B. Socas-Rodríguez, A.M. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 110–146.

577 Diamond based adsorbents and their application in chromatography / A.A. Peristyuy, O. Fedyanina, B. Paull, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 68–86.

578 Carbon-based sorbents: Carbon nanotubes / X. Liang, S. Liu, S. Wang, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1357. – P. 53–67.

579 Domínguez-Romero, J.C. Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography–mass spectrometry / J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz // J. Chromatogr. A. – 2014. – Vol. 1361. – P. 34–42.

580 Колычев, И.А. Криминалистическое исследование наркотических средств, получаемых из растений мак / И.А. Колычев // Судебная экспертиза. – 2007. – №1. – С.102–109.

581 Камаев, А.В. Экспертное исследование опия, маковой соломы и других препаратов, кустарно изготавливаемых из мака, методом жидкостной хроматографии / А.В. Камаев. – М.: ЭКЦ МВД РФ, 1995. – 5 с.

582 Колычев, И.А. ВЭЖХ определение некоторых алкалоидов опия на семенах мака пищевого / Колычев И.А., Темердашев А.З., Кальницкий А.Г. //

Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. – Т. 77. – № 6. – С. 14–17.

583 Патент № 2429238 Российская Федерация, МПК C07D 489/02, B01D 11/00. Способ определения опийных алкалоидов : № 2010112141 : заявл. 29.03.2010 : опубл. 20.09.2011 / Темердашев А.З., Колычев И.А., Киселева Н.В., Кальницкий А.Г. : заявитель ФГБОУ ВПО КубГУ. – 13 с. : ил.

584 John A., James C. Production of thebaine and oripavine // US Patent Application №6723894USA01B79/00. 2011.

585 Яковлев, Г.П. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия / Г.П. Яковлев. – СПб: СпецЛит, 2006. – 845 с

586 Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

587 Гринкевич, Н.И. Химический анализ лекарственных растений / Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высшая Школа, 1983. – 176 с.

588 Phytochemical studies on *Datura metel* linn. In Marathwada region, Maharashtra / M.S. Jamdhade, S.A. Survase, M.A. Kare, [et al.] // Journal of Phytology. – 2010. – Vol. 12. – №2. – P. 46–48.

589 Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium* / E. Miraldi, A. Masti, S. Ferri, [et al.] // Fitoterapia. – 2001. – VOL. 72. – P. 644–648.

590 Leroy, P. Determination of atropine in pharmaceutical dosage forms containing vegetal preparations, by high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection / P. Leroy, A. Nicolas // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1987. – Vol. 5. – №5. – P. 477–484.

591 Bo, T. Investigation of the effect of space environment on the contents of atropine and scopolamine in *Datura metel* by capillary zone electrophoresis / T. Bo, K. An Li, H. Liu // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2003. – Vol. 31. – P. 885–891.

592 Simultaneous determination of atropine, anisodamine, and scopolamine in plant extract by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with

electrochemiluminescence and electrochemistry dual detection / B. Yuan, C. Zheng, H. Teng, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2010. – Vol. 1217. – P. 171–174.

593 Enantiomeric separation of atropine in *Scopolia* extract and *Scopolia Rhizome* by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors / S. Tahara, A. Okayama, Y. Kitada, [et al.] // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 848. – P. 465–471.

594 Rapid determination of atropine and scopolamine content in scopolia extract powder by HPLC / Y. Sawabe, K. Yamasaki, T. Tagami, [et al.] // J. Nat. Med. – 2010. – Vol. 65. – P. 395–399.

595 Philipov, S. Investigation of Tropane Alkaloids in *Datura stramonium* / S. Philipov, S. Berkov // Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 2002. – Vol. 57. – P. 559–561.

596 Evans, W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy (16th edition) / W.C. Evans, G.E. Trease. – NY: Saunders Ltd., 2009. – 616 p.

597 Aehle, E. Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update / E. Aehle, B. Dräger // J. Chromatogr. B. – 2010. – Vol. 878. – P. 1391–1406.

598 Petruczynik, A. Effect of Chromatographic Conditions on the Separation and System Efficiency for HPLC of Selected Alkaloids on Different Stationary Phases / A. Petruczynik // J. AOAC Int. – 2011. – Vol. 94. – №1. – P. 77–89

599 Темердашев, З.А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращено-фазовой ВЭЖХ / З.А. Темердашев, Н.А. Фролова, И.А. Колычев // Журн. Аналит. Хим. – 2011. – Т. 66. – №4. – С. 417–424.

600 Темердашев, А.З. Определение некоторых наркотических средств природного и синтетического происхождения с использованием методов хромато-масс-спектрометрии / А.З. Темердашев, Н.В. Киселева, В.Г. Матвиенко // Аналитика и контроль. – 2014. – Т. 18. – № 3. – С. 266–279.

601 Применение методов хромато-масс-спектрометрии для контроля спортивного питания и препаратов, реализующихся через интернет / А.З. Темердашев, А.А. Азарян, А.В. Лабутин, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2017. – Т. 72. – № 11. – С. 1032–1043.

602 Temerdashev, A. Meldonium determination in milk and meat through UHPLC-HRMS / A. Temerdashev, E. Dmitrieva, A. Azaryan // Heliyon. – 2020. – Vol. 6. – № 8. – e04771.

603 Определение некоторых катинонов, тропановых алкалоидов и "аптечных наркотиков" в моче / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Светличная, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2016. – Т. 71. – № 9. – С. 995–1004.

604 УВЭЖХ-МС/ВР – определение некоторых рилизинг-пептидов гормона роста в моче / А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева, А.А. Азарян, [и др.] // Аналитика и контроль. – 2019. – Т. 23. – № 4. – С. 509–516.

605 Применение ВЭЖХ-МС/МС для определения некоторых инсулиноподобных факторов мышечного роста / А.З. Темердашев, А.В. Горшенина, Е.В. Светличная // Аналитика и контроль. – 2016. – Т. 20. – № 2. – С. 154–160.

606 Патент № 2639475 Российская Федерация, МПК G01N 30/72, G01N 33/49. Способ определения мельдония в моче человека : № 2017112225 : заявл.: 10.04.2017 : опубл.: 21.12.2017 / Азарян А.А., Темердашев А.З., Киселева Н.В. : заявитель ФГБОУ ВО «КубГУ». – 11 с. : ил.

607 Азарян, А.А. Определение мельдония в моче человека методом ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / А.А. Азарян, А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева // Журн. аналит. химии. – 2017. – Т. 72. – № 10. – С. 885–889.

608 Определение андарина (S-4), селективного модулятора андрогенных рецепторов, и ибутаморена (МК-677), непептидного секретаря гормона роста, в моче ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / Е.В. Дмитриева, А.З.

Темердашев, А.А. Азарян, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2018. – Т. 73. – № 7. – С. 523–528.

609 Использование твердофазной экстракции для определения используемых в спорте лекарственных средств в моче человека методом УВЭЖХ-МС/МС / Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян, [и др.] // Аналитика и контроль. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 236–244.

610 Использование твердофазной экстракции для определения AICAR в моче методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–тан-демной масс-спектрометрии / Е.В. Дмитриева, А.З. Темердашев, А.А. Азарян, [и др.] // Журн. аналит. химии. – 2019. Т. 74. – № 9. – С. 668–672.

611 Темердашев, А.З. Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов / А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева // Журн. аналит. химии. – 2020. – Т. 75. – № 7. – С. 579– 596.

612 Подольский, И.И. Хроматографическая оценка влияния остарина и эрдистерона на стероидный профиль мужчин и женщин / И.И. Подольский, Е.С. Мочалова, А.З. Темердашев // Сорб. хроматогр. проц. – 2020. – Т. 20. № 4. – С. 445–453.

613 A novel approach to the quantification of urinary aryl-propionamide-derived SARMs by UHPLC–MS/MS / A. Temerdashev, E. Dmitrieva, A. Azaryan, [et al.] // Biomed. Chromatogr. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – e4700.

614 Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-HRMS detection / E. Dmitrieva, A. Temerdashev, A. Azaryan, [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2020. – Vol. 1159. – 122390.

615 Темердашев, А.З. Применение методов хромато-масс-спектрометрии в целях проведения комплексной посмертной химико-токсикологической экспертизы / А.З. Темердашев, Э.М. Гашимова // Сорбц. хроматогр. проц. – 2019. – Т. 19. – № 5. – С. 542–549.

616 LC–MS/MS determination of catecholamines in urine using FMOC-Cl derivatization on solid-phase extraction cartridge / A. Azaryan, E. Dmitrieva, E. Gashimova, [et al.] // *Chromatographia*. – 2018. – Vol. 11. – № 11. – P. 1487–1494.

617 Патент № 2688184 Российская Федерация, МПК G01N 33/48, G01N 33/50. Способ определения производных катехоламинов в моче : № 2018112124 : заявл.: 03.04.2018 : опубл.: 21.05.2019 / Азарян А.А., Темердашев А.З., Дмитриева Е.В., Гашимова Е.В. : заявитель ФГБОУ ВО «КубГУ». – 11 с. : ил.

618 Лабутин, А.В. Идентификация (2-аминопропил)бензофурана и его метаболитов в моче человека / А.В. Лабутин, А.З. Темердашев // *Журн. аналит. Химии*. – 2017. – Т. 72. – № 7. – С. 650–656.

619 Лабутин, А.В. Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / А.В. Лабутин, А.З. Темердашев // *Масс-спектрометрия*. – 2015. – Т. 12. – № 1. – С. 30–38.

620 Темердашев, А.З. Наркотические средства природного происхождения и методы их определения / А.З. Темердашев, А.М. Григорьев, И.В. Рыбальченко // *Журн. аналит. Химии*. – 2016. – Т. 71. – № 1. – С. 3–22.

621 Изучение метаболизма нового ноотропного препарата – унифирама методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии высокого разрешения / А.З. Темердашев, М.О. Зорина, Е.В. Дмитриева, [и др.] // *Журн. аналит. химии*. – 2021. – Т. 76. – № 2. – С. 143–150.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1



По месту требования

«05» марта 2021 года

СПРАВКА

Настоящим подтверждаю, что в рамках рассмотрения в Ассоциации «Российское антидопинговое агентство РУСАДА» вопроса о предположительном нарушении антидопинговых правил одной из российских спортсменок, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», кандидат химических наук, доцент Темердашев Азамат Зауалевич разработал методику определения мельдония в продуктах питания. Полученные А.З. Темердашевым результаты явились наглядной демонстрацией того, что в рассматриваемом случае источником попадания вещества «мельдоний» (внесено в Запрещенный список Всемирного антидопингового агентства с 01.01.2016 г.) в организм человека стали загрязненные данным веществом пищевые продукты, а не умышленное применение/употребление спортсменкой запрещенной субстанции. Установленные с помощью разработанной А.З. Темердашевым методики обстоятельства и факты позволили успешно оспорить примененное к спортсменке временное отстранение от спорта и обеспечить ее возврат к активной тренировочной и соревновательной деятельности.

Управляющий партнер

Пацев А.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

По месту требования

СПРАВКА

Настоящим подтверждаю, что в рамках действующего соглашения о сотрудничестве между ФГБОУ ВО «КубГУ» и ГУ МВД России по Краснодарскому краю, результаты представленные в работах Темердашева Азамата Зауалевича, посвященные скрининговым исследованиям наркотических средств природного и синтетического происхождения, опубликованные в открытой печати (научных журналах), используются в целях проведения экспертиз в экспертно-криминалистическом центре ГУ МВД России по Краснодарскому краю. В данных работах представлены не только результаты интерпретации масс-спектров новых наркотических средств, но и приведены их параметры удерживания, что позволяет повысить надежность проводимых экспертиз.

Начальник отдела
экспертно-криминалистического центра
ГУ МВД России по Краснодарскому краю



И.А. Балабаев

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ
Государственное бюджетное учреждение
здравоохранения
«Бюро судебно-медицинской экспертизы»
Министерства здравоохранения
Краснодарского края
(ГБУЗ «Бюро СМЭ» МЗ КК)
юр. Орджоникидзе ул., д.64, пом. 32, г.
Краснодар
почт. Октябрьская ул., д.44, г.Краснодар,
350063
тел./факс: (861)268-13-97
e-mail: sme-kuban@mail.ru
ОКПО 01912944, ОГРН 1022301431877
ИНН/КПП 2309022780/230901001

УНПК «Аналит»
А.З. Темердашеву

03.09.21 № 3186
на № _____ от _____

СПРАВКА

Настоящим подтверждаю, что результаты, представленные в работах Темердашева Азамата Зауалевича, опубликованные в открытой печати (научных журналах), посвященные определению наркотических, психоактивных и сильнодействующих веществ в биологических жидкостях были использованы в целях проведения экспертиз в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы» министерства здравоохранения Краснодарского края.

Справка выдана Темердашеву Азамату Зауалевичу, доценту, кандидату химических наук, старшему научному сотруднику ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» в ответ на обращение №1149 от 02.03.2021.

Земеститель начальника

Исп. А.В. Аталян



К.Н. Папаян

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный университет»
(ФГБОУ ВО КубГУ)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛЬДОНИЯ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА

Методика измерений методом ультравысокоэффективной
жидкостной хроматографии с тандемным
масс-спектрометрическим детектированием

ФР.4.31.2018.29251

Краснодар
2017

Предисловие

- 1 РАЗРАБОТАНА Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Кубанский государственный университет» (ФГБОУ ВО КубГУ)
- 2 РАЗРАБОТЧИКИ А.З. Темердашев, канд. хим. наук; Е.В. Дмитриева, канд. хим. наук; А.А. Азарян
- 3 УТВЕРЖДЕНА приказом ректора ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» от _____ № _____
- 4 АТТЕСТОВАНА ФГБУ «ГХИ», свидетельство об аттестации от 28.08.2017 № С 02067847.02.RA.RU.311345-2017
- 5 РАЗРАБОТАНА ВПЕРВЫЕ

Содержание

| | |
|--|----|
| 1 Область применения | 1 |
| 2 Нормативные ссылки | 1 |
| 3 Требования к показателям точности измерений | 1 |
| 4 Средства измерения, вспомогательные устройства, реактивы и материалы | 2 |
| 4.1 Средства измерений | 2 |
| 4.2 Вспомогательные устройства | 2 |
| 4.3 Реактивы и материалы | 3 |
| 5 Сущность метода | 3 |
| 6 Требования безопасности, охраны окружающей среды | 3 |
| 7 Требования к квалификации оператора | 4 |
| 8 Отбор и хранение проб | 4 |
| 10 Подготовка к выполнению измерений | 4 |
| 10.1 Приготовление раствора ацетата аммония | 4 |
| 10.2 Условия хроматографирования | 4 |
| 10.3 Условия детектирования | 5 |
| 11 Выполнение измерений | 6 |
| 11.1 Подготовка проб мочи | 6 |
| 11.2 Хроматографирование пробы | 6 |
| 11.3 Идентификация | 6 |
| 11.4 Холостовое определение | 6 |
| 11.5 Настройка масс-спектрометра | 7 |
| 12 Оформление (вычисление) результатов измерений | 7 |
| 14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории | 8 |
| 15 Оценка приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости | 9 |
| Приложение А (обязательное) Методика приготовления аттестованных растворов мельдония и габалестина | 10 |

УВЭЖЖ-МС/МС ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЛЬДОНИЯ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА
Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

Дата введения 2017-__-__

1 Область применения

1.1 Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой концентрации мельдония в моче человека в диапазоне концентраций от 100 до 2500 нг/см³ методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

1.2 Методика предназначена для применения в лабораториях, осуществляющих анализ биологических жидкостей человека.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие документы:

- ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.
- РМГ 76-2014 ГСИ Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.
- ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

3 Требования к показателям точности измерений

3.1 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий измерений характеристики погрешности результата измерения с вероятностью 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

- 3.2 Значения показателя точности методики используют при:
- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
 - оценке деятельности лаборатории на качество проведения испытаний;
 - оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики измерений в конкретной лаборатории.

Таблица 1 – Диапазон измерений массовой концентрации мельдония, значения характеристик погрешности и ее составляющих при принятой вероятности P=0,95

| Диапазон измерений массовой концентрации мельдония | Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторности) | Показатель воспроизводимости (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) | Показатель гравитационности (разница систематической погрешности) | Показатель точности (разница погрешности) |
|--|--|--|---|---|
| X, мг/дм ³ От 100 до 250 включ. | 11 | σ _в , % 15 | σ _г , % 9 | ±δ, % 32 |
| Св. 250 до 2500 включ. | 5 | 7 | 5 | 12 |

4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

4.1 Средства измерений

4.1.1 Ультравискоэффективный жидкостный хроматограф «Ultimate-3000» (фирма «Thermo Scientific», США) с тройным кварцополным масс-спектрометрическим детектором «TSQ Quantum Access Max» (фирма «Thermo Scientific», США), оснащенный источником электроосыпательной ионизации при нагревании (HESI) и аналитической колонкой Phenomenex HILIC 100 x 2,1 мм, 2,6 мкм.

4.1.2 Весы неавтоматического действия (лабораторные) высокого класса точности по ГОСТ Р 53228-2008 или ГОСТ OIML R 76-1-2011, действительная цена деления (шкалы) 0,001 г или 0,01 г.

4.1.3 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2 или 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью:

- 100 см³ – 1 шт., 100 см³ – 5 шт., 1000 см³ – 1 шт., 10 см³ – 13 шт., 25 см³ – 21 шт., 5 см³ – 4 шт.
- Пилетки градуированные 2-го класса точности типа 3 исполнения 1 или 2 по ГОСТ 28227-91 вместимостью: 1 см³ – 21 шт., 5 см³ – 4 шт.

4.2 Вспомогательные устройства

4.2.1 Центрифуга для пробирок эппендорф, обеспечивающая скорость вращения не менее 10000 об/мин.

4.2.2 Холодильник бытового.

4.2.3 Система очистки воды «Milli-Q» («Millipore», Франция)

4.2.4 Используемые в ходе анализа пробирки типа «эппендорф» и вials являются одноразовыми. Допускается использовать как стеклянные, так и полипропиленовые вials.

4.3 Реактивы и материалы

- 4.3.1 Ацетонитрил, «градилит-грейд» («Biosolve», Израиль) или аналог, чистотой не менее 0,99.
- 4.3.2 Вода деионизированная.
- 4.3.3 Кислота муравьиная по ГОСТ 5848-73, ч.д.а.
- 4.3.4 Аммоний уксуснокислый (ацетат аммония) по ГОСТ 3117-78, х.ч
- 4.3.5 Натрий азотистоводородный (азид натрия) по ГОСТ 84-1420-77, ч.д.а.
- 4.3.6 Стандартный образец мельдония, чистотой не менее 97% (Sigma-Aldrich)
- 4.3.7 Стандартный образец габалентина, чистотой не менее 97% (Sigma-Aldrich)

Примечание – Допускается применение средств измерений, вспомогательных устройств и реактивов с характеристиками, не хуже, чем приведенных в 4.

5 Сущность метода

Для определения мельдония в моче использован метод УВЭЖХ-МСМС (ЭРИ), сущность которого состоит в разделении компонентов смеси, основанном на разном средстве веществ к сорбенту, используемому в колонке, и, как следствие, разной эффективностью удерживания в потоке подвижной фазы, смывающей вещества с сорбента.

Пробу мочи разбавляют детергентом, осаждающим белок, содержащийся в моче, с последующим центрифугированием и отбором жидкой фазы на анализ. В жидкой фазе проводят идентификацию и количественное определение мельдония.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

- 6.1 По степени воздействия на организм применяемые реактивы относятся к 1 и 2 классу опасности по ГОСТ 12.1.007.
- 6.2 Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.
- 6.3 Операторы должны быть проинструктированы о мерах предосторожности при работе с химическими реактивами, электрооборудованием и сжатыми газами.
- 6.4 В помещении, где установлены приборы, не должны храниться концентрированные кислоты и проводиться работа с ними.
- 6.5 Отходы вредно действующих и ядовитых веществ должны быть собраны и утилизированы.
- 6.6 Особых требований по экологической безопасности на производстве.

6.7 Операторы должны быть проинструктированы о мерах предосторожности при работе с биологическими жидкостями человека.

7 Требования к квалификации оператора

К подготовительным работам допускаются лаборанты, имеющие опыт работы в химических лабораториях не менее 1 года. Определение и расчет количественного содержания мельдония должны выполняться квалифицированными специалистом - химик, имеющий специальное образование, прошедший соответствующий инструктаж, владеющий теорией и практикой (не менее 1 года) хроматографического анализа.

8 Отбор и хранение проб

Отбор проб мочи производится в специальные контейнеры, полученные пробы консервируют добавлением 10 г азиды натрия, замораживают и хранят в холодильнике при температуре от минус 15 – до 18 °С. В замороженном виде допускается хранение проб до 4 месяцев.

9 Условия выполнения измерений

- При выполнении измерений соблюдают следующие условия:
- температура окружающего воздуха, °С 22 ± 5;
- атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.) от 84,0 до 106,7 (от 630 до 800);
- влажность воздуха при температуре 25 °С, %, не более 80;
- напряжение в сети, В 220 ± 22;
- частота переменного тока в сети питания, Гц 50 ± 1.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Приготовление раствора ацетата аммония

В мерную колбу, объемом 1 дм³, вносят 0,77 г безводного химически чистого ацетата аммония, добавляют 500 см³ деионизированной воды, тщательно перемешивают (до полного растворения ацетата аммония), после чего доводят до метки и снова перемешивают. Полученному раствору приписывают молярную концентрацию 10 ммоль/дм³ (10 мМ). Раствор используют в качестве подвижной фазы не более 2-х недель после приготовления.

10.2 Условия хроматографирования

Разделение осуществляется в режиме гидрофильной жидкостной хроматографии с использованием в качестве подвижной фазы ацета-

нитрила (А) и 10 мМ водного раствора ацетата аммония (В) по программе, представленной в таблице 2.

Скорость потока подвижной фазы – 0,3 мл/мин, температура термостага колонки – 30 °С. Объем вводимой пробы – не более 10 мкл.

Таблица 2 – условия хроматографического определения мельдония в режиме гидрофильной хроматографии

| Время, мин | А (ацетонитрил), % | В (10 мМ ацетат аммония), % |
|------------|--------------------|-----------------------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 83 | 17 |
| 4 | 62 | 38 |
| 6 | 42 | 58 |
| 8 | 35 | 65 |
| 10 | 35 | 65 |
| 12 | 35 | 65 |
| 14 | 35 | 65 |
| 16 | 55 | 5 |

10.3 Условия детектирования

Детектирование мельдония и габалентина (внутренний стандарт, ВС) осуществляется с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора в режиме селективного мониторинга реакций (SRM) или множественного мониторинга реакций (MRM) в соответствии с условиями, приведенными в таблице 3:

Таблица 3 – Условия детектирования мельдония и габалентина

| Вещество | Время удерживания, мин | Ион-прекурсор, m/z | Продукт-ион, m/z | Энергия соударений, эВ | Напряжение на экранирующей линзе, В |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Мельдоний | 6.20 | 147.1 | 58.3 | 32 | 57 |
| Габалентин (ВС) | 4.35 | 172.3 | 137.2 | 14 | 75 |
| | | | 95.3 | 20 | |
| | | | 67.3 | 28 | |

Напряжение на источнике нагреваемой электрораспылительной ионизации – 3000 В, температура источника ионизации – 350 °С, температура трансферного капилляра – 320 °С, режим регистрации положительных ионов, расход газа-распылителя (азот) – 60 усл. ед., вспомогательного газа (азот) – 10 усл. ед., давление газа-мишени (аргон) – 1,5 мТорр (0,2 Па).

Оптимальные значения энергий соударений, продукт-ионов, ионс-прекурсоров и напряжений на экранирующей линзе могут отличаться от

приведенных в таблице и устанавливаются путем напуска стандартных веществ в камеру источника ионизации с последующей оптимизацией условий. Время удерживания габалентина и мельдония также могут отличаться от приведенных в таблице и устанавливается путем анализа стандартных образцов мельдония и габалентина. Ширина окна сканирования мельдония и габалентина составляет не менее $\pm 0,5$ минут от экстремума пика, время сканирования каждого перехода – не менее 50 мсек.

10.4 Аттестованные растворы готовят в соответствии с приложением А.

11 Выполнение измерений

11.1 Подготовка проб мочи

В пробирку эппендорф, градуированной пипеткой вместимостью 1 см^3 вносят $0,2 \text{ см}^3$ анализируемой мочи и, с использованием градуированной пипетки, вместимостью 5 мл, добавляют 1,8 мл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт, перемешивают, центрифугируют при 10000 об/мин 10 минут. Жидкую фазу переносят вialsы и анализируют в описанных в п. 10 условиях.

11.2 Хроматографирование пробы

Пробу следует разбавить или сконцентрировать, чтобы уложиться в линейный диапазон работы детектора. Для количественных измерений детектор должен работать в линейном диапазоне и уровень шумов не должен быть более 10% полной шкалы. Если содержание мельдония превышает линейный диапазон, исходная проба предварительно разбавляется чистым ацетонитрилом, не содержащим внутреннего стандарта.

Объем вводимой пробы должен оставаться одинаковым и не превышать 10 мкл .

11.3 Идентификация

Идентификацию проводят по времени удерживания пиков на хроматограммах стандартных образцов аналитов и сопоставляют их с временами удерживания аналитов в пробе. Время удерживания стандартов и аналитов в пробе не должно отличаться больше, чем на 0,2 мин.

11.4 Холостое определение

Холостое определение проводят для исключения сшибок, вносимых используемыми реактивами.

6

Для серии проб мочи холостое определение проводят путем проведения прободготовки контрольного образца мочи и дальнейшим хроматографированием пробы, описанном в п. 10 и п. 11. Холостая проба готовится для каждой серии проб, анализируемой в один день. Дополнительные холостые пробы готовятся в том случае, если в ходе прободготовки происходит замена партии какого-либо реактива, с целью исключения возможности загрязнения образцов.

11.5 Настройка масс-спектрометра

Настройка масс-спектрометра проводится не ранее, чем спустя сутки после его включения, до калибровки и анализа проб. Настройка осуществляется с использованием стандартной калибровочной смеси, рекомендуемой производителем, в автоматическом режиме. Результат настройки контролируется по следующим параметрам: стабильность шкалы масс, напряжение на детекторе, форма пиков и их интенсивность. Тест признается пройденным, если все значения находятся в рамках допуска, рекомендованного производителем. В случае длительной эксплуатации масс-спектрометра без выключения настройка проводится не реже 1 раза в 2 недели, с целью пресерви его чувствительности и стабильности поддержания шкалы масс.

12 Оформление (вычисление) результатов измерений

12.1 Поскольку для проведения испытаний используется метод внутреннего стандарта, калибровочный график строится как зависимость концентрации мельдония (C_x) от соотношения площади габалентина (внутреннего стандарта) к площади мельдония ($S_{\text{габ}}/S_{\text{мд}}$). Исходная концентрация мельдония (X) в исследуемой пробе рассчитывается по следующей формуле

$$X = C_x \cdot 10, \text{ нг/см}^3$$

12.1 Результат измерений X в документах, выдаваемых лабораторией, может быть представлен в виде:

$$X \pm \Delta_x, \quad P = 0,95, \quad (3)$$

где $\Delta_x = 0,01 \cdot \delta_x \cdot X$ (X – массовая концентрация мельдония в пробе, нг/см^3),

Значения δ_x приведены в таблице 1.

12.2 Допустимо представлять результат в виде:

$$X \pm \Delta_m, \quad P = 0,95, \quad \text{при условии } \Delta_m < \Delta, \quad (4)$$

7

где $\Delta_{\text{ак}}$ - значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

Примечание - Допустимо характеристику погрешности результатов измерений при введении методики в лабораторию устанавливать на основе выражения: $\Delta_{\text{ак}} = 0,84 \cdot \Delta$, с последующим уточнением по мере накопления информации в процессе контроля стабильности результатов измерений.

14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

14.1 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности, среднеквадратичного отклонения повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, погрешности).

14.2 Алгоритм контроля процедуры выполнения измерений с использованием метода добавок

14.2.1 Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений проводится путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры K_c с нормативом контроля K_n .

14.2.2 Результат контрольной процедуры K_c рассчитывают по формуле

$$K_c = |X' - X - C|, \quad (5)$$

где X' - результат контрольного измерения массовой концентрации определяемого компонента в рабочей пробе с известной добавкой;

X - результат контрольного измерения массовой концентрации определяемого компонента в рабочей пробе;

C - величина добавки.

14.2.3 Норматив контроля K_n для мельдона рассчитывают по формуле

$$K_n = \sqrt{(\Delta_{\text{пк}})^2 + (\Delta_{\text{лп}})^2} \quad (6)$$

где $\Delta_{\text{пк}}$, $\Delta_{\text{лп}}$ - значения характеристик погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации определяемого компонента в пробе с добавкой и в рабочей пробе, соответственно.

в

$\Delta_{\text{пк}} = 0,01 \delta_{\text{ак}} X$ (X - массовая концентрация определяемого компонента в пробе);

$\Delta_{\text{лп}} = 0,01 \delta_{\text{ак}} X'$ (X' - массовая концентрация определяемого компонента в пробе с добавкой).

Значения $\delta_{\text{ак}}$ ($\delta_{\text{ак}}$) установлены в лаборатории.

14.2.4 Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным, при выполнении условия:

$$K_c \leq K_n \quad (7)$$

При невыполнении условия (7) эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия (7) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

14.3 Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Ружоводстве по качеству лаборатории.

15 Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

15.1 Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение. Значение предела воспроизводимости R , мг/дм³, рассчитывают по формуле

$$R = 2,77 \cdot \sigma_R \quad (7)$$

где σ_R - показатель воспроизводимости, мг/дм³

15.2 При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6 (раздел 5) или МИ 2881.

15.3 Проверка приемлемости проводится при необходимости сравнения результатов измерений, полученных двумя лабораториями.

Приложение А
(обязательное)

Методика

приготовления аттестованных растворов мельдония и габапентина

А.1 Назначение и область применения

Настоящая методика регламентирует процедуру приготовления аттестованных растворов мельдония и габапентина, предназначенных для контроля точности результатов измерений мельдония в моче человека методом ультрафиолетово-спектрометрической жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

А.2 Метрологические характеристики

А.2.1 Аттестованное значение растворов мельдония

Таблица А.1 – Метрологические характеристики калибровочных растворов мельдония

| Наименование аттестованного раствора | AK1-M | AK2-M | AK3-M | AK4-M | AK5-M | AK6-M |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Аттестованное значение массовой концентрации мельдония, мкг/см ³ | 10,0 | 12,5 | 25,0 | 100 | 125 | 250 |
| Парашающая установленная аттестованного значения массовой концентрации мельдония (P=0,95), мкг/см ³ | 0,4 | 0,6 | 1,1 | 4 | 6 | 10 |

А.3 Средства измерений, вспомогательные устройства

- А.3.1 Весы неавтоматического действия (лабораторные) специального (I) класса точности по ГОСТ Р 53228-2008 или ГОСТ OIML R 76-1-2011, действительная цена деления (шкалы) 0,0001 г
- А.3.2 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2 или 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью: 10 см³ – 15 шт., 25 см³ – 1 шт., 100 см³ – 5 шт., 1000 см³ – 1 шт.
- А.3.3 Пипетки с одной отметкой 2 класса точности исполнения 2 по ГОСТ 29169-91 вместимостью: 1 см³ – 4 шт., 2 см³ – 3 шт.
- А.3.4 Пипетки градуированные 2-го класса точности типа 3 исполнения 1 или 2 по ГОСТ 29227-91 вместимостью: 1 см³ – 12 шт., 5 см³ – 1 шт.
- А.3.5 Стаканчики для взвешивания (бюкс) СВ-19/9 по ГОСТ 25336-82 – 3 шт.
- А.3.6 Вials стеклянные или пропиленовые «Vetec» производства «Rheingoldex» или с аналогичными характеристиками вместимостью 2 см³ – 12 шт.

А.4 Исходные компоненты аттестованных растворов

- А.4.1 Стандартный образец мельдония, чистотой не менее 97 % (Sigma-Aldrich)
- А.4.2 Стандартный образец габапентина, чистотой не менее 97% (Sigma-Aldrich)

А.5 Приготовление аттестованных растворов мельдония и габапентина

А.5.1 Приготовление аттестованного раствора AP1-M

На весах неавтоматического действия специального (I) класса точности взвешивают 25 мг мельдония. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³. Объем доводят до метки смесью, состоящей из воды и ацетонитрила (20:80, по объему) и перемешивают. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 1,0 мг/см³.

А.5.2 Приготовление аттестованного раствора AP2-M

На весах неавтоматического действия специального (I) класса точности взвешивают 25 мг мельдония. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 см³. Объем доводят до метки смесью, состоящей из воды и ацетонитрила (20:80, по объему) и перемешивают. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 2,5 мг/см³.

А.5.3 Приготовление аттестованного раствора AP3-Г

На весах неавтоматического действия специального (I) класса точности взвешивают 55 мг габапентина. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 см³. Объем доводят до метки смесью, состоящей из воды и ацетонитрила (20:80, по объему) и перемешивают. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию габапентина, равную 5,5 мг/см³.

А.5.4 Приготовление аттестованного раствора AP4-M

Градуированной пипеткой вместимостью 5 см³ отбирают 2,5 см³ раствора AP2-M, переносят в мерную колбу вместимостью 5 см³ и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (20:80, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 1,25 мг/см³.

А.5.5 Приготовление аттестованного раствора AP5-M

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см³ отбирают 1,0 см³ раствора AP1-M, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (20:80, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 10,0 мкг/см³.

А.5.12 Приготовление аттестованного раствора AP12-Г

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP8-Г, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию габалентина, равную $5,5\text{ мкг/см}^3$.

А.5.13 Приготовление аттестованного раствора AP13-Г

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP12-Г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию габалентина, равную $55,0\text{ нг/см}^3$ и используют в качестве разбавителя для проб.

А.5.14 Приготовление аттестованного раствора AP14-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP9-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 200 нг/см^3 .

А.5.15 Приготовление аттестованного раствора AP15-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP10-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную 500 нг/см^3 .

А.5.16 Приготовление аттестованного раствора AP16-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP11-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $250,0\text{ нг/см}^3$.

А.6 Приготовление калибровочных растворов мельдония с внутренним стандартом (габалентинном)

Контрольные образцы мочи добровольцев, не содержащие мельдония и габалентина, используются для построения калибровки следующим образом:

А.6.1 Приготовление калибровочного раствора КР1-М

Градуированными пипетками вместимостью 1 см^3 из раствора AP14-М и контрольного образца мочи отбирают по $0,5\text{ см}^3$, переносят в мерную колбу, объемом 10 см^3 и доводят до метки раствором AP13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $10,0\text{ нг/см}^3$.

А.5.6 Приготовление аттестованного раствора AP6-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP2-М, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (20:80, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $25,0\text{ мкг/см}^3$.

А.5.7 Приготовление аттестованного раствора AP7-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP4-М, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (20:80, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $12,5\text{ мкг/см}^3$.

А.5.8 Приготовление аттестованного раствора AP8-Г

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 1 см^3 отбирают 1 см^3 раствора AP3-Г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (20:80, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию габалентина, равную $55,0\text{ мкг/см}^3$.

Растворы AP5-Г—AP8-Г хранят в холодильнике при температуре от $4\text{ }^\circ\text{C}$ до $6\text{ }^\circ\text{C}$ не более двух месяцев и используются для приготовления калибровочных растворов.

А.5.9 Приготовление аттестованного раствора AP9-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 2 см^3 отбирают 2 см^3 раствора AP5-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $2,0\text{ мкг/см}^3$.

А.5.10 Приготовление аттестованного раствора AP10-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 2 см^3 отбирают 2 см^3 раствора AP6-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $5,0\text{ мкг/см}^3$.

А.5.11 Приготовление аттестованного раствора AP11-М

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 2 см^3 отбирают 2 см^3 раствора AP7-М, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят до метки смесью воды и ацетонитрила (10:90, по объему). Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдония, равную $2,5\text{ мкг/см}^3$.

А.6.2 Приготовление калибровочного раствора КР2-М

Градуированными пипетками вместимостью, вместимостью 1 см³ из раствора АР10-М и контрольного образца мочи отбирают по 0,5 см³, переносят в мерную колбу, объемом 10 см³ и доводят до метки раствором АР13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдона, равную 12,5 мг/см³.

А.6.3 Приготовление калибровочного раствора КР3-М

Градуированными пипетками вместимостью, вместимостью 1 см³ из раствора АР15-М и контрольного образца мочи отбирают по 0,5 см³, переносят в мерную колбу, объемом 10 см³ и доводят до метки раствором АР13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдона, равную 25,0 мг/см³.

А.6.4 Приготовление калибровочного раствора КР4-М

Градуированными пипетками вместимостью 0,5 см³ из раствора АР8-М и контрольного образца мочи отбирают по 0,5 см³, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см³ и доводят до метки раствором АР13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдона, равную 100 мг/см³.

А.6.5 Приготовление калибровочного раствора КР5-М

Градуированными пипетками вместимостью 1 см³ из раствора АР11-М и контрольного образца мочи отбирают по 0,5 см³, переносят в мерную колбу, объемом 10 см³ и доводят до метки раствором АР13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдона, равную 125 мг/см³.

А.6.6 Приготовление калибровочного раствора КР6-М

Градуированными пипетками вместимостью 1 см³ из раствора АР10-М и контрольного образца мочи отбирают по 0,5 см³, переносят в мерную колбу, объемом 10 см³ и доводят до метки раствором АР13-Г. Полученному раствору приписывают массовую концентрацию мельдона, равную 250,0 мг/см³.

А.6.7 В каждую из 6-ти микропробирок Эппендорф переносят с помощью градуированной пипетки, вместимостью 2 см³ по 1,5 см³ каждого калибровочного раствора (КР1-КР6), центрифугируют при 10000 об/мин 10 минут. Жидкую фазу переносят в вials и анализируют в описанных в п. 10 условиях не позднее, чем через 48 ч с момента приготовления калибровочных растворов.

А.7 Расчет метрологических характеристик аттестованных растворов

А.7.1 Расчет метрологических характеристик аттестованной смеси АР1-М

Значение массовой концентрации мельдона С₁, мг/см³, в аттестованном растворе АР1-М рассчитывают по формуле

$$C_1 = \frac{m_1}{V_1} \quad (\text{А.1})$$

где m₁ – масса навески мельдона, мг,
V₁ – вместимость мерной колбы, см³.

$$C_1 = \frac{25,0}{25} = 1,0 \text{ мг/см}^3.$$

Погрешность приготовления Δ₁, мг/см³, аттестованного раствора АР1-М рассчитывают по формуле

$$\Delta_1 = C_1 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta m_1}{m_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_1}{V_1}\right)^2} \quad (\text{А.2})$$

где Δm₁ – предельное значение возможного отклонения массовой доли мельдона в реактиве от приписанного значения, мг/см³.

m₁ – массовая доля мельдона в растворе, равная 97 %;

Δm₁ – предельная возможная погрешность взвешивания, мг.

ΔV₁ – предельное значение возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР1-М равна

$$\Delta_1 = 1,0 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,0002}{0,025}\right)^2 + \left(\frac{3}{97}\right)^2 + \left(\frac{0,08}{25}\right)^2} = 0,032 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.2 Расчет метрологических характеристик аттестованного раствора АР2-М

Значение массовой концентрации мельдона С₂, мг/см³, в аттестованном растворе АР2-М рассчитывают по формуле

$$C_2 = \frac{m_2}{V_2} \quad (\text{А.3})$$

где V₂ – вместимость мерной колбы, см³.

$$C_2 = \frac{25,0}{10} = 2,5 \text{ мг/см}^3.$$

Погрешность приготовления Δ₂, мг/см³, аттестованного раствора АР2-М рассчитывают по формуле

$$\Delta_2 = C_2 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta m_2}{m_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_2}{V_2}\right)^2} \quad (\text{А.4})$$

где ΔV_3 – предельное значение возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР2-М равна

$$\Delta_2 = 2,5 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,0002}{0,025}\right)^2 + \left(\frac{3}{97}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 0,081 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.3 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР4-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония C_4 , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_4 = \frac{C_2 \cdot V_3}{V_4} \quad (\text{A.5})$$

где V_3 – объем раствора АР2-М, отбираемый пипеткой, см³.

V_4 – вместимость мерной колбы, см³.

$$C_4 = \frac{2,5 \cdot 2,5}{5} = 1,25 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР4-М Δ_4 , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_4 = C_4 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_2}{C_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_3}{V_3}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_4}{V_4}\right)^2}. \quad (\text{A.6})$$

где ΔV_3 – предельное значение возможного отклонения вместимости пипетки от номинального значения, см³.

ΔV_4 – предельное значение возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР4-М равна

$$\Delta_4 = 1,25 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,081}{2,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{2,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{5}\right)^2} = 0,049 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.4 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР5-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония C_5 , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_5 = \frac{C_3 \cdot V_5}{V_6} \quad (\text{A.7})$$

где V_5 – объем раствора АР1-М, отбираемый пипеткой, см³.

16

V_6 – вместимость мерной колбы, см³.

$$C_5 = \frac{1,0 \cdot 1,0}{100} = 10,0 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР5-М Δ_5 , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_5 = C_5 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_1}{C_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_5}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_6}{V_6}\right)^2}. \quad (\text{A.8})$$

где ΔV_5 – предельное значение возможного отклонения вместимости пипетки от номинального значения, см³.

ΔV_6 – предельное значение возможного отклонения вместимости мерной колбы от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР5-М равна

$$\Delta_5 = 10,0 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,032}{1,0}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{1,0}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{100}\right)^2} = 0,335 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.5 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР6-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония C_6 , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_6 = \frac{C_3 \cdot V_5}{V_6} \quad (\text{A.9})$$

$$C_6 = \frac{2,5 \cdot 1,0}{100} = 25,0 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР6-М Δ_6 , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_6 = C_6 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_2}{C_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_5}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_6}{V_6}\right)^2}. \quad (\text{A.10})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР6-М равна

$$\Delta_6 = 25,0 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,081}{2,5}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{1,0}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{100}\right)^2} = 0,848 \text{ мг/см}^3.$$

17

А.7.6 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР7-М
Аттестованное значение массовой концентрации мелиндония C_7 , мг/см³,
рассчитывают по формуле

$$C_7 = \frac{C_4 \cdot V_4}{V_6} \quad (\text{A.11})$$

$$C_7 = \frac{1,25 \cdot 1,0}{100} = 12,5 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР7-М Δ_7 ,
мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_7 = C_7 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_4}{C_4}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_5}}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_6}}{V_6}\right)^2}. \quad (\text{A.12})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР7-М равна

$$\Delta_7 = 12,5 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,049}{1,25}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{1,0}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{100}\right)^2} = 0,506 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.7 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР9-М
Аттестованное значение массовой концентрации мелиндония C_9 , мг/см³,
рассчитывают по формуле

$$C_9 = \frac{C_5 \cdot V_2}{V_2} \quad (\text{A.13})$$

где V_2 – объем раствора АР5-М, отбираемый пипеткой, см³.

$$C_9 = \frac{10,0 \cdot 2,0}{10} = 2,0 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР9 М Δ_9 ,
мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_9 = C_9 \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_5}{C_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{A.14})$$

где Δ_{V_2} – предельное значение возможного отклонения вместимости пипетки
от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР9-М равна

$$\Delta_9 = 2,0 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,335}{10}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{2,0}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 0,071 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.8 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР10-М
Аттестованное значение массовой концентрации мелиндония C_{10} , мг/см³,
рассчитывают по формуле

$$C_{10} = \frac{C_8 \cdot V_2}{V_2}. \quad (\text{A.15})$$

$$C_{10} = \frac{25 \cdot 2,0}{10} = 5,0 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР10-М
 Δ_{10} , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{10} = C_{10} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_8}{C_8}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{A.16})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР10-М равна

$$\Delta_{10} = 5,0 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,848}{25}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{2,0}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 0,179 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.9 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР11-М
Аттестованное значение массовой концентрации мелиндония C_{11} , мг/см³,
рассчитывают по формуле

$$C_{11} = \frac{C_7 \cdot V_2}{V_2} \quad (\text{A.17})$$

$$C_{11} = \frac{12,5 \cdot 2,0}{10} = 2,5 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР11-М
 Δ_{11} , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{11} = C_{11} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_7}{C_7}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_1}}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{A.18})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР11-М равна

$$\Delta_{11} = 2.5 \cdot \sqrt{\left(\frac{0.506}{12.5}\right)^2 + \left(\frac{0.02}{2.0}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{10}\right)^2} = 0,105 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.10 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР14-М

Аттестованное значение массовой концентрации мольдония C_{14} , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{14} = \frac{C_9 \cdot V_5}{V_2} \quad (\text{А.19})$$

$$C_{14} = \frac{2.0 \cdot 1.0 \cdot 1000}{10} = 200 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР14-М Δ_{14} , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{14} = C_{14} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_9}{C_9}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_5}}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{А.20})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР14-М равна

$$\Delta_{14} = 200 \cdot \sqrt{\left(\frac{0.071}{2.0}\right)^2 + \left(\frac{0.01}{1.0}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{10}\right)^2} = 7,443 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.11 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР15-М

Аттестованное значение массовой концентрации мольдония C_{15} , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{15} = \frac{C_{10} \cdot V_5}{V_2} \quad (\text{А.21})$$

$$C_{15} = \frac{5.0 \cdot 1.0 \cdot 1000}{10} = 500 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР15-М Δ_{15} , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{15} = C_{15} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{10}}{C_{10}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_5}}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{А.22})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР15-М равна

$$\Delta_{15} = 500 \cdot \sqrt{\left(\frac{0.179}{5.0}\right)^2 + \left(\frac{0.01}{1.0}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{10}\right)^2} = 18,753 \text{ мг/см}^3.$$

А.7.12 Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР16-М

Аттестованное значение массовой концентрации мольдония C_{16} , мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{16} = \frac{C_{11} \cdot V_5}{V_2} \quad (\text{А.23})$$

$$C_{16} = \frac{2.5 \cdot 1.0 \cdot 1000}{10} = 250 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления аттестованного раствора АР16-М Δ_{16} , мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{16} = C_{16} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{11}}{C_{11}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_5}}{V_5}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{А.24})$$

Погрешность приготовления аттестованного раствора АР16-М равна

$$\Delta_{16} = 250 \cdot \sqrt{\left(\frac{0.105}{2.5}\right)^2 + \left(\frac{0.01}{1.0}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{10}\right)^2} = 10,866 \text{ мг/см}^3.$$

А.8 Расчет метрологических характеристик калибровочных растворов

А.8.1 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР1-М

Аттестованное значение массовой концентрации мольдония $C_{кр1}$, мг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{кр1} = \frac{C_{14} \cdot V_6}{V_2} \quad (\text{А.25})$$

где V_6 – вместимости пипетки, см³.

$$C_{кр1} = \frac{200 \cdot 0.5}{10} = 10 \text{ мг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР1-М $\Delta_{кр1}$, мг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{кр1} = C_{кр1} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{14}}{C_{14}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_6}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{А.25})$$

где Δ_{V_6} – предельное значение возможного отклонения вместимости пипетки от номинального значения, см³.

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР1-М равна

$$\Delta_{\text{КР1}} = 10 \cdot \sqrt{\left(\frac{7,443}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 0,4 \text{ нг/см}^3.$$

А.8.2 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР2-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония $C_{\text{кр2}}$, нг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{\text{КР2}} = \frac{C_9 \cdot V_6}{V_2} \quad (\text{А.27})$$

$$C_{\text{КР2}} = \frac{250 \cdot 0,5}{10} = 12,5 \text{ нг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР2-М $\Delta_{\text{КР2}}$, нг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{\text{КР2}} = C_{\text{КР2}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{16}}{C_{16}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_6}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{А.28})$$

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР2-М равна

$$\Delta_{\text{КР2}} = 12,5 \cdot \sqrt{\left(\frac{10,860}{250}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 0,5 \text{ нг/см}^3.$$

А.8.3 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР3-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония $C_{\text{кр3}}$, нг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{\text{КР3}} = \frac{C_{11} \cdot V_6}{V_2}. \quad (\text{А.29})$$

$$C_{\text{КР3}} = \frac{500 \cdot 0,5}{10} = 25 \text{ нг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР3-М $\Delta_{\text{кр3}}$, нг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{\text{КР3}} = C_{\text{КР3}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{15}}{C_{15}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_6}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{А.30})$$

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР3-М равна

$$\Delta_{\text{КР3}} = 25 \cdot \sqrt{\left(\frac{18,753}{500}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 1,1 \text{ нг/см}^3.$$

А.8.4 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР4-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония $C_{\text{кр4}}$, нг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{\text{КР4}} = \frac{C_9 \cdot V_6}{V_2} \quad (\text{А.31})$$

$$C_{\text{КР4}} = \frac{2,0 \cdot 0,5 \cdot 1000}{10} = 100 \text{ нг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР4-М $\Delta_{\text{кр4}}$, нг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{\text{КР4}} = C_{\text{КР4}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_9}{C_9}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_6}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{V_2}}{V_2}\right)^2}. \quad (\text{А.32})$$

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР4-М равна

$$\Delta_{\text{КР4}} = 100 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,071}{2,0}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 4 \text{ нг/см}^3.$$

А.8.5 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР5-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдония $C_{\text{кр5}}$, нг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{\text{КР5}} = \frac{C_{11} \cdot V_6}{V_2}. \quad (\text{А.33})$$

$$C_{\text{КР5}} = \frac{2,5 \cdot 0,5 \cdot 1000}{10} = 125 \text{ нг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР5-М $\Delta_{\text{кр5}}$, нг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{\text{КР5}} = C_{\text{КР5}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{\text{V1}}}{C_{\text{V1}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{\text{V6}}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{\text{V2}}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{A.34})$$

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР5-М равна

$$\Delta_{\text{КР5}} = 125 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,105}{2,5}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 6 \text{ нг/см}^3.$$

А.8.6 Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР6-М

Аттестованное значение массовой концентрации мельдона $C_{\text{кр6}}$, нг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_{\text{кр6}} = \frac{C_{10} \cdot V_6}{V_2} \quad (\text{A.35})$$

$$C_{\text{кр6}} = \frac{5,0 \cdot 0,5 \cdot 1000}{10} = 250 \text{ нг/см}^3.$$

Расчет погрешности приготовления калибровочного раствора КР6-М $\Delta_{\text{кр6}}$, нг/см³, выполняют по формуле

$$\Delta_{\text{кр6}} = C_{\text{кр6}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta_{\text{V10}}}{C_{\text{V10}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{\text{V6}}}{V_6}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{\text{V2}}}{V_2}\right)^2} \quad (\text{A.36})$$

Погрешность приготовления калибровочного раствора КР6-М равна

$$\Delta_{\text{кр6}} = 250 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,179}{5,0}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{0,5}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{10}\right)^2} = 10 \text{ нг/см}^3.$$

МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды
(Росгидромет)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИДРОХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»

344090, г. Ростов-на-Дону
пр. Стачки, 198
Факс: (863) 232-44-70
Телефон (863) 297-51-63
E-mail: info@gidrohim.com

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики измерений
№ С 02067847.02.RA.RU.311345-2017

Методика измерений массовой концентрации мельдона в моче человека, разработанная федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Субанский государственный университет» 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149, (27 с.), и регламентированная МИ 02067847.02-2017 «Определение мельдона в моче человека. Методика измерений методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тапидным масс-спектрометрическим детектированием».

Аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009.
Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает метрологическими характеристиками, приведенными в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Диапазон измерений, значения характеристик погрешности измерений и ее составляющих при принятой вероятности P=0,95

| Диапазон измерений массовой концентрации мельдона X, мг/дм ³ | Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторности) σ _п , % | Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) σ _в , % | Показатель правильности (графа) систематической погрешности ±δ, % | Показатель точности (границы погрешности) ±δ, % |
|---|---|---|---|---|
| От 100 до 2500 мкг/л | 11 | 15 | 9 | 32 |
| Сж. 250 до 2500 мкг/л | 5 | 7 | 5 | 12 |

Таблица 2 – Диапазон измерений, значения пределов погрешности и воспроизводимости при принятой вероятности $P=0,95$

| Диапазон измерения массовой концентрации мелкодисперсной пыли, мг/дм ³ | Предел повторяемости (Для двух результатов параллельных определений) G_p , мг/дм ³ | Предел воспроизводимости (Значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в лаборатории) G_v , мг/дм ³ |
|---|---|--|
| От 100 до 250 включ. | 31 | 42 |
| Св. 250 до 2500 включ. | 14 | 19 |

При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости, погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности повторяемости, погрешности).

Алгоритм оперативного контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в МИ 02067847.02-2017.

Периодичность оперативного контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируются в Руководстве по качеству лаборатории.

Дата выдачи свидетельства 28.08.2017.

Директор



Главный метролог