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

Утверждаю:

Начальник ГБУЗ «Челябинское
областное бюро судебно-медицинской
экспертизы»,

к.м.н.

Швед Е.Ф.

« »

2016 г.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ТРУПОВ НА НАЛИЧИЕ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ, НАРКОТИЧЕСКИХ, ПСИХОТРОПНЫХ ВЕЩЕСТВ И
ПЕСТИЦИДОВ МЕТОДОМ ГХ-МС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ ДЛЯ
ПОДГОТОВКИ ПРОБ «LAVTOX LPD»

Челябинск
2016

«Методика анализа органов и тканей трупов на наличие лекарственных, наркотических, психотропных веществ и пестицидов методом ГХ-МС с использованием наборов для подготовки проб «LABTOX LPD»// Челябинск, ГБУЗ «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», 2016, 9 с.

АННОТАЦИЯ

Настоящая методика предназначена для подготовки проб внутренних органов и тканей трупов и анализа полученных экстрактов методом ГХ-МС на наличие лекарственных, наркотических, психотропных веществ, а также фосфорорганических веществ и некоторых пестицидов. Для экстракции анализируемых веществ используется технология QuEChERS (“Кэтчерс” в произношении), основанная на извлечении аналитов в органический растворитель и очистке экстрактов с помощью сорбентов для их последующего анализа приборными методами. Настоящая методика позволяет подготовить к анализу методом ГХ-МС органы трупов, подвергнутые гнилостным изменениям за счет определенных добавок к смесям для очистки экстрактов и модификации протокола подготовки проб.

Методика разработана экспертом судебно-химического отделения ГБУЗ ЧОБСМЭ, к.х.н. Мелентьевым А.Б.

Рецензент: Заведующий судебно-химическим отделением Пермского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, к.х.н. Катаев С.С.

Одобрено на заседании методического совета Челябинского областного бюро судебно – медицинской экспертизы, протокол № 5/2016 от «16» августа 2016 г.

1. Назначение и область применения

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

2. Метод измерений

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

3. Средства измерения.

- 3.1. Газовый хроматограф 6890 с автосамплером 7683В и масс-селективным детектором 5975В фирмы Agilent Tehnologies.
- 3.2. Колонка хроматографическая капиллярная HP-5MS 30 м*0,25 мм*0,25 мкм.
- 3.3. Микрошприц хроматографический объемом 10 мкл для автосамплера. Кат. № 5181-1267 (Agilent).
- 3.4. Весы аналитические ВЛ-120С или аналогичные.

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

4. Вспомогательное оборудование

- 4.1. Ультразвуковая ванна Elmasonic S30.
- 4.2. Термоблок или термостат с максимальной температурой 100⁰С.
- 4.3. Центрифуги лабораторные со скоростью вращения 4000 об/мин и роторами для пробирок диаметром 17 мм.
- 4.4. Встряхиватель ELMI S-4 или аналогичный.
- 4.5. Холодильник бытовой с морозильной камерой для хранения проб.
- 4.6. Компрессор воздушный KB-1 или подобный.
- 4.7. Шкаф вытяжной.
- 4.8. Колба мерная 2 кл. точности емкостью 25 мл.

5. Материалы и реактивы.

- 5.1. Наборы LAVTOX LPD фирмы ЛАБТЕХ, содержащие полипропиленовые центрифужные пробирки емкостью 15 мл с солями для экстракции, пробирки со смесью для очистки емкостью 10 мл, в коробке по 25 наборов.
- 5.2. Виалы для автосамплера Кат. № 5183-2030 (Agilent) с крышками.
- 5.3. Ацетонитрил «ч».
- 5.4. Этанол 95 %, ФС 42-3072-94.
- 5.5. Метанол «хч».
- 5.6. Хлористоводородная кислота конц «чда».
- 5.7. Этилацетат обезвоженный «хч».
- 5.8. Трифторуксусный ангидрид фирмы «Sigma – Aldrich».
- 5.9. Гексан «чда».
- 5.10. Ацетон обезвоженный «хч»

- 5.11. Иодметан 99,5% фирмы «Sigma – Aldrich».
- 5.12. Циклизина гидрохлорид, фирмы «ICN Biomedicals».
- 5.13. Этилморфина гидрохлорид ФС 42-2268-84.
- 5.14. Гексобарбитал ФС 42-8198-03.
- 5.15. Фильтр Captiva Econofitr PFFE 25m 0,45mkm, Кат. № 5190-5268 (Agilent).

6. Требования безопасности

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

7. Подготовка к выполнению измерений

- 7.1. *Приготовление стандартных растворов внутренних стандартов:*
Стандартный раствор дионина (этилморфина г/х) с концентрацией 10 г/л

приготавливается растворением порошка дионина 50 мг в 3 мл этанола с добавлением 2 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, подписывается (Этилморфина г/х - 10 г/л, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Стандартный раствор циклизина с концентрацией 1 г/л (в пересчете на основание) готовится растворением 28,5 мг циклизина г/х в 25 мл метанола, подписывается (Циклизин – 1 г/л в MeOH), дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Стандартный раствор гексобарбитала с концентрацией 10 г/л готовится растворением 50 мг гексобарбитала в 5 мл метанола, подписывается (Гексобарбитал – 10 г/л в MeOH, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт). Срок годности стандартных растворов при хранении в холодильнике 1 год. Навески порошков берутся на аналитических весах с точностью до 0,1 мг, растворитель отмеряется цифровой пипеткой или мерной колбой на 25 мл.

7.2. Приготовление рабочего раствора смеси внутренних стандартов:

Рабочий раствор, состоящий из смеси внутренних стандартов с концентрацией 0,1 г/л этилморфина г/х, циклизина, гексобарбитала приготавливается по мере надобности добавлением 0,25 мл стандартного раствора этилморфина г/х (10 г/л), 2,5 мл циклизина (1 г/л), 0,25 мл гексобарбитала (10 г/л) в мерную колбу на 25 мл и заполнением до метки ацетонитрилом. Смесь переливается во флакон из темного стекла и подписывается "Смесь В.С. для метода QuEChERS" и дата приготовления. Рабочий раствор хранится в холодильнике не более 1 месяца.

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

2,0 ± 0,1 г средней пробы печени (или другого органа), взвешенных на технических весах тщательно измельчаются и помещаются в центрифужную пробирку объемом 15 мл из набора LAVTOX LPD (или во флакон емкостью

15 мл). К пробе добавляется 20 мкл смеси внутренних стандартов (циклизина, этилморфина, гексобарбитала по 0,1 г/л) и 5 мл ацетонитрила. К содержимому пробирки добавляется 200 мкл концентрированной соляной кислоты и смесь солей для экстракции из набора LAVTOX LPD. После перемешивания содержимого, пробирка помещается в ультразвуковую ванну на 20 мин. Далее образец центрифугируется при 4000 об/мин в течение 10 мин и верхний (органический) надосадочный слой в количестве 3-3,5 мл экстракта переносится в пробирку со смесью для очистки. Содержимое пробирки тщательно перемешивается и встряхивается в течение 5 мин на встряхивателе, центрифугируется при 4000 об/мин в течение 5 мин. **В случае анализа биологического материала, имеющего признаки гнилостного разложения, рекомендуется выдержать пробу со смесью для очистки не менее 6 часов при комнатной температуре.** При этом обеспечивается дополнительная очистка экстракта от жирных кислот.

1,5 мл ацетонитрильного экстракта переносится во флакон (пробирку), куда добавляется 1 мл гексана и смесь встряхивается в течение 2 мин.

1 мл нижнего (ацетонитрильного) слоя экстракта переносится в автосамплерную виалу, растворитель испаряется в потоке воздуха при 40-50°C досуха. К сухому остатку добавляется по 50 мкл безводного этилацетата и трифторуксусного ангидрида. Виала закрывается крышкой и смесь нагревается в термоблоке в течение 20 мин при 60°C. Избыток реагентов удаляется при 40-50°C в потоке воздуха досуха, к сухому остатку добавляется 200 мкл безводного этилацетата.

Остаток во флаконе после удаления части ацетонитрильного слоя испаряется досуха при 40-50°C в потоке воздуха. Для получения метилированных производных к сухому остатку экстракта, добавляется 500 мкл безводного ацетона, 10-15 мг безводного карбоната калия и 100 мкл йодметана. Смесь нагревается при температуре 60°C в течение 30 мин. Избыток реактивов удаляется в потоке воздуха и проба реконструируется в

400 мкл этилацетата. После 5 мин выдержки органический слой объекта переносится в автосамплерную виалу. **В случае получения мутного раствора, пробы перед переносом в виалу рекомендуется профильтровать через фильтр Captiva PTFE 0,45 мкм.**

9. Условия ГХ-МС анализа экстрактов.

Виалы с дериватизированными экстрактами помещаются в лоток автосамплера. Режимы работы хроматографа и масс-спектрометра: Вводимый объем образца 1 мкл. Ввод пробы без разделения потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1:15 (Split/Splitless). Промывка шприца изопропанолом до и после ввода пробы по 5 раз. Программирование температуры: начальная температура колонки 80°C (выдержка в течение 1,0 мин), подъем температуры со скоростью 40 град/мин до 200°C и дальнейшее увеличение температуры со скоростью 12,5 град/мин до 300°C выдержкой при конечной температуре в течение 6 мин. Газ-носитель гелий, режим постоянного потока 1,4 мл/мин. Температура инжектора 260°C, устройства сопряжения с детектором 280°C. Энергия ионизации 70 eV. Температура источника ионов 230°C, квадруполя 150°C. Напряжение на электронном умножителе на 100 вольт выше «Autotune». При анализе трифторацетилированных экстрактов масс-селективный детектор работает в режиме сканирования ионов от 50 до 650 а.е.м. с задержкой на выход растворителя 3,5 мин. При анализе метилированных экстрактов масс-селективной детектор работает в режиме сканирования ионов от 40 до 450 а.е.м. с задержкой на выход растворителя 3 мин.

10. Обработка хроматограмм экстрактов для поиска пиков токсикантов.

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

Analysis Settings

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

Deconvolution

- ^ Component width – **20**
- ^ Adjacent Peaks subtraction - **One**
- ^ Resolution - **Medium**
- ^ Sensitivity - **Medium**
- ^ Shape Requirement – Low

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

10. Контроль качества результатов при реализации методики в лаборатории.

Внутренний контроль качества полученных результатов осуществляется по надежности идентификации (по рапорту AMDIS или библиотечному рапорту программы Enhanced Data Analysis) пиков внутренних стандартов. В экстракте после трифторацетилирования с вероятностью не менее 60% должны быть идентифицированы циклизин и ТФА производное этилморфина, а в метилированном экстракте циклизин и метиловый эфир гексобарбитала. При неудовлетворительной идентификации хотя бы одного из перечисленных стандартов рекомендуется провести повторный анализ хроматограммы с

использованием других настроек фильтров деконволюции программы AMDIS. Если изменение параметров обработки не привели к удовлетворительной идентификации стандартов, выводы об отсутствии наркотических и психотропных веществ в анализируемых объектах сделать нельзя. При этом, если нет возможности провести анализ другими методами, делается вывод: «В связи с (резкими гнилостными изменениями, недостаточным количеством биоматериала или др.) провести анализ материала от трупа на наличие наркотических и психотропных веществ не представляется возможным». В случае обнаружения пиков потенциального токсиканта и/или его метаболитов при недостаточной достоверности идентификации рекомендуется из остатков экстракта на сорбенте после стадии очистки провести повторный анализ с получением других производных (Ac, PFP или TMS) для подтверждения наличия и количественного определения токсиканта в биологической пробе.

11. Рекомендации по подготовке проб с гнилостными изменениями

При подготовке проб биологических тканей с резкими гнилостными изменениями рекомендуется выдержать пробу со смесью для очистки не менее 6 часов. При этом обеспечивается дополнительная очистка экстракта от жирных кислот. Частично нивелируется проблема анализа экстрактов из органов с гнилостными изменениями фильтрацией экстрактов через фильтр Captiva PTFE 0,45 μm .