

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛОС,
НОГТЕВЫХ СРЕЗОВ, КРОВИ, МОЧИ, ОРГАНОВ И
ТКАНЕЙ ТРУПА НА НАЛИЧИЕ ПСИХОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ, ВКЛЮЧАЯ МЕТАБОЛИТЫ/МАРКЕРЫ
СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМЕТЕТИКОВ МЕТОДОМ
ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С
МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

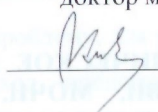
Методические рекомендации

Москва 2019

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)**

«Утверждаю»

Директор ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России,
Главный внештатный специалист
по судебно-медицинской экспертизе
Минздрава России
доктор медицинских наук


А.В. Ковалев
18 июня 2019 г.

**СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛОС, НОГТЕВЫХ
СРЕЗОВ, КРОВИ, МОЧИ, ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ТРУПА НА
НАЛИЧИЕ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВКЛЮЧАЯ
МЕТАБОЛИТЫ/МАРКЕРЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ
КАННАБИМЕТИКОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Методические рекомендации

Москва
2019

УДК:340.67

ББК:58

Авторы:

Савчук С.А. - главный научный сотрудник отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, доктор химических наук;

Григорьев А.М. – эксперт-химик ГБУЗ МО «Бюро СМЭ», доктор химических наук.

СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛОС, НОГТЕВЫХ СРЕЗОВ, КРОВИ, МОЧИ, ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ТРУПА НА НАЛИЧИЕ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВКЛЮЧАЯ МЕТАБОЛИТЫ/МАРКЕРЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИМЕТИКОВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Методические рекомендации предназначены для качественного определения новых и известных психоактивных веществ, включая метаболиты/маркеры ряда синтетических каннабимиметиков в биологических объектах от живых лиц и трупов методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Учитывая быстрое расширение списка целевых соединений, метод может быть в дальнейшем модифицирован.

Рецензенты:

А.К. Буряк - профессор, доктор химических наук, директор ФГБУ «Института физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина» РАН;

А.М. Орлова – кандидат фарм. наук, ведущий научный сотрудник отдела специальных инновационных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России (протокол № 2 от 18 июня 2019 г.).

ISBN: 978-5-6043121-8-6

Введение

В настоящее время перечень психоактивных веществ, присутствующих в незаконном обороте постоянно расширяется [1-20]. Это приводит к необходимости разработки новых методов, основой которых являются библиотеки масс-спектров непрерывно пополняемые, содержащие не только нативные психоактивные вещества, но и их метаболиты/маркеры. Исследование сложных матриц, к которым относят волосы, срезы ногтевых пластин [21-26], ткани и биологические жидкости, измененные гниением, представляет собой сложную аналитическую проблему, для решения которой предложен комплексный методический подход, представленный в этом методическом письме.

Объекты анализа

Объекты анализа: волосы, срезы краев ногтевых пластин от живых лиц и трупов, или сами ногтевые пластины с пальцев рук и ног от трупов, кровь цельная или гемолизированная от живых лиц и трупов, моча, органы и ткани трупа.

Оборудование и материалы

Метод исследования – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

1. Оборудование: газовые хроматографы Agilent 5973, 5975, 5977, Shimadzu GC-MSQP 2010 Ultra, Маэстро α-МС, или оборудование других производителей с аналогичными параметрами.

Колонка: HP-5ms или VF-5ms (Agilent, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм)*.

2. Растворители и реактивы (выбираются в зависимости от способов подготовки проб и дериватизации):

- Кислота соляная (≥ 30%);

- Натрия гидроксид, водный раствор (50 %);

- Аммиак водный (≥ 25%);

- Фосфатный буфер (0.8 М, рН 4.5);

- β-глюкуронидаза (HP-2, Sigma-Aldrich) или подобная;
- Хлороформ;
- Этилацетат;
- N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид, содержащий 1 об.% триметилхлорсилана (BSTFA + 1% TMS);
- Уксусный ангидрид;
- Трифторуксусный ангидрид;
- Пентафторпропионовый ангидрид;
- Пиридин;
- Диметилсульфоксид (осушенный);
- Тетраметиламмония гидроксид, раствор в метаноле (25 об.%);
- Иодометан.

3. Подготовка проб для анализа

Подготовка проб вышеперечисленных биологических объектов требует применения широкого набора методов гидролиза, экстракции и дериватизации. Алгоритмы выбора даны ниже.

3.1. Подготовка проб мочи для анализа

Новые психоактивные вещества, определяемые в моче, имеют разные свойства. Они могут полностью метаболизировать в моче, как синтетические каннабимиметики или каннабис. В этом случае установление факта употребления таких веществ выполняют по наличию характерных метаболитов/маркеров, которые образуют конъюгаты, что требует предварительного гидролиза (кислотного, основного или ферментного). При этом существует вероятность потерь некоторых лабильных целевых веществ. Напротив, некоторые стимуляторы, например α-PVP и его аналоги, устойчивы к гидролизу и их нативные формы извлекаются в широком диапазоне значений pH. Это предопределило выбор методов жидкостной экстракции для выделения наркотических психотропных веществ (НПВ). Для определения метаболитов/маркеров синтетических каннабимиметиков

рекомендуется использовать метод кислотного гидролиза с последующей экстракцией из слабощелочной среды, аналогичный для подготовки проб для совместного определения конъюгированных и свободных форм морфина и других опиатов и их метаболитов. Для определения метаболитов/маркеров синтетических каннабимиметиков также рекомендуется использовать метод щелочного гидролиза с последующей экстракцией из кислой среды, аналогичный методу для подготовки проб для определения конъюгированной формы тетрагидроканнабиноловой кислоты (11 - нор – дельта - 9-карбокситетрагидроканнабиноловой кислоты (THC)). Стимуляторы и ряд других веществ, в том числе лабильных, извлекают перечисленными выше методами без стадии гидролиза. К лабильным веществам, прежде всего, относятся нативные формы каннабимиметиков, в том числе группы карбоксамидов. При кислотном и щелочном гидролизе эти вещества гидролизуются с образованием продуктов идентичных метаболитам/маркерам этих соединений. Однако, нативные формы каннабимиметиков в моче присутствуют в следовых концентрациях, исключая случаи передозировок.

Для подготовки проб мочи для определения веществ группы фентанила (фентанил, 3-метилфентанил, карфентанил) наиболее эффективно использовать методику извлечения из слабощелочной среды смесью органических растворителей метилхлорид, гептан, изорпропанол 7:2:1 с высаливанием без гидролиза.

3.1.1. Для определения метаболитов/маркеров JWH-018, JWH-073, JWH-210, JWH-250, JWH-251, JWH-203, AB-001, RCS-4, AM-694, AM-2233, UR-144**, АКВ-48 их аналогов и метаболитов/маркеров других каннабимиметиков, используют кислотный щелочной или ферментный гидролиз с последующей жидкость/жидкостной или твердофазной экстракцией.

Примечание: Сравнение методик жидкость/жидкостной экстракции (ЖЖЭ) и твердофазной экстракции (ТФЭ) для определения

метаболитов/маркеров синтетических каннабимиметиков и тетрагидроканнабиноловой кислоты показало, что методы ЖЖЭ экстракции позволяют получить более высокую степень извлечения, по сравнению с ТФЭ, при умеренной интенсивности матричных компонентов.

3.1.1.1. Кислотный гидролиз (деконъюгация) с жидкость/жидкостной экстракцией. Аналогичен способу подготовки проб мочи для определения конъюгированных форм опиатов:

- К 3.0 мл образца добавляют 0.3 мл соляной кислоты и нагревают при температуре 90 – 95°C в течение часа.
- Доводят pH раствора до 8-9 водным раствором аммиака.
- Добавляют 0.65-0.70 мл 5М водного раствора NaOH, 300-500 мг бикарбоната натрия, 1 -2 г натрия хлорида и экстрагируют смесью метилхлорид, гептан, изорпропанол 7:2:1.
- Центрифугируют, отделяют слой органической фазы, упаривают его в потоке воздуха или в вакууме при температуре не выше 45°C.
- Сухой остаток дериватизируют добавлением 30 мкл BSTFA + 1% TMS и 70 мкл этилацетата, выдерживают в течение 15 мин при 70°C.
- После охлаждения добавляют в 100-600 мкл этилацетата, в зависимости от чувствительности прибора, которую оценивают по интенсивности пика дифениламина, 1 мкл экстракта вводят в хроматограф.

3.1.1.2. Щелочной гидролиз (деконъюгация) с жидкость/жидкостной экстракцией применяют для выявления метаболитов/маркеров PB-22 и PB-22F, PINACA, FUBINACA и других сходных веществ. Аналогичен способу подготовки проб мочи для определения конъюгированных 11- нор –дельта- 9-карбокситГК в моче.

Для щелочного гидролиза используют 5М водный раствор NaOH (200г/л) или КОН(280г/л). Приготовление 5М NaOH.

К 2.0 г NaOH добавляют дист. воду до объема 10 мл. Приготовление 5М КОН. К 2.8 г КОН добавляют дист. воду до объема 10 мл.

Подготовка пробы:

- К 3 мл мочи добавляют 0.5 мл 5N раствора NaOH, выдерживают при 60°C в течение 20 минут.
- Гидролизат подкисляют до pH 2-3 добавлением 250-350 мкл конц. соляной кислоты.
- Экстрагируют 3 мл смеси гексан-этилацетат 7:1 на орбитальном шейкере 5 мин.
- Центрифугируют 3 мин при 3000 об/мин.
- Отбирают верхний органический слой, упаривают досуха в токе воздуха или вакуумном концентраторе.
- Сухой остаток дериватизируют добавлением 30 мкл BSTFA + 1% TMS и 70 мкл этилацетата, выдерживают в течение 15 мин при 70°C.
- После охлаждения добавляют в 100-600 мкл этилацетата, в зависимости от чувствительности прибора, которую оценивают по интенсивности пика дифениламина, 1 мкл экстракта вводят в хроматограф.

3.1.1.3. Моча, ферментная деконъюгация (для новых и известных психоактивных веществ).

К 2.5 мл образца добавляют 1 мл фосфатного буфера pH 6.5 и 50 мкл β-глюкуронидазы. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют при 37°C в течение 8ч, или при 50°C в течение 3-х ч. Далее выполняют процедуры экстракции из кислой или слабощелочной среды, аналогичные 3.1.1.1. 3.1.1.2., исключая стадии кислотного или щелочного гидролиза.

3.1.1.4. Моча, быстрый скрининг некоторых целевых веществ (α-PVP его аналогов и других веществ, сходных по полярности). Методический подход проведения экстракции в аналитической вialsе предложен Н.А. Крупиной.

- В стандартную вialsу вместимостью 2 мл вносят 1660 мкл мочи и 270 мкл органического растворителя (этилацетат, бутилацетат,

изоамилацетат) или смеси растворителей (гексан-этилацетат 7:1 или метилхлорид, гептан, изорпропанол 7:2:1).

- Виалу закрывают крышкой и встряхивают на вибромиксере 1 мин.
- Если не происходит разделения слоев, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3-х мин.
- Анализуют подвергают органический слой из верхней части виалы. Для этого позиционируют иглу шприца автоинжектора таким образом, чтобы игла была погружена в органический слой и не опускалась ниже 4 - 5 мм от крышки виалы или 23 мм от дна виалы. Объем вводимой пробы 1 или 2 мкл.
- При необходимости дериватизации 200 мкл экстракта переносят в виалу со вставкой вместимостью 250-300 мкл, добавляют 30 мкл BSTFA, закрывают крышкой, выдерживают 15 мин при 80⁰С, 1 мкл дериватизированного экстракта вводят в хроматограф.

3.1.1.5. Моча, определение оксибутирата

- Во флакон «Эппендорф» вместимостью 2.0 мл вносят 200-250 мг NaCl 500 мкл мочи и 1000 мкл ацетонитрила.
- Встряхивают на вибромиксере 1 мин.
- Центрифугируют при 8000-14000 об/мин в течение 3-х минут.
- Органический слой отбирают и упаривают досуха.
- Сухой остаток дериватизируют добавлением 30 мкл BSTFA + 1% TMS и 70 мкл этилацетата, выдерживают в течение 15 мин при 70⁰С. 1 мкл вводят в хроматограф.

3.2. Подготовка проб крови для анализа

3.2.1. Методы жидкость/жидкостной экстракции с предварительным гидролизом. В отличие от мочи, где синтетические каннабимиметики присутствуют в виде метаболитов/маркеров, в крови эти вещества присутствуют преимущественно в нативном виде или в виде

продуктов термической деградации, образовавшихся при курении. Для определения большинства психоактивных веществ можно использовать методы пробоподготовки мочи п.п. **3.1.1.1.** и **3.1.1.2.**, включающие кислотный, щелочной гидролиз и жидкость/жидкостную экстракцию. Перед гидролизом к 1 мл крови добавляют 2 мл дистиллированной воды. При этом возможно разрушение нативных форм каннабимиметиков с образованием метаболитов/маркеров.

В случае анализа цельной крови (кислотная деконъюгация):

- Пробу цельной крови разбавляют дистиллированной водой, к 1 мл цельной крови добавляют 2 мл дистиллированной воды обрабатывают далее согласно 3.1.1.1.
- В качестве альтернативного метода пробу цельной крови центрифугируют при 3000 об/мин.
- К 1 мл полученной сыворотки/плазмы добавляют 2 мл воды и обрабатывают далее согласно 3.1.1.1.
- Сухой остаток силилируют, или анализируют недериватизованный экстракт после добавления к сухому остатку 130-500 мкл ацетонитрила.

Для определения нативных форм лабильных целевых веществ (каннабимиметиков) подготовку проб выполняют согласно п. **3.2.2.** Также для быстрого определения некоторых целевых веществ можно использовать метод п. **3.1.1.4.** Анализуют подвергают пробу крови, разбавленную в три раза. К 1 мл крови добавляют 2 мл дистиллированной воды. Далее анализ проводят согласно п. **3.1.1.4.**

3.2.2. Метод жидкость/жидкостной экстракции в ацетонитрил с высаливанием (для плазмы, сыворотки, цельной крови, в том числе гемолизованной).

- Во флакон «Эппендорф» вместимостью 2.0 мл вносят 300 мг NaCl 800 крови и 800 мкл ацетонитрила.

- Встряхивают на вибротриггере 1 мин.
- Центрифугируют при 8000-14000 об/мин в течение 3-х минут.
- Органический слой отбирают и упаривают досуха, добавляют 150 мкл этилацетата, 1 мкл вводят в хроматограф.
- При необходимости дериватизации к сухому остатку добавляют 30 мкл BSTFA + 1% TMS и 70 мкл этилацетата, выдерживают в течение 15 мин при 70°C, 1 мкл вводят в хроматограф.

Методика подготовки проб крови для анализа методом твердофазной экстракции дана в п.п. 3.3.3.1, 3.3.3.3

3.3. Подготовка органов и тканей для анализа

3.3.1. Подготовка проб крови, а также желчи, гомогенатов органов и тканей методами твердофазной и жидкость/жидкостной экстракции

3.3.1.1 Отбор, гомогенизация, осаждение белковой фракции

- Измельчить 10-50 г печени (почки).
- Поместить в стеклянную пробирку с завинчивающейся крышкой объемом 9.0 мл 2.0 г измельченной ткани печени, почки или 2.0 мл крови, желчи.
- Добавить 6.0 мл 6% трихлоруксусной кислоты (рН 1.0).
- Экстрагировать 10-15 мин на ультразвуковой бане и 5 мин на орбитальном шейкере.
- Центрифугировать при 3000 об/мин в течение 5 мин.
- Надосадочную жидкость перенести в центрифужную пробирку.
- Добавить порциями 0.6 мл 22% раствора карбоната натрия (до рН 6.0), избегая пенообразования. При необходимости корректировать рН с помощью 50% раствора фосфорной кислоты.
- Добавить 30 мкл внутреннего стандарта дифениламина концентрацией 20 мкг/мл.

3.3.1.2. Жидкость/жидкостная экстракция

- В пробирку объемом 10 мл внести 3 г хлорида натрия, твердый буфер на кончике шпателя и 3 мл экстракционной смеси.
- В пробирку внести 3 мл пробы мочи или надосадочной жидкости (кровь, желчь, ткани).
- Экстрагировать 5 мин на орбитальном шейкере
- Центрифугировать при 3000 об/мин 5 мин.
- Отделить органический слой, перенести его в пробирку объемом 10 мл и упарить в вакуумном концентраторе или перенести экстракт алюминиевый колпачок и упарить в токе воздуха при температуре не выше 45°C.
- К упаренному экстракту добавить 150-300 ацетонитрила и анализировать.
- При необходимости дериватизации провести силилирование с BSTFA см. п. 3.1.1.1. и анализировать.

3.3.1.3. Твердофазная экстракция (нейтральные, слабоосновные вещества)

Картриджи для твердофазной экстракции: Agilent Technologies AccuBONDII EVIDEX, 3 мл/200 мг, или Agilent Technologies SampliQ EVIDEX, 3 мл/200 мг или аналогичные по параметрам.

Приготовление реактивов:

- 0.1M K_2HPO_4 (рН 6.0) – 1.74 г фосфата калия двузамещенного безводного растворить в 100 мл деионизованной воды. Установить рН 6.0 с помощью фосфорной кислоты.
- 0.1M натрия ацетат (рН 4.5). 0.82 г растворить в 100 мл деионизованной воды. Установить рН 4.5 с помощью ледяной уксусной кислоты.

Кондиционирование картриджа

- Картридж для твердофазной экстракции Evidex устанавливают в

вакуумный штатив с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум 20 мм.рт.ст. Скорость потока жидкости через картридж не выше 2.5 мл/мин.

- Через картридж пропустить 1.5 мл метанола при полном вакууме для удаления воздуха.
- 3 мл метанола
- 3 мл 0.1M K_2HPO_4 (pH 6.0)

Загрузка пробы:

- К 3 мл пробы мочи или надосадочной жидкости (кровь, желчь, ткани см. ниже) добавить 3 мл 0.1M K_2HPO_4 (pH 6.0) и пропустить через картридж Evidex.

Промывка картриджа:

- 3.0 мл деионизованной воды
- 3.0 мл 0.1N HCl
- Картридж сушить 5 мин при полном вакууме
- 3 мл метанола.
- Картридж сушить 10 мин при полном вакууме.
- Поместить под картридж виалу для экстракта объемом 10 мл.
- Пропустить через картридж 2 мл смеси растворителей дихлорметан/изопропанол/ NH_4OH (78/20/2) без использования вакуума.
- Сушить картридж 36-60 сек под вакуумом, не допуская разбрызгивания элюата.
- Элюат упарить в вакуумном концентраторе или в токе воздуха при температуре не выше 45°C.
- К упаренному экстракту добавить 150-300 ацетонитрила и анализировать.
- При необходимости дериватизации провести силилирование с BSTFA см. п. 3.1.1.1. и анализировать.

3.3.1.4. Твердофазная экстракция (нейтральные, кислые, слабоосновные вещества)

- Кондиционирование картриджа (поток 3-5 мл/мин).

- 3 мл метанола.
- 3 мл 0,1 M фосфатного буфера, pH 6.0.
- Нанесение образца
- Пропускают пробу через картридж без вакуума (поток 1-2 капли в секунду).
- Промывка водой.
- Пропускают 3 мл деионизованной воды (поток 3-5 мл/мин).
- Подкисление.
- Пропускают 2 мл 1M уксусной кислоты (поток 3-5 мл/мин).
- Высушивают картридж в течение 5 мин при полном вакууме.
- Промывка гексаном.
- Пропускают через колонку 3 мл гексана (поток 3-5 мл/мин).
- Сбор кислой/нейтральной фракции.
- Пропускают через колонку 1,7 мл смеси гексан:этилацетат (1:1) (поток 1 мл/мин).
- Промывка метанолом.
- Пропускают 3 мл метанола (поток 3-5 мл/мин).
- Высушивают картридж в течение 5 мин при полном вакууме.
- Сбор основной фракции.
- Пропускают через колонки 1,7 мл смеси дихлорметан: пропанол-2 : концентрированный раствор аммиака (78:20:2) (поток 1 мл/мин).
- Собрать основную фракцию.
- Концентрирование фракций.
- Собранные кислые и основные элюенты упаривают досуха, добавляют 150 мкл ацетонитрила и анализируют.
- При необходимости дериватизации к экстракту добавляют 30 мкл BSTFA, выдерживают 15 мин при 80°C и анализируют.

3.3.2. Методика подготовки проб органов и тканей трупа с

использованием биологических жидкостей – продуктов лизиса. Выбор объекта исследования предложен А.Л. Печниковым. Метод пригоден для определения нативных форм синтетических каннабимиметиков, стимуляторов, анестетиков, а также морфина, кодеина, бензодиазепинов, фенобарбитала, метадона с метаболитами, веществ амфетаминового ряда, кокаина с метаболитами, фентанила и его аналогов.

3.3.2.1. Сбор пробы биологической жидкости с продуктами лизиса.

Отбирают ткани печени, почки, мышцы, мозга (10-50 г). Образцы замораживают при -20°C , выдерживают в течение ночи, после чего размораживают при комнатной температуре. При этом образуется жидкость, являющаяся смесью межклеточной и внутриклеточной жидкости со следами капиллярной крови.

Примечание. Если собранной жидкости недостаточно для анализа, перед замораживанием объектов можно ввести шприцем небольшие объемы деионизированной воды в анализируемые объекты и повторно заморозить/разморозить образцы.

3.3.2.2. Жидкость/жидкостная экстракция 1 (общая методика)

Образующуюся в результате лизиса межклеточную и внутриклеточную жидкость со следами капиллярной крови (8-15 мл) собирают и готовят для анализа методом жидкость/жидкостной экстракции согласно п.п. 3.2.1., 3.2.2.

3.3.2.3. Жидкость/жидкостная экстракция 2, для определения анестетиков и веществ группы фентанилов [1, 2] в биологической жидкости – продуктах лизиса.

- Собирают образующуюся в результате лизиса межклеточную и внутриклеточную жидкость со следами капиллярной крови.

- В пластиковый флакон помещают 8-10 мл собранной биологической жидкости.

- Добавляют 20 мл деионизированной воды, 2 мл насыщенного р-ра щелочи, выдерживают 20 мин при комнатной температуре.

- Гидролизат экстрагируют 20 мл гексана или гептана.
- Центрифугируют при 3000 об/мин. Если не удастся разделить слои, предварительно к пробам добавляют по каплям 100-200 мкл этанола 95%.
- Органический слой отбирают и упаривают досуха, добавляют 150 мкл этилацетата или ацетонитрила, 1 мкл вводят в хроматограф.
- При необходимости дериватизации к финальному экстракту добавляют 30 мкл BSTFA + 1% TMS, выдерживают в течение 15 мин при 70°C , 1 мкл вводят в хроматограф.

3.3.2.4. Жидкость/жидкостная экстракция 3, для определения анестетиков и веществ группы фентанила в гомогенатах тканей.

- К 10 мл гомогената печени добавляют 20 мл деионизированной воды, 2 мл насыщенного р-ра щелочи, выдерживают 20 мин при комнатной температуре.

- Гидролизат экстрагируют 20 мл гексана или гептана.
- Центрифугируют при 3000 об/мин. Если не удастся разделить слои, предварительно к пробам добавляют по каплям 100-200 мкл этанола 95%.
- Органический слой отбирают и упаривают досуха, при этом образуется плохо упариваемый органический вязкий осадок липидных фракций оранжевого цвета непригодный для анализа.

- Целевые компоненты, прежде всего вещества группы фентанила, извлекают в кислый водный раствор. Для этого жировой слой переносят в вialу вместимостью 4 мл, добавляют 2 мл 0.1N HCl и экстрагируют на вибромиксере 1 мин.

- Водный слой отделяют, устанавливают pH 7-9 и экстрагируют 2 мл гексана или гептана.

- Органический слой отбирают и упаривают досуха, добавляют 150 мкл этилацетата или ацетонитрила, 1 мкл вводят в хроматограф.

- При необходимости дериватизации к финальному экстракту добавляют 30 мкл BSTFA + 1% TMS, выдерживают в течение 15 мин при

70°C, 1 мкл вводят в хроматограф.

3.3.2.5. Твердофазная экстракция биологической жидкости, содержащей продукты лизиса

Образующуюся в результате лизиса межклеточную и внутриклеточную жидкость со следами капиллярной крови (8-15 мл) собирают и готовят для анализа методом твердофазной экстракции согласно п.п. 3.3.3.3 или 3.3.3.4.

Примечание. Жидкость содержащая продукты лизиса является предпочтительным объектом для использования метода ТФЭ, тогда как при использовании этого метода для подготовки проб гомогенатов органов наблюдали снижение эффективности экстракции из-за загрязнения фильтров картриджей по сравнению с результатами исследования биологической жидкости, содержащей продукты лизиса, полученной от того же объекта.

3.4. Подготовка волос и срезов ногтевых пластин для анализа

Волосы и ногтевые пластины, являясь придатками кожи и имеют сходное строение. Поверхностные слои обоих видов структур (кутикула) - чешуйчатые, рыхлые. Это отмирающие кератиновые слои, которые постоянно обновляются за счёт роста внутреннего кератинового слоя (кортекса). Необходимые элементы для обновления приходят с кровотоком. Мелкие капиллярные кровеносные сосуды питают луковицу волоса и соответствующие структуры ногтевых пластин. Интересующие нас ксенобиотики, включая стимуляторы, наркотические и лекарственные вещества (преимущественно психоактивные) приходят также с кровотоком, "встраиваются" в кератиновые матрицы и фиксируются в ней. В рыхлых приповерхностных слоях эта фиксация слабеет и целевые вещества покидают поверхность волос и ногтевых пластин легко, тогда как из глубины их извлечь трудно, вследствие хорошей фиксации.

Психоактивные вещества могли попасть на поверхность волос или ногтевых пластин извне случайно. Например, если кто-то рядом курил каннабис или спайсы, целевые вещества в виде аэрозолей могли попасть на

поверхность волос или ногтевых пластин человека, который не употреблял подобные вещества. Поэтому, перед анализом отмывают поверхность волос и ногтевых срезов от внешних загрязнений. Следует отметить, что целевые вещества, находящиеся в кутикуле также могут быть извлечены из приповерхностных слоев и смыты вместе с поверхностными загрязнениями. Для того, чтобы дифференцировать поверхностные загрязнения и объемные содержания целевых веществ, присутствующих в приповерхностных и внутренних слоях волоса или ногтевой пластины целесообразно делать не менее пяти последовательных смывов, и полученные смывы подвергать анализу. С каждым смывом интенсивность целевого вещества должна уменьшаться и в последнем смыве быть незначительной. После чего можно применять методы активного извлечения, например кислый или щелочной гидролиз или извлечение в метанол с обработкой ультразвуком. При получении положительного результата, по интенсивности пиков целевых компонентов существенно (в 20-50 раз) превышающим интенсивности пиков этих же веществ в смывах, надежно судить о наличии в организме таких веществ. При получении отрицательного результата после проведения кислого или щелочного гидролиза или извлечения в метанол с обработкой ультразвуком, исследуемый образец признается отрицательным, а вещества определенные в смывах являются поверхностными загрязнениями.

Одним из критериев достоверности является снижение интенсивностей пиков определяемых веществ от смыва к смыву. При обнаружении хаотично меняющихся интенсивностей в последовательных смывах и в финальных экстрактах, необходимо проверить прибор на наличие «химической памяти» по определяемым веществам.

Примечание 1: Получить более специфичные и достоверные данные по наличию психоактивных веществ на поверхности и в объеме придатков кожи можно при комплексном исследовании волос и срезов краев ногтевых пластин, отобранных как с пальцев рук, так и с пальцев ног испытуемых.

Особенный интерес представляют ногтевые срезы, отобранные с пальцев ног, поскольку они в наименьшей степени загрязнены целевыми компонентами.

Примечание 2: кератиновые матрицы волос и ногтевых пластин имеют разную плотность и скорость роста. Поэтому содержания идентифицируемых веществ в волосах, срезах ногтевых пластин с пальцев рук и ног, отобранных у одного лица, могут различаться

Примечание 3: при подготовке проб волосы измельчают до состояния пудры. Размер частиц может варьировать от долей миллиметра до миллиметра. При измельчении поверхность исследуемой пробы увеличивается в 500-1000 раз. Это облегчает экстракцию определяемых компонентов, но усложняет дифференциацию поверхностных загрязнений и объемных содержаний, так как частицы измельченной пробы контактируют с экстрагентом при проведении предварительных смывов не только поверхностными, но и объемными слоями. Для минимизации этого эффекта целесообразно проводить пять последовательных смывов с поверхности волос без их измельчения, а измельчать волосы и ногтевые срезы после проведения смывов. Ногтевые срезы или пластины измельчают на более крупные фрагменты.

Примечание 4: Волосы и ногтевые срезы помещают в пластиковый флакон с коническим дном вместимостью 50 мл. Все стадии подготовки пробы: получение пяти смывов, измельчение ножницами, гидролиз с последующей экстракцией или обработку ультразвуком в метаноле выполняют в этом же флаконе, что снижает вероятность лабораторного загрязнения пробы. Стеклоянные флаконы не рекомендуется использовать для ультразвуковой обработки, так как есть вероятность их разрушения под действием ультразвука.

3.4.1. Отбор образцов волос и ногтевых срезов (пластин)

- Для анализа требуется от 20 до 300 мг волос и/или ногтевых срезов (пластин).

- У трупа для анализа отбирают ногтевые пластины целиком.
- Волосы отбирают с волосистой части головы или с других частей тела. Скорость накопления целевых аналитов зависит от скорости роста волос (1 см в месяц для волос волосистой части головы).

3.4.2. Получение и анализ метанольных смывов

- В пластиковые флаконы с коническим дном помещают 20-300 мг неизмельченных волос, ногтевых срезов/пластин. Волосы, ногтевые срезы/пластины с пальцев рук и ног анализируют отдельно (не объединяют объекты).
- Во флакон добавляют от 1.5 до 3.0 мл метанола, так чтобы органический слой покрывал анализируемый объект.
- Встряхивают не интенсивно 1 мин.
- Отбирают органический слой и переносят его в алюминиевый колпачок для упаривания.
- Во флакон вносят следующую порцию метанола и повторяют процедуру. Всего получают пять последовательных смывов.
- Полученные смывы упаривают досуха, добавляют 150 мкл ацетонитрила и анализируют.
- При необходимости дериватизации к экстракту добавляют 50 мкл BSTFA, выдерживают 15 мин при 80⁰С и анализируют.

3.4.3. Измельчение волос и ногтевых срезов

После получения пяти смывов волосы и ногтевые срезы помещают в пластиковый флакон с коническим дном вместимостью 50 мл и измельчают остроконечными хирургическими ножницами внутри флакона.

Измельченные волосы и ногтевые срезы подвергают кислому или щелочному гидролизу или экстрагируют метанолом при обработке ультразвуком.

3.4.4. Ферментный гидролиз (общие наркотики)

Были выбраны условия рН, при которых ферменты наиболее активны. Для β-глюкуронидазы 1/10 - рН 6,5, для пепсина – рН 2,2, для трипсина – рН 8,0, для кератиназы – рН 6,5.

- Добавляли 1 мл водного раствора β-глюкуронидазы 1/10 или пепсина, трипсина, кератиназы.
- Были выбраны условия рН, при которых ферменты наиболее активны. Для β-глюкуронидазы 1/10 - рН 6,5, для пепсина – рН 2,2, для трипсина – рН 8,0, для кератиназы – рН 6,5.
- Выдерживали при 40° С в течение 12 часов.
- Обрабатывали 1 час на ультразвуковой бане.
- Центрифугировали в течение 5 минут 14000 об/мин.
- Водную фазу отделяли и обрабатывали методом твердофазной экстракции согласно п.п. 3.3.3.3 или 3.3.3.4.

3.4.5. Кислотный гидролиз (общие наркотики). К навеске волос добавляли 1 мл 5М HCl. Выдерживали 45 мин при 90° С.

3.4.6. Щелочной гидролиз (каннабис, спайсы). К навеске волос добавляли 1 мл 2М КОН. Выдерживали 40 мин при 50° С с обработкой ультразвуком.

Примечание: каннабимиметики, присутствующие в волосах в нативном виде, разрушаются при щелочном гидролизе с образованием продуктов, тождественных метаболитам/маркерам этих веществ

3.4.7. Жидкостная экстракция (для щелочных гидролизатов, спайсы, каннабис)

- В пробирку объемом 10 мл вносят 3 г хлорида натрия, твердый буфер на кончике шпателя 40-50 мг и 3 мл экстракционной смеси.
- В пробирку с экстракционной смесью вносят 1 мл гидролизата

волос.

- Добавляют 30 мкл внутреннего стандарта дифениламина (раствор «Б» концентрацией 20 мкг/мл), концентрация в пробе 200 нг/мл.
- Экстрагируют 10 мин на орбитальном шейкере
- Центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин.
- Отделяют органический слой, переносят его в пробирку объемом 4 мл или в металлический колпачок TOX-LAB для упаривания и упаривают в токе горячего воздуха. К сухому остатку добавляют 70 мкл этилацетата, встряхивают на вибромиксере 2-3 сек, 1 мкл пробы вводят в хроматограф.

3.4.8. Твердофазная экстракция (для кислых гидролизатов, общие наркотики). Выполняют 3.3.1.2.

Примечание: для продуктов гидролиза метаболитов/маркеров синтетических каннабимиметиков можно использовать метод твердофазной экстракции п.п. 3.3.1.3. с возможностью сбора кислой фракции. При этом эффективность извлечения будет ниже, чем при использовании жидкость/жидкостной экстракции.

Примечание: методы пробоподготовки п.п. 3.1., 3.2., 3.3 пригодны для ВЭЖХ-МС/МС анализа. В этом случае дериватизацию не проводят. К сухому остатку после упаривания добавляют 400 мкл ацетонитрила или последовательно 70 мкл ацетонитрила и 330 мкл деионизированной воды, 5 мкл вводят в жидкостный хроматограф.

3.5. Методы дериватизации

Преимущественным способом является триметилсилилирование.

3.5.1. Триметилсилилирование. К 150 мкл экстракта в 150 мкл этилацетата или ацетонитрила добавляют в 30 мкл смеси BSTFA + 1% TMS и этилацетата (1:1) в течение 30 мин при 55-60°С. После охлаждения смесь вводят в хроматограф.

3.5.2. Ацетилирование. Выполняют в 100 мкл смеси уксусного ангидрида и пиридина (1:1) в течение 30 мин при 70°C. Далее раствор упаривают досуха при температуре не выше 45°C (возможно использование вакуумного концентратора), остаток растворяют в 50 мкл этилацетата и вводят в хроматограф.

3.5.3. Метилирование. Этот способ пригоден в основном, для обнаружения дезалкилированных метаболитов. Сухой остаток, полученный после экстракции деконъюгированных образцов растворяют в смеси 200 мкл осушенного диметилсульфоксида и 5 мкл раствора тетраметиламмония гидроксида в метаноле (25 об.%). Смесь перемешивают в течение 2 мин, добавляют 20 мкл иодометана и снова перемешивают в течение 10 мин. К смеси добавляют 2 раствора аммиака (0.1 М) и экстрагируют 3 мл этилацетата. Органический мл водного слой промывают 2 мл раствора аммиака и упаривают досуха. Остаток растворяют 50 мкл этилацетата и вводят в хроматограф.

3.5.4. Получение пентафторпропионильных производных. К сухому остатку добавляют 50 мкл пентафторпропионового ангидрида (PFPA) и 25 мкл пентафторпропанола (PFPOH), выдерживают 40⁰мин при 90⁰С, упарить остаток реагента растворить в 100 мкл этилацетата. 1 мкл в хроматограф.

4. Рекомендованные программы обработки результатов ГХ-МС анализа и библиотеки масс-спектров и ассоциированные с ними условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования

4.1. Рекомендованные программы обработки результатов ГХ-МС анализа. При проведении в рамках ХТИ и СХА исследований биологических объектов методом ГХМС рекомендуется применять следующие программы,

предназначенные для поиска масс-спектров и автоматизированной идентификации соединений при газовой хромато-масс-спектрометрии:

1. AMDIS - Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System. Автоматизированная система масс-спектральной деконволюции хроматограмм и идентификации выделенных масс-спектров. AMDIS предоставляется как часть полного пакета базы данных MS NIST, так и демонстрационной базы данных NIST. Кроме того, AMDIS можно загрузить как отдельную программу.

2. NIST MS Search Program – Система поиска по масс-спектрам. Предоставляется как часть полного пакета базы данных MS NIST, так и демонстрационной базы данных NIST.

4.2. Рекомендованные библиотеки масс-спектров. Для решения задач в рамках ХТИ и СХА исследований биологических объектов методом ГХМС, как правило, недостаточно использования одной библиотеки.

При проведении нецелевых скрининговых исследований для исключения и идентификации широкого круга веществ рекомендуется последовательное или параллельное применение нескольких библиотек самых последних версий (выпусков), содержащих наиболее актуальную информацию о спектрах новых психоактивных веществ (NPS), их метаболитов и дериватов.

При проведении целевого анализа допускается использование отдельных специализированных библиотек более старых версий (выпусков), только при условии наличия в них спектров и характеристик целевых определяемых веществ.

Для получения всесторонне обоснованных и достоверных результатов рекомендуется применение следующих библиотек масс-спектров электронной ионизации:

1. NIST – коммерческая библиотека общего назначения Национального института стандартов США (NIST). Версия 2017 года (NIST 17) содержит четыре масс-спектральных библиотеки и метод библиотеки индексов удерживания (RI)/GC. Есть две библиотеки EI: mainlib (267376 спектров) и replib (39246 спектров).

Обновление – раз в 3 года.

Страна происхождения: США

Преимущества: Большое число спектров. Высокое качество библиотеки.

Ограничения: Неспециализированная библиотека. Отсутствие спектров многих метаболитов и дериватов веществ, имеющих токсикологическое значение и многих новых синтетических психоактивных веществ. Длинный цикл обновления.

2. The Mass Spectral Library of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, 5th Edition (MPW5e) – коммерческая масс-спектральная библиотека лекарств, ядов, пестицидов, загрязнителей и их метаболитов, 5-е издание, 2017 год. Содержит 10430 масс-спектров и индексов удерживания ГХ, а также 7800 их метаболитов.

Обновление – раз в 3 года.

Страна происхождения: ФРГ

Преимущества: Большое число спектров веществ, имеющих токсикологическое значение, ориентированность на ХТИ и СХА. Наличие спектров метаболитов и дериватов. Высокое качество библиотеки.

Ограничения: Отсутствие спектров многих новых синтетических психоактивных веществ, длинный цикл обновления.

3. Designer Drugs (DD2018) — коммерческая масс-спектральная библиотека «дизайнерских наркотиков», фармацевтических препаратов,

боевых отравляющих веществ, и связанных с ними веществ. Включает 26459 масс-спектров 20381 химического соединения с подробной информацией и химической структурой для каждой записи.

Обновление – 1 раз в год.

Страна происхождения: ФРГ

Преимущества: Большое число спектров новых психоактивных веществ, ориентированность на ХТИ и СХА. Наличие спектров метаболитов и дериватов. Высокое качество библиотеки.

Ограничения: Длинный цикл обновления.

4. EKBDRUGS (MS LIBRARY EKBDRUGS) – коммерческая специализированная экспертная электронная библиотека масс-спектров, предназначенная для идентификации наркотических средств и психотропных веществ методами ГХМС. Содержит масс-спектры электронной ионизации низкого разрешения контролируемых веществ, их дериватов и сопутствующих соединений, информацию об основных синонимах, химических наименованиях, структурных формулах соединений и их газохроматографических индексах удерживания. База данных обновляется по мере сбора и накопления новых данных.

Страна происхождения: РФ

Автор: Шевырин Вадим Анатольевич vadim.shevyrin@gmail.ru

Преимущества: Большое число спектров контролируемых в РФ веществ. Высокое качество библиотеки. Производится в России – национальный продукт. Регулярное обновление и пополнение.

Ограничения: Ориентированность на исследование вещественных доказательств.

5. ИПС «АИПСИН АнтиНаркотики» – предназначена для информационного обеспечения деятельности в сфере контроля за оборотом

наркотических веществ и прекурсоров. Позволяет решать задачи о статусе государственного контроля обнаруженных соединений и отнесении их к производным. Содержащаяся информация охватывает почти весь доступный на сегодняшний день объем экспертных знаний по наркотическим и психотропным веществам. ИПС содержит закрытую библиотеку масс-спектров «AIPSIN MS Database» (23182 спектра) и собственную спектральную поисковую систему. Возможно подключение внешних библиотек.

Библиотека пополняется и обновляется не менее 6 раз в год.

Лицензия на 1 год на 1 рабочее место - 225000,00 р.

Страна происхождения: Республика Беларусь, Минск

Руководитель проекта: Юрченко Руслан Александрович
yurchenko@aipsin.com

Преимущества: Большое число спектров контролируемых в РФ веществ. Высокое качество библиотеки. Регулярное обновление и пополнение. Решение задач о статусе контроля и отнесении к производным. Обширная база знаний (методики, условия анализа, публикации и т.п.).

Ограничения: Закрытость спектральной библиотеки. Ориентированность на исследование вещественных доказательств, а не биологических объектов. Отсутствие спектров многих метаболитов и их дериватов.

6. SUDMED MASS SPECTRA (SUDMED MS) – некоммерческая специализированная экспертная библиотека масс-спектров (ЭИ), предназначенная в первую очередь для предварительной и подтверждающей идентификации новых синтетических психоактивных веществ и их метаболитов (синтетических каннабимиметиков, дизайнерских наркотиков) методами ГХМС в биологических жидкостях и тканях в виде различных дериватов. Библиотека создана в октябре 2013 года профессиональным

экспертным сообществом РФ. Является электронным приложением к информационным письмам ФГБУ ННЦ НАРКОЛОГИИ и методическим письмам ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России. Последняя сборка содержит 2260 спектров.

Библиотека пополняется и верифицируется профессиональным экспертным сообществом 4-6 раз в год по мере сбора и накопления новых спектров.

Распространяется свободно через сайт sudmed-ms.ru

Страна происхождения: РФ

Руководитель проекта: Печников Александр Леонидович,
petchikov@gmail.ru

Преимущества: Наибольшее число спектров метаболитов новых психоактивных веществ (NPS) и их дериватов. Оперативность обновления. Ориентированность на специфику ХТИ и СХА. Производится Российским профессиональным сообществом - национальный продукт. Доступность.

Ограничения: Ориентированность на специфику ХТИ и СХА, ориентированность на метаболиты новых психоактивных веществ (NPS).

7. Cann_Metab - некоммерческая специализированная экспертная библиотека масс-спектров (ЭИ), предназначенная в первую очередь для предварительной и подтверждающей идентификации новых синтетических психоактивных веществ и их метаболитов.

8. Библиотека Cann_Metab включает:

- Библиотеку в формате NIST (Cann_Metab), включая рабочие структуры и линейные индексы удерживания;

- Библиотеки в формате MSP (Cm_hp5.msp или Cm_vf5.msp) с фиксированными временами удерживания (RTL) для колонок HP-5ms и VF-5ms (Agilent, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) соответственно;

- Файл пересчета фиксированных времен удерживания (cseries_RTL.cal) для AMDIS.

Страна происхождения: РФ

Автор: Григорьев Андрей Михайлович, chrzond4250@yandex.ru

Преимущества: В библиотеки включены только практически значимые аналиты. Включает индексы удерживания целевых веществ и рекомендованные параметры хроматографического и масс-спектрометрического детектирования. Ориентированность на специфику ХТИ и СХА. Доступность.

Ограничения: Структурные формулы, приведенные в библиотеке NIST (Cann_Metab), не являются точными. Локализация приобретенных функциональных групп (гидроксильных и карбонильных), а также двойных связей в пределах остатка, как правило, неизвестна. Исключение составляют только карбоксилированные (-M HOOC-) и деметилированные метаболиты.

Pub_sav50 - некоммерческая специализированная экспертная библиотека масс-спектров (ЭИ) в формате MSP (с фиксированными временами удерживания (RTL) для колонки HP-5ms (Agilent, 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) и двумя методами хроматографического разделения: SCREEN и DOAS с разным температурным градиентом для определения среднелетучих и труднолетучих веществ. Методы хроматографического разделения и алгоритмы идентификации, аффилированные с библиотекой, запатентованы [1-3] и опубликованы в периодической научной печати и монографии [4]. По библиотеке и методам анализа имеется более 50 актов внедрения за период с 1999 по 2019 г.г.

Автор: Савчук Сергей Александрович, serg-savchuk@yandex.ru

1. Савчук С.А. Система удаленной идентификации и распознавания объектов сложного состава Патент на изобретение (19)RU(11) 77474

(13) (51) МПК G06K 17/00 (2006.01). Дата начала срока действия патента 15.07.2008. Опубликовано 20.10.2008 Бюл. №29.

2. Савчук С.А., Чибисова М.В., Апполонова С.А. Анохин Л.А., Способ выявления неизвестных веществ в биологических жидкостях пациентов, принимавших наркотические или психоактивные вещества Патент на изобретение RU 2419788. Опубликовано 18.05.2011 г.
3. Савчук С.А., Апполонова С.А. Способ идентификации наркотических и психоактивных веществ в биологических жидкостях Патент на изобретение RU 2390771 C1 МПК G01N 30/86 (2006 01) приоритет от 05февраля 2009 г. Опубликовано 27.05.2010 бюлл. 15.
4. С.А Савчук, Г.М. Григорьев. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике. М. 2013, URSS. «Либроком» 224 с.

4.3. Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, ассоциированные с библиотеками масс-спектров

Могут быть использованы методы хроматографического разделения, позволяющие выполнить идентификацию веществ как по абсолютным временам, так и по индексам удерживания.

4.3.1. Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, ассоциированные с библиотеками масс-спектров Cann_Metab

Условия хроматографирования:

- температура инжектора 270°C;
- температура интерфейса 280°C;
- температурные программы работы колонок:

Режим 1 (основной)

Oven Ramp	°/min	Next °C	Hold, min
Initial		50	0.5
Ramp 1	99	100	1
Ramp 2	35	300	18

Режим 2 (дополнительный, см. Примечания)

Oven Ramp	°/min	Next °C	Hold, min
Initial		50	0.5
Ramp 1	99	100	1
Ramp 2	60	320	13

- режим испарителя – без сброса пробы (splitless);
- режим колонки (газ-носитель гелий) – постоянство давления (constant pressure);
- объем вводимой пробы – 0.2 мкл. Возможно введение больших объемов, однако, это приводит к сокращению службы колонки.

Процедуру фиксации времен удерживания выполняют по триметилсилильному или ацетатному деривату холестерина – матричному соединению мочи – при температурной программе колонки «Режим 1» (см. ниже). Удерживание дериватов:

- для колонки HP-5ms
холестерина ацетат - 13.13 мин
холестерина триметилсиликат - 12.00 мин
- для колонки VF-5ms
холестерина ацетат - 14.35 мин
холестерина триметилсиликат - 13.05 мин.

Примерное начальное давление в инжекторе 21-23 psi.

Качественное определение метаболитов. Автоматизированное обнаружение выполняют с помощью программы AMDIS в режиме использования индексов удерживания (Use Retention Index Data) с файлом пересчета cseries_RTL.cal и выбранной поисковой библиотекой (Cm_hp5.msp и Cm_vf5.msp для колонок HP-5ms и VF-5ms, соответственно) при рекомендуемых параметрах:

- Minimum match factor – 40;
- RI window 20 + 0;
- Match factor penalties (Level – Weak, Maximum penalty – 20; No RI in library - 10);
- Low и High m/z – Auto;
- Threshold – Off;
- Component width – 12;
- Adjacent peak subtraction – One;
- Resolution – Medium;
- Sensitivity – Very High;
- Shape requirements – Low;
- Column bleed – 207.

Применение режимов для элюирования метаболитов при постоянной скорости потока газа-носителя

Режим 1	Режим 2	
JWH-018	JWH-250	AM-2233
JWH-073	JWH-251	UR-144
JWH-210	JWH-203	AKB-48
	AB-001	PB-22
	AM-694	PB-22F
	RCS-4	

Линейные индексы удерживания (библиотека Comp_Metab, формат NIST измерены в двух температурных режимах (Режим 1 и Режим 2) при постоянной скорости потока носителя (constant flow, 1 мл/мин). Это объясняется значительным различием удерживания аналитов и необходимостью поддержания достаточной эффективной чувствительности. Температурная зависимость индекса удерживания положительная.

Настройки масс-спектрометра:

- режим – сканирование (SCAN);
- диапазон m/z 29-650;
- порог детектирования – 0.

4.3.2. Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, ассоциированные с библиотеками масс-спектров Pub_sav50

Условия ГХ-МС анализа. Хроматографический шприц перед анализом и после анализа промывают двумя растворителями (толуолом, ацетоном или хлороформом, ацетонитрилом), по 5 раз каждым растворителем.

Метод 1 “SCREEN”. Температурная программа термостата колонок: начальная температура 100°C с изотермической выдержкой в течение 1 мин, с последующим температурным градиентом 35°C/мин до 300°C с изотермической выдержкой 15 мин. Анализ в режиме постоянного давления (Constant Pressure). В качестве газа носителя используют гелий марки «А». Температура испарителя хроматографа составляет 270°C, аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 280°C. Пробу вводят в режиме с делением потока (splitless).

Времена удерживания определяемых соединений получают по методу фиксации времен удерживания (Retention Time Locking, RTL). Настройку

метода RTL осуществляют по дифениламину, меняя давление в узле ввода таким образом, чтобы время удерживания дифениламина в выбранных условиях хроматографирования составило 5.54±0.03 мин.

Метод 2 “DOAS”. Температурная программа термостата колонок: начальная температура 50°C с изотермической выдержкой в течение 0.5 мин, с последующим температурным градиентом 99°C/мин до 100°C с изотермической выдержкой 1 мин, с последующим температурным градиентом 15°C/мин до 280°C с изотермической выдержкой 30 мин. Анализ в режиме постоянного давления (Constant Pressure). В качестве газа носителя используют гелий марки «А». Температура испарителя хроматографа составляет 270°C, аналитического интерфейса (хроматограф/масс-спектрометр) 280°C. Пробу вводят в режиме с делением потока (splitless). Настройку метода RTL осуществляют по дифениламину, меняя давление в узле ввода таким образом, чтобы время удерживания дифениламина в выбранных условиях хроматографирования составило 9.26±0.03 мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования. Для многокомпонентной идентификации веществ по процедуре 1 используют режим сканирования по полному ионному току (SCAN), при количественном анализе также используют режим сканирования по полному ионному току, а в случае необходимости определения с пределом обнаружения ниже 50 нг/мл используют режим мониторинга по выбранным ионам (SIM).

Анализ в режиме сканирования по полному ионному току. “Задержка на растворитель” время включения катодов и анализатора после прохождения по колонке фронта растворителя – через 3 мин после ввода пробы.

- Температура источника ионов 230°C
- Температура анализатора 150°C
- Диапазон масс m/z 41–650 а.е.м.
- Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической

настройке по перфторбутиламину в режиме ATUNE.

Анализ в режиме мониторинга по выбранным ионам (SIM).

Детектирование в режиме SIM выполняют в случаях, когда концентрация определяемых веществ ниже 25-50 нг/мл, при этом идентификационная значимость полученных результатов будет существенно ниже, поскольку полный спектр не фиксируется. В качестве характеристичных ионов могут быть выбраны: базовый ион масс-спектра, молекулярный ион определяемого соединения или фрагментный ион наибольшей интенсивности. Выбранные ионы должны быть специфичны для определяемого соединения и не содержаться в фоне. Наиболее специфичный (целевой, target) ион используют для количественного определения, два других иона используют для подтверждения правильности идентификации.

Анализ в режиме регистрации "SIM-SPECTRUM".

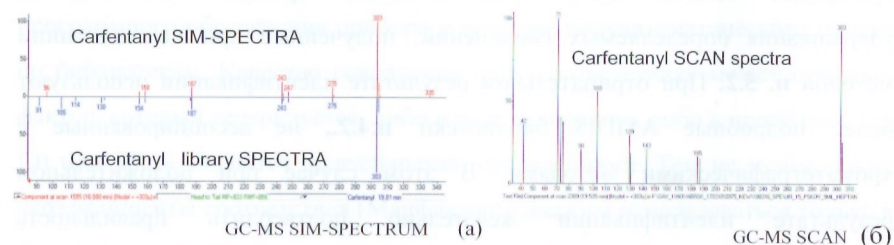
Детектирование в режиме SIM существенные ограничения, поскольку не позволяет регистрировать полный спектр вещества, пригодный для библиотечной идентификации. В этом случае заключение о наличии определяемого вещества в пробе выполняют по совпадению (со стандартными) времени удерживания и соотношения площадей детектируемых трех фрагментных ионов. Однако, во многих случаях для подтверждения наличия вещества в пробе необходим именно полный спектр, который невозможно получить при детектировании малых концентраций. Для решения этой проблемы используют регистрацию в режиме "SIM-SPECTRUM", что позволяет обеспечить сканирование полного спектра целевого вещества с чувствительностью близкой к чувствительности детектирования в режиме мониторинга выбранных ионов (SIM). Для этого создают SIM метод, в который вносят не только интенсивные фрагменты масс-спектра, но и минорные, а также изотопные ионы, составляющие масс-спектр вещества. Современные версии масс-спектрометрических детекторов позволяют регистрировать до 50 значений m/z в одном сегменте без потери

чувствительности детектирования, что достаточно для регистрации полного масс-спектра, который складывается из ионов, выбранных для мониторинга в режиме SIM.

Подобный подход наиболее эффективен для надежной идентификации малых концентраций веществ, имеющих неспецифичные масс-спектры с одним интенсивным ионом. К подобным веществам относится карфентанил, имеющий в масс-спектре только один интенсивный ион m/z 303.

Пример сравнения масс-спектров карфентанила, регистрируемых в экстракте мочи в режиме SIM-SPECTRUM и SCAN приведены на рис. 1а и 1в, соответственно.

Рисунок 1.



На рис. 1 видно, что масс-спектр, полученный в режиме полного сканирования не пригоден для библиотечной идентификации, тогда как масс-спектр, полученный при анализе того же экстракта на том же приборе в режиме SIM-SPECTRUM пригоден для идентификации, совпадение библиотечного и идентифицируемого спектров составило 83%.

Таблица 1. Метод SIM-SPECTRUM для определения карфентанила, 3-метилфентанила и фентанила в одном сегменте

SIM	303	304	305	335	275	247	243	187	154	158	276	244	105	0.00	0.00
SIM	259	260	261	230	216	203	215	202	172	159	160	145	146	257	110
SIM	245	189	188	132	131	130	118	96	91	93	77	79	0.00	0.00	0.00

Примечания к таблице 1.

Метод: SCREEN, время удерживания дифениламина 5.54 мин.

m/z 303⁺ базовый ион для карфентанила. Время удерживания карфентанила 10.64 мин.

m/z 259⁺ базовый ион для 3-метилфентанила. Время удерживания изомеров 3-метилфентанила: 9.69 min (iso 1), 9.98 min (iso 2)

m/z 245⁺ базовый ион для фентанила. Время удерживания фентанила 10.64 мин. 9.58min

5. Рекомендации по масс-спектрометрической идентификации целевых веществ

5.1. Для автоматической идентификации в первую очередь применяют AMDIS библиотеки, имеющие времена или индексы удерживания определяемых соединений, полученные при использовании методов п. 5.2. При отрицательном результате идентификации используют более подробные AMDIS библиотеки п.4.2., не ассоциированные с хроматографическими методами. В этом случае при положительном результате идентификации желательно подтвердить правильность идентификации наличием метаболитов исследуемого вещества и анализом биологической пробы, содержащей идентифицируемое вещество или анализом стандартного образца.

5.2. Алгоритм идентификации. В первую очередь применяют AMDIS библиотеки, для получения чистых спектров и результатов идентификации в автоматическом режиме. При этом фиксируют совпадение времен удерживания контролируемых веществ, полученных в стандартных условиях RTL п. 5.2.1. При этом значение net (совпадение библиотечного и идентифицируемого спектра) должно быть не хуже 75, 85, и более 90% при значениях rigity (процент целевого компонента в общем ионном токе, включающим фон) 1.5-3.0, 10-15, 35-80 и выше, соответственно. Т.е. более интенсивный пик дает более выраженный масс-спектр, в большей степени

совпадающий с библиотечным. При отсутствии времен или индексов удерживания возможны ошибки идентификации. Важным моментом идентификации является проверка совпадения профиля минорных и изотопных ионов, а также наличие молекулярного иона (если присутствует в библиотечном спектре). В спектрах невысокой интенсивности должно совпадать не менее 2/3 минорных ионов. В спектрах высокой интенсивности совпадение, которое оценивают визуально, должно быть полным.

5.3. Оценка результатов автоматизированного поиска при оценке результатов автоматизированного поиска по библиотекам рекомендуется учитывать, в том числе, принципы, изложенные в SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines – 2006 (п. 8.2.10): «В рутинной практике интерпретация спектров полного сканирования масс ГХ/МС-ЕІ выполняется с помощью программного обеспечения прибора в качестве полуавтоматического поиска по библиотекам. Качество совпадения или «соответствия» может отражать фактор, который генерируется, либо в виде отношения, либо в процентах, где 1,0 или 100% являются «идеальными» совпадениями. Тем не менее, такие «коэффициенты соответствия (Мачфактор)» должны использоваться только в качестве ориентиров и не являются достаточно надежными для использования в качестве окончательного фактора идентификации. Окончательный анализ «совпадения библиотек» должен выполнять токсиколог с большим опытом интерпретации масс-спектров; опыт и критическое суждение необходимы. Интерпретация, как минимум, должна основываться на следующих принципах: чтобы совпадение считалось «положительным», все основные и диагностические ионы, присутствующие в известном (эталонном) спектре, должны присутствовать в «неизвестном». Иногда ионы, которые находятся в контрольных спектрах, могут отсутствовать в «неизвестном» из-за низкой общей интенсивности масс-спектра. Если дополнительные «ионы» присутствуют в «неизвестном», хорошей практикой является попытка определить, являются ли

«дополнительные» ионы коэлюирующим веществом или «фоном», таким как фон колонки или масло диффузионного насоса. Исследование восстановленных ионных хроматограмм подозреваемого коэлюирующего вещества относительно основных ионов из контрольного спектра поможет определить это».

5.4. Особенности идентификации каннабимиметиков.

Синтетические каннабимиметики подвержены очень быстрому и почти полному метаболизму. Содержание их метаболитов максимально в ранних (первых) образцах мочи, отобранных в течение 2-5 часов после приема. Далее концентрация метаболитов быстро снижается (примерно в 10-20 раз для второго отбора мочи через 4-7 часов после приема). Время уверенного обнаружения метаболитов в моче определяется принятой дозой и видом каннабимиметика и составляет примерно 1-3 сут. после приема. Обнаружение метаболитов в сыворотке крови возможно, по-видимому, в течение 5-8 часов после приема.

Поскольку синтетические каннабимиметики обладают различным психофизиологическим действием, то их дозировка в курительных смесях также различается. Это ведет и к вариациям в содержании метаболитов в моче. Поэтому достоверность обнаружения ряда соединений (в первую очередь, метаболитов JWH-210 и AM-694) обычно невысока. В этом случае рекомендуется пользоваться Режимом 2 и возможно, увеличивать объем вводимой пробы.

6. Последовательность выполнения измерений, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов

Последовательность выполнения измерений по процедурам 1, 2, 3 на хроматографе с масс-селективным детектором при анализе экстрактов биологических проб (мочи):

1. **Контроль фона прибора.** Перед началом работы анализ растворителя (этилацетата) по методу SCREEN для контроля фона прибора по

определяемым веществам.

2. **Положительный контроль.** Анализ контрольной мочи (QC) содержащей известные введенные содержания определяемых веществ на уровне 100 нг/мл по методу DOAS.
3. **Отрицательный контроль.** Анализ контрольной мочи (BLANK) не содержащей определяемых веществ по методу DOAS.
4. **Контроль фона прибора между пробами.** Между пробами выполняют анализ растворителя (этилацетата) по методу SCREEN для контроля фона прибора по определяемым веществам.

Список литературы

1. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. / T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov. Forensic Sci. Int. - 2010.- 200; 141-147.
2. Chromatography–Mass Spectrometry Studies on the Metabolism of Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073, Psychoactive Components of Smoking Mixtures / Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Moskaleva N., Dzhurko J., Ershov M., Nosyrev A., Vedenin A., Izotov B., Zabirowa I., Rozhanets V. // Journal of Chromatography B. -2011.- 879; 1126-1136.
3. Установление факта приема синтетического каннабиноида JWH-018 хромато-масс-спектрометрическими методами / Григорьев А.М., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Веденин А.Н., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. Журн. аналит. химии. -2012.- 67; 995-1004.
4. Gas and liquid chromatography–mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures / Grigoryev A., Savchuk S., Melnik A., Simonov A., Rozhanets V. //Journal of Chromatography B. 2011.- 879; 2519-2526.

5. 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 Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. // Drug Testing and Analysis 2012.- DOI 10.1002/dta.1336.

6. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography/mass spectrometry / Kavanagh P., Grigoryev A., Melnik A., Simonov A. Journal of Analytical Toxicology.- 2012.- 36; 303-311.

7. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry / Grigoryev A., Kavanagh P., Melnik A. Drug Testing and Analysis. 2011. - DOI: 10.1002/dta.350.

8. UR-144 in products sold via the Internet: Identification of related compounds and characterization of pyrolysis products. / Kavanagh P., Grigoryev A., Savchuk S., Mikhura I., Formanovsky A. Drug Testing and Analysis. 2013.- DOI: 10.1002/dta.1456.

9. Обнаружение психоактивного компонента курительных смесей CP47,497 (C8) в моче методом хромато-масс-спектрометрии / Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Божко Е.С. Сорбционно-хроматографические процессы. 2012,- Т.12, -№1;97-104.

10. Синтетические каннабиноиды в растительных смесях «Spice». Идентификация метаболитов JWH-018 как маркеров употребления в биологических жидкостях крыс и человека / Изотов Б.Н., Савчук С.А., Григорьев А.М., Мельник А.А., Носырев А.Е., Джурко Ю.А., Забирова И.Г., Суркова Л.А., Листвина В.П., Самойлик Л.В., Рожанец В.В. //Наркология.- 2011.- 2; 73-83.

11. Хромато-масс-спектрометрическая идентификация метаболитов синтетического каннабимиметика JWH-250 в биологических жидкостях человека и крыс / Григорьев А.М., Мельник А.А., Савчук С.А., Симонов А.Б.,

Изотов Б.Н., Носырев А.Е., Рожанец В.В. //Наркология.- 2012.-Т.11,-№6(126); 75-86.

12. Обнаружение метаболитов синтетических каннабимиметиков в биологических объектах. / Григорьев А.М., Савчук С.А., Джурко Ю.А., Мельник А.А., Симонов А.Б., Рожанец В.В. // В сб. "Актуальные вопросы судебно-химических и химико-токсикологических исследований", Материалы межрегиональной научно-практической конференции. Екатеринбург, 2011 г. С. 42-49.

13. Установление маркеров приема и характеристики основных метаболитов "синтетических каннабиноидов" JWH-018, JWH-073, JWH-250 и CP-47,497 C8 хромато-масс-спектрометрическими методами. / Григорьев А.М., Веденин А.Н., Савчук С.А., Мельник А.А., Ершов М.Б., Джурко Ю.А., Симонов А.Е., Носырев А.Е., Изотов Б.Н., Рожанец В.В. / В сб. "Современные вопросы судебно-медицинской науки и практики". Материалы научно-практической конференции, посвященной 85-летию образования судебно-медицинской службы Свердловской области и 75-летию кафедры судебной медицины Уральской государственной медицинской академии. Екатеринбург, 2010. С. 229-239.

14. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике / Савчук С.А., Григорьев А.М. М.: URSS, 2013, 224 с.

15. Shevyrin V., Melkozerov V., Nevero A., Eltsov O., Shafran Yu. Analytical characterization of some synthetic cannabinoids, derivatives of indole-3-carboxylic acid // Forensic Sci. Int. – 2013.–Vol. 232. – P. 1-10.

16. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. 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 a-PVT and an

opioid receptor agonist AH-7921 identified in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 223–240.

17. Uchiyama N., Matsuda S., Wakana D., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. New cannabimimetic indazole derivatives, N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1H-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and N-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products // *Forensic Toxicol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 93–100.

18. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация маркеров каннабимиметиков PB-22 и PB-22F в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.34.– №4. – С. 116 – 122.

19. Катаев С.С., Зеленина Н.Б., Дворская О.Н. Идентификация метаболитов каннабимиметика AB-PINACA в моче методом ГХ-МС // *Бутлеровские сообщения.* – 2013. – Т.35.– №9. – С. 131 – 138.

20. Савчук С.А., Никитина Н.М., Зулаева А.С., Несмеянова Н.И., Константинова С.Д. Применение методов ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС для определения наркотических веществ в волосах // *Наркология.* – 2012. – №10. – С. 72-79.

21. Шевырин В.А., Мелкозеров В.П., Моржерин Ю.Ю. Идентификация и аналитические характеристики двух новых синтетических каннабиноидов - производных индазола // *Бутлеровские сообщения.* – 2012. – Т.30. – №4. – С.93-98.

22. Савчук С.А., Гофенберг М.А., Никитина Н.М., Надеждин А.В., Тетенова Т.Ю. Определение маркеров синтетических каннабимиметиков PB-PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС. // *Наркология.* – 2013. – 11; 60-66.

23. Гизетдинова Л. А., Мингазов А. А., Нугманова Р. Р., Дернова О. А., Пиляева А. Р., Савчук С. А. Хромато-масс-спектрометрическое определение нового наркотического средства метоксетамина и синтетических

каннабимиметиков PB22, PB22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA, FUB-PB-22 в биологических жидкостях и образцах волос в Набережночелнинском наркологическом диспансере. // *Наркология.* 2014.- №3. С. 66—73 .

24. Савчук С.А., Никитина Н.М., Бондарь И.В., Надеждин А.В., Тетенова Е.Ю., Ковинька М.А., Богинская Д.Д. Оптимизация методов пробоподготовки волос для анализа наркотических веществ методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. // *Наркология.* 2014.- № 1; 97-98.

25. Скробкова К.А., Савчук С.А. Хромато-масс-спектрометрическое исследование краев ногтевых пластин в лаборатории Курганского областного наркологического диспансера. // *Наркология.* 2014. Т. 13. № 11 (155) С. 42-53.

26. Савчук С.А., Скробкова К.А., Никитина Н.М., Тумурова Л.В., Самышкина Н.В., Надеждин А.В., Тетенова Е.Ю. Дифференциация поверхностных загрязнений и объемных содержаний психоактивных веществ в волосах и срезах краев ногтевых пластин. // *Наркология.* – 2015. Т. 14. № 3 (159) С.72-82.

ВВЕДЕНИЕ

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О КОМПЬЮТЕРНОЙ ТЕХНИКЕ

2. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

3. ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КОМПЬЮТЕРНОЙ СИСТЕМЫ

4. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

5. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

6. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

7. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

8. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

9. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

10. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

11. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

12. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

13. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

14. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

15. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

16. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

17. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

18. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

19. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

20. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

21. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

22. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

23. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

24. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

25. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ТЕРМИНЫ

Подписано в печать 20.09.2019. Формат 60×90/16.
 Бумага белая матовая. Печать офсетная (цифровая). Усл. печ. л. 2,75.
 Тираж 200 экз. Заказ № 170708.
 Отпечатано с готовых файлов ИП Дудкиным В.А.,
 614064, г. Пермь, ул. Усольская, 15.