

Скрининг наркотических и сильнодействующих веществ в образцах крови и мочи при судебно-токсикологическом исследовании на рабочем месте методом «сухих пятен» с использованием автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS

Stefan Gaugler^{1*}, Maha K. Al-Mazroua², Sahar Y. Issa², Jana Rykl³, Matthias Grill⁴, Asem Qanair⁵, Vicente L. Cebolla⁶

- 1 *CAMAG, Sonnenmattstrasse 11, 4132 Muttenz, Switzerland*
- 2 *The Regional Poison Control Center, Dammam, MOH, Saudi Arabia*
- 3 *Shimadzu Schweiz GmbH, Römerstrasse 3, 4153 Reinach, Switzerland*
- 4 *Lipomed, Fabrikmattenweg 4, 4144 Arlesheim, Switzerland*
- 5 *Analytica One, 50848 Al-Hidd, Kingdom of Bahrain*
- 6 *CSIC, Instituto de Carboquímica, Miguel Luesma Castán 4., 50018 Zaragoza, Spain*

*Контактное лицо: CAMAG, Sonnenmattstrasse 11, 4132 Muttenz, Switzerland.
Phone: +41 61 4673435; Fax: +41 61 4610702; Email: stefan.gaugler@camag.com

Резюме

Введение. Создание экономичных и экспрессных методик для анализа биологических жидкостей на наличие наркотических веществ является актуальным вопросом судебно-медицинской экспертизы. Использование комбинации современных методов и автоматизация хода анализа может помочь решить данную задачу.

Цель. Разработка экспресс методики идентификации и количественного определения 28 наиболее распространенных наркотических веществ и методики общего скрининга широкого спектра наркотических веществ в образцах «сухих пятен крови» и «сухих пятен мочи» с помощью автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS. Перенос разработанной методики в условия другой лаборатории с возможностью ее дальнейшего использования в рутинном анализе.

Методы. Для скрининга наркотических и сильнодействующих веществ использовали образцы крови и мочи, нанесенные на DBS карточки методом «сухих пятен». Анализ проводили с использованием автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS, состоящей из экстракционной системы «DBS-MS 500», «CAMAG» и жидкостного хроматографа с тандемным масс-спектрометрическим детектором «LC-MS 8040»/«LC-MS 8060», «Shimadzu». В ходе анализа DBS-карточки помещали в автоматизированную экстракционную систему «DBS-MS 500», процесс работы которой включал: проверку и считывание штрих-кода карточки с помощью системы распознавания; нанесение внутренних стандартов методом распыления; и непосредственно экстракцию. Далее экстракт автоматически инжестировался в аналитическую колонку жидкостного хроматографа с тандемным масс-спектрометром. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительной регистрации с электроспреей ионизацией (ESI). При детекции целевых молекул использовали режим мониторинга мультиреакций (MRM). Для общего скрининга наркотических веществ использовали базу данных судебной токсикологии («Forensic Toxicology Database», «Shimadzu»).

Результаты. С использованием автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS были разработаны методика экспресс анализа 28 наиболее часто встречающихся наркотических веществ и общая методика скрининга для более 1250 других наркотических веществ. Предложенные методики дают достоверные результаты для всех проанализированных наркотических веществ при их соответствующих пороговых концентрациях, обеспечивает хорошую прецизионность ($\pm 15\%$ и $\pm 20\%$ на уровне, соответствующем пределу количественного определения (LOQ)) и линейную зависимость в диапазоне концентраций 5-1000 нг/мл. Длительность анализа одного образца экспресс-методикой составила 5 мин, а

для методики общего скрининга с использованием базы данных судебной токсикологии – 20 мин.

Выводы. Применение полностью автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS для анализа образцов биологических жидкостей, нанесенных на DBS-карточки методом «сухих пятен», позволило уменьшить затраты на транспортировку образцов, исключить трудоемкую и длительную процедуру пробоподготовки, обеспечить воспроизводимые результаты и надлежащее документирование процесса. Методика экспресс анализа и методика общего скрининга наркотических и сильнодействующих веществ были перенесены в лабораторию токсикологического центра для рутинного анализа. Достоверность полученных результатов подтверждена с помощью общеизвестных методик.

Ключевые слова: наркотические и сильнодействующие вещества, скрининг наркотических веществ, метод «сухих пятен крови», метод «сухих пятен мочи», автоматизация.

ВВЕДЕНИЕ

Психоактивные вещества оказывают специфическое действие на ЦНС, искажая восприятие и сознание, поведенческие функции, память и мыслительные процессы человека. Различают контролируемые вещества медицинского (например, производные фенотиазина, бензодиазепа, барбитуровой кислоты) и немедицинского (например, опиаты, каннабис, галлюциногены, кокаин и др.) потребления [2, 3].

Создание экономичных экспресс-методик для анализа биологических жидкостей на наличие наркотических веществ является актуальным вопросом судебно-медицинской экспертизы, поскольку стандартное судебно-токсикологическое исследование является трудоемким процессом, производящимся в срок до 1 мес. Особенно важна экспресс-диагностика при решении следующих задач: анализ персонала на алкоголь и наркотики на рабочем месте для специальностей, где требуется ежедневная или периодическая проверка (workplace drug testing); анализ образцов, отобранных у водителей дорожной полицией (roadside testing); для дифференциальной диагностики острой наркотической интоксикации и абстинентного синдрома в рамках контроля участников программ реабилитации; анализ трупного материала на наличие наркотических веществ [1].

Однако, создание системы экспресс-диагностики наркотических веществ значительно усложняется рядом факторов, таких как: низкая концентрация наркотиков в биологических жидкостях, наличие конъюгированных форм, недостаточная специфичность и чувствительность колориметрических реакций, а также трудоемкость стандартных методов, используемых при проведении судебно-токсикологической экспертизы.

В настоящее время, решение актуальных задач судмедэкспертизы возможно путем анализа биологических жидкостей современным методом отбора проб «сухих пятен» в

комбинации с автоматизированной пробоподготовкой и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрической детекцией.

Классический метод DBS.

Метод «сухих пятен», (dried blood spot, DBS), известный также как анализ крови методом «сухой капли»/«сухих пятен крови» был предложен в 1963 г. американскими учеными Р. Гутри и А. Суси для определения фенилкетонурии у новорожденных [8, 9]. Это простой способ забора, транспортировки и хранения крови. Преимущество метода «сухих пятен» по сравнению с традиционными способами забора крови и плазмы обусловлено использованием значительно меньших объемов образцов, упрощением их транспортировки и хранения [4-7].

В то же время, перед проведением анализа образец крови должен быть проэкстрагирован с DBS-карточки. Классический метод «сухих пятен крови» имел ряд недостатков, включающих трудоемкую пробоподготовку (длительный процесс экстракции многочисленных DBS-карточек, многоэтапность экстракции) и низкую чувствительность метода, связанную с очень малыми объемами образца, используемыми для нанесения на DBS-карточки.

Современный метод DBS и его преимущества.

На сегодняшний день, автоматизация анализа метода «сухих пятен» совместно с современным оборудованием для хроматомасс-спектрометрии обеспечивает специфичность и воспроизводимость результатов. В автоматической экстракционной системе DBS после забора пробы информация по каждому образцу обезличивается путем присвоения ему уникального штрих-кода, который в конце анализа объединяется с полученными результатами в базе данных. Методом «сухих пятен» возможен анализ не только образцов крови, но также и других матриц, например, образцов мочи (dried urine spot, DUS), материнского молока и др.

В настоящее время автоматизированный метод «сухих пятен» широко используется для проведения скрининга заболеваний новорожденных в лабораториях всего мира [10], а также находит новые биомедицинские области применения, такие как терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) [11-13], фармако-токсикокинетические [14, 15], доклинические, клинические и судебно-токсикологические исследования.

Известны научные работы по определению некоторых наркотических веществ с помощью метода «сухих пятен» [16-20], однако систематические работы по разработке системы экспресс-анализа и общих методик скрининга наркотических веществ с автоматизацией хода анализа метода «сухих пятен» ранее не проводились.

Целью данного исследования была разработка экспресс методики определения 28 наиболее распространенных наркотических веществ и методики общего скрининга широкого спектра наркотических веществ в образцах «сухих пятен крови» и «сухих пятен мочи» с помощью автоматизированной системы DBS-LC-MS/MS, а также внедрение разработанных методик в рутинный анализ наркотических веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и стандартные образцы.

Вода и метанол для градиентной жидкостной хроматографии, 2-пропанол и ацетонитрил, муравьиная кислота («Carl Roth», Германия). Аммония формиат LC-MS («Sigma Aldrich», США). Стандартные образцы («Lipomed», Швейцария): кодеин, 6-моноацетилморфин (6-МAM), 3,4-метилendioксиметамфетамин, амфетамин, метамфетамин, N-метилдиэтаноламин, 4,4'-метилنديанилин, героин, кокаин, морфин, 7-аминоклоназепам, хлорфенамин, клозапин, бромазепам, мидазолам, клоназепам, клобазам, оксазепам, алпразолам, хлорпромазин, нордiazепам, diaзепам, 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота, 4'-метил-AM-2201, 5"-фтор-JWH-122, Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота А (THCA-A), Δ^9 -тетрагидроканнабинол, каннабидиол. Дейтерированные стандартные вещества алпразолам-D5 и кокаин-D3 («Lipomed», Швейцария).

Карточки DBS «Ahlstrom Munktell», «AUTOCOLLECT™» для нанесения образцов были предоставлены «SAMAG» (г. Мютенц, Швейцария). Образцы свежей цельной крови были получены из Центра переливания крови (г. Базель, Швейцария) и из Регионального токсикологического центра (г. Даммам, Саудовская Аравия). Вакуумные пробирки ЭДТА и приборы для взятия крови были предоставлены университетским госпиталем г. Базель (Швейцария).

Инструментальный анализ

Автоматизированный анализ DBS-LC-MS/MS образцов крови и мочи на DBS карточках выполняли на экстракционной системе «DBS-MS 500» («SAMAG», Швейцария) и жидкостном хроматографе с tandemным масс-спектрометрическим детектором «LC-MS 8040»/ «LC-MS 8060» («Shimadzu», Япония). Экстракционная система «DBS-MS 500» использовалась как автосамплер модульной ВЭЖХ системы.

Принцип работы экстракционной системы «DBS-MS 500»

После установки DBS-карточек в экстракционную систему «DBS-MS 500» автоматизированная пробоподготовка включала в себя несколько последовательных этапов:

- проверку и считывание штрих-кода карточки с помощью фотокамеры, и системы распознавания;
- нанесение внутренних стандартов на DBS-карточки до экстракции методом распыления;
- экстракцию;
- мониторинг эффективности экстракции и её оценку.

Раствор для экстрагирования образцов крови/мочи: метанол : вода (70:30, об.). Емкость с раствором для экстрагирования подсоединяли к экстракционному порту «DBS-MS 500».

Раствор для промывки системы: 0,1 % раствор муравьиной кислоты в смеси метанол : ацетонитрил : 2-пропанол : вода (25:25:25:25, об.). Емкость с раствором для промывки системы подсоединяли к промывочной бутылке.

Емкость с *растворами внутренних стандартов* алпрозолам-D5 и кокаин-D3 подключали к порту внутреннего стандарта (порт 1).

Стандартные растворы для калибровки 1 (с основными свойствами) и *2* (с кислотными свойствами) подсоединяли к портам 2 и 3 соответственно. Порт внутреннего стандарта (порт 4) и порт для промывки наполняли метанолом. Подготовка системы включала подачу метанола через порт 4 (10 циклов) и далее через порт 1 (2 цикла).

Перед анализом экстракционную головку очищали в ультразвуковой бане в течение 10 мин при 40°C. Раствор для экстракции подавался в течение 5 циклов, раствор для промывки подавался в течение 1 минуты (данный процесс осуществляется автоматически и проводится по умолчанию).

Для проверки наличия пятна крови на карточке и позиционирования экстракционной головки в центре каждого пятна, до и после экстрагирования каждая DBS карточка фотографировалась с помощью встроенной фотокамеры экстракционной системы «DBS-MS 500».

С помощью программного обеспечения «Chronos» («CAMAG», Швейцария) автоматически проводилась отбраковка ненадлежащих образцов (высушенные пятна крови отбраковывались при несоответствии по форме, диаметру и площади). DBS-карточки, которые не соответствовали заданным параметрам, были исключены из анализа.

20 мкл раствора внутреннего стандарта автоматически наносились однородным слоем на каждое пятно DBS-карточки методом распыления. После пятно высушивалось в течение 20 с и экстрагировалось 22 мкл смеси метанол : вода (70:30 об.) со скоростью потока 50 мкл/мин.

После завершения экстракции образца с DBS-карточки в системе осуществлялась промывка выходного порта с использованием раствора для промывки (20 с) и раствора для экстракции (20 с), с последующей промывкой входного порта раствором для экстракции (5 с) [15].

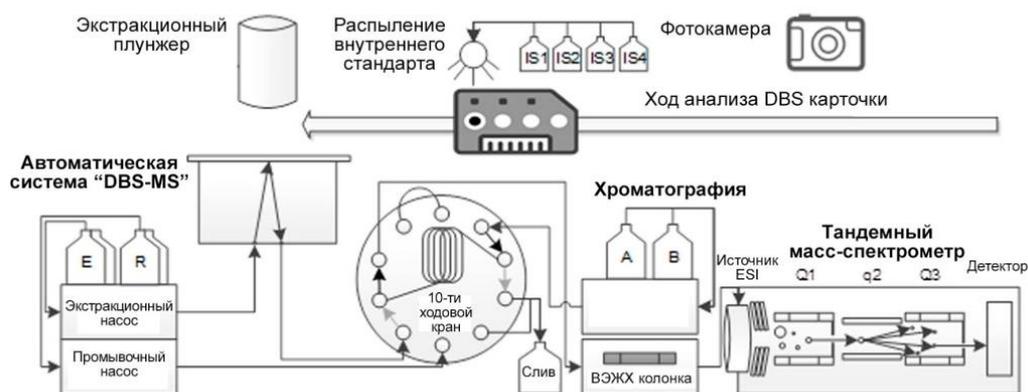


Рис. 1 Автоматизированный ход анализа с использованием экстракционной системы «DBS-MS 500»

Принцип работы LC-MS/MS

ВЭЖХ система состояла из системного контроллера (СВМ-20А), насоса «Nexera X2», дегазатора («DGU-20ASR»), предколоночного (inline) фильтра «KrudKatcher Ultra» («Phenomenex», США). При ВЭЖХ-МС/МС анализе сканирование положительных ионов проводили в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM), метод ионизации – электроспрей (ESI). Обработка данных выполнялась с помощью программного обеспечения «Labsolution», «Shimadzu» (г. Киото, Япония).

Методика экспресс анализа была разработана для 28 наркотических веществ, которые наиболее часто встречаются при анализе (по данным Регионального токсикологического центра г. Даммам). Перечень наркотических веществ приведен в табл. 1. Методика общего скрининга наркотических веществ была разработана с использованием базы данных судебной токсикологии («Forensic Toxicology Database», «Shimadzu»), включающей данные о более чем 1250 наркотических и психотропных веществах [21].

Условия хроматографирования

Методика экспресс анализа для 28 наркотических веществ.

Аналитическая колонка «Shim-pack GIST» C18 («GL Science», Япония):

- размер: 2,1×50 мм, размер частиц: 2 мкм;

- время хроматографирования – 5 мин,
- скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин,
- температура – 50 °С,

Подвижная фаза:

- подвижная фаза А: раствор, содержащий 10 ммоль/л формиата аммония и 0,1 % муравьиной кислоты в воде;
- подвижная фаза В: раствор, содержащий 10 ммоль/л формиата аммония и 0,1 % муравьиной кислоты в метаноле.
- ступенчатый градиент:

Время, мин	Подвижная фаза А (%, об/об)	Подвижная фаза В (%, об/об)
0,0-2,0	55	45
2,0-2,5	55→10	45→90
2,5-3,5	10	90
3,5-5,0	55	45

Методика общего скрининга была разработана в соответствии с протоколом «Shimadzu» [21], который включает оптимизированные параметры анализа LC-MS/MS и библиотеку данных, используемых при разработке скрининг методик и методик количественного определения. Анализ проводили с использованием аналитической колонки «Kinetex ХВ-С18» («Phenomenex», США): размер: 2,1×100 мм, размер частиц: 2,6 мкм.

Для каждого исследуемого соединения регистрировали не менее пяти MRM-переходов. Для количественного определения использовался наиболее характерный переход. Все полученные сигналы переходов использовали для идентификации соединений.

Общие настройки масс-спектрометра:

- газ-распылитель 2 л/мин (N₂);
- нагреваемый газ: 10 л/мин (N₂);
- газ-осушитель: 10 л/мин;
- режим сканирования положительных ионов MRM;
- метод ионизации – электроспрей;
- источник температуры 300°С;
- программное обеспечение «Labsolution».

Подробные настройки MS приведены в таблице 1.

Таблица 1

Основные ионы m/z исследуемых наркотических веществ (режим MRM)

Название	Dwell, [мс]	Pre	Quant	Q1	Q2	Q3	Q4	CE, [V]
Кодеин	20	300.15	152.10	215.15	165.15	128.10	153.15	-15
6-моноацетилморфин (6-МAM)	5	328.15	165.10	211.15	152.10	193.10	181.15	-16
3,4-метилendioксиметамфетамин (MDMA)	5	194.10	105.10	163.10	135.05	77.05	133.05	-23
Амфетамин	5	136.10	91.10	119.15	65.10	39.10	51.10	-16
Метамфетамин	5	150.15	91.10	119.15	65.10	39.10	51.10	-26
N-метилдиэтаноламин (MDEA)	5	208.15	163.10	105.10	135.05	133.05	77.05	-14
4,4'-метилendioанилин (MDA)	5	180.00	77.10	105.10	135.00	133.10		-21
Героин	20	370.15	165.05	268.10	328.10	211.05	152.10	-19
Кокаин-D3	5	307.15	85.05					-20
Кокаин	2.5	304.15	182.15	82.05	77.05	105.05	150.15	-20
Морфин	20	286.15	152.10	201.10	165.10	128.05	153.10	-14
7-аминоклоназепам	5	286.05	121.10	222.10	250.05	195.10	77.00	-20
Хлорфенамин	5	275.15	230.10	167.10	166.15	139.10	201.10	-20
Клозапин	5	327.15	270.10	192.10	227.05	164.10	296.10	-20
Бромазепам	5	316.00	182.15	209.10	181.10	208.15	288.00	-21
Мидазолам	5	326.10	291.10	223.10	244.00	249.05	209.05	-22
Клоназепам	5	316.05	270.05	214.05	241.15	151.10	207.10	-22
Клобазам	5	301.05	259.05	224.10	223.10	153.05	105.10	-21
Оксазепам	5	287.05	241.00	104.05	77.00	231.00	269.00	-19
Алпразолам-D5 (внутренний стандарт)	5	314.10	286.00					-30
Алпразолам	2.5	309.10	281.05	205.10	274.10	151.10	241.05	-21
Хлорпромазин	5	319.10	86.10	58.05	246.00	214.05	239.05	-22
Нордиазепам	5	271.05	140.05	208.10	165.05	243.05	104.10	-18
Диазепам	5	285.10	154.00	193.05	222.10	257.00	228.00	-19
11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта-9-THC COOH)	20	345.10	327.05	299.20	118.90	193.00	229.15	-19
4'-метил-AM-2201, 5''-фтор-JWH-122 (MAM-2201)	2.5	374.10	168.95	141.10	115.00	232.05	143.85	-30
Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота A (THCA-A)	20	345.20	299.20	193.15	119.20	187.15	327.20	-17
Δ^9 -тетрагидроканнабинол	20	315.25	193.15	259.15	123.15	135.15	235.20	-11
Каннабидиол	20	314.95	192.90	93.05	135.10	123.00	259.15	-26

Примечание. Dwell – время сканирования/выдержки для каждого сигнала иона, мс; Pre. – ион-предшественник/родительский ион (precursor ion); Quant. – дочерний ион для количественного определения (daughter ion for quantification); Qual.1, 2, 3, 4 – дочерний ион для качественного определения (qualifier ion). Энергия соударения (collision energy of quantifier ion).

Пробоподготовка

Рабочие стандартные растворы и образцы контроля качества (QC) LC-MS / MS

С целью контроля воспроизводимости методик анализа наркотических веществ в различные дни, работу начинали с анализа контрольных образцов с большой (high-QC) и низкой (low-QC) концентрацией веществ. DBS-QC-карточки готовили в лаборатории с использованием распылительного модуля экстракционной системы «DBS-MS 500». Количество вещества наркотических веществ в QC образцах было известно (табл. 3).

Готовили два *стандартных раствора для калибровки* в метаноле. Раствор 1 содержал все исследуемые вещества с основными свойствами в концентрации 100 нг/мл (за исключением ТНСА-А и 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловой кислоты). Эту же процедуру повторяли для веществ с кислотными свойствами: ТНСА-А и 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота. Емкости со стандартными растворами для калибровки 1 и 2 подключали к портам 2 и 3 «DBS-MS 500».

Подготовка *DBS-QC-карточек* включала нанесение с помощью пипетки 20 мкл цельной крови (не содержащей наркотических веществ) и высушивание в течение 2 ч. Высушенные DBS-карточки помещали в «DBS-MS 500», где с помощью режима распыления производилось нанесение двух стандартных растворов для калибровки 100 нг/мл. На DBS-low-QC-карточки наносили по 10 мкл стандартных растворов для калибровки, на DBS-high-QC-карточки – по 40 мкл. Стандартные растворы 1 и 2 наносились последовательно, один на другой. DBS-high-QC и DBS-low-QC образцы готовили на отдельных DBS-карточках. Площадь распыления образцов экстракционной системой «DBS-MS 500» составляла 1×1 см. При распылении 10 мкл раствора с концентрацией 100 нг/мл на подготовленную DBS карточку количество экстрагируемого вещества составляет 0,126 нг (при диаметре экстракционного плунжера 4 мм). Стандартные растворы стабильны в течение 1 месяца при хранении при температуре -20°C. Все исследуемые вещества на DBS-QC карточке (за исключением героина) стабильны при комнатной температуре в течение 2 дней.

Внутренние стандарты. Для контроля хода анализа необходимо использовать не менее одного дейтерированного стандарта. В лаборатории 1 использовали стандарт алпрозолама-D5, в лаборатории 2 стандарт кокаина-D3. Данные стандарты элюируются в середине хроматографического разделения и обладают хорошими ионизационными свойствами.

Приготовление раствора внутреннего стандарта: стандартный образец (алпразолам-D5 или кокаин-D3) растворяли в метаноле с получением раствора 0,1 мкг/мл. Емкость с раствором внутреннего стандарта подсоединяли к порту 1 экстракционной системы «DBS-MS 500». При использовании метода для абсолютного количественного определения, каждое исследуемое вещество должно быть сравнено с соответствующим дейтерированным аналогом.

Образцы DBS-QC карточек. Пороговые концентрации исследуемых веществ в крови устанавливали по литературным данным [22] и по данным Регионального токсикологического центра (г. Даммам, Саудовская Аравия). При валидации методик был выбран концентрационный диапазон 5-1000 нг/мл. Для упрощения пробоподготовки готовили 6 калибровочных образцов различных концентраций (5 нг/мл, 25 нг/мл, 125 нг/мл, 250 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл), из которых 5 использовались в концентрационном диапазоне от 5 до 500 нг/мл, и 5 в концентрационном диапазоне от 25-1000 нг/мл. Донорскую кровь здоровых мужчин использовали для нулевого контроля. Для приготовления модельных образцов 6 различных концентраций осторожно смешивали исходные стандартные растворы с донорской кровью (табл. 2).

Таблица 2

Приготовление 6 калибровочных образцов различных концентраций

Концентрация наркотических веществ в образце, нг/мл	Объем, мкл и концентрация, мкг/мл исходного стандартного раствора исследуемых веществ с основными свойствами	Объем, мкл и концентрация, мкг/мл исходного стандартного раствора исследуемых веществ с кислотными свойствами	Объем донорской крови, не содержащей наркотических веществ, мл
5	5 мкл – 1 мкг/мл	5 мкл – 1 мкг/мл	990
25	25 мкл – 1 мкг/мл	25 мкл – 1 мкг/мл	950
125	12,5 мкл – 10 мкг/мл	12,5 мкл – 10 мкг/мл	975
250	25 мкл – 10 мкг/мл	25 мкл – 10 мкг/мл	950
500	12,5 мкл – 40 мкг/мл	12,5 мкл – 40 мкг/мл	975
1000	25 мкл – 40 мкг/мл	25 мкл – 40 мкг/мл	950

Полученные растворы наносили на DBS карточки по 20 мкл и сушили при комнатной температуре не менее 2 ч. DBS-QC-карточки хранили при температуре 4°C в закрытых полиэтиленовых пакетах, содержащих осушитель. Исходные стандартные растворы стабильны в течение двух недель.

Описание этапов хода анализа

Во избежание ложных положительных и ложных отрицательных результатов, была определена последовательность проведения анализа (табл. 3)

**Описание этапов анализа образцов с помощью автоматизированной системы
DBS-LC-MS/MS**

№	Этап	Примечание
1	Влияние растворителя	DBS карточки сравнения (blank DBS-card) экстрагируют без распыления внутреннего стандарта
2	Эффект матрицы	На DBS карточку с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ, распыляют внутренний стандарт. Сигнал должен быть ниже предела обнаружения
3	Анализ DBS- low-QC карточек (2 повторения)	Контроль качества образцов DBS- low-QC карточек с распылением внутреннего стандарта
4	Анализ DBS- high-QC карточек (2 повторения)	Контроль качества образцов DBS- high-QC карточек с распылением внутреннего стандарта
5	Эффект матрицы (2 повторения)	DBS-карточки с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ. Сигнал должен быть ниже предела обнаружения
6	Анализ образца пациента 1	Отрицательный: регистрируется только сигнал внутреннего стандарта Положительный: сигнал выше пороговой концентрации, повторный анализ образца с помощью альтернативной методики
7	Эффект матрицы	DBS-карточки с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ. Сигнал должен быть ниже предела обнаружения
8	Анализ образца пациента 2	Отрицательный: регистрируется только сигнал внутреннего стандарта Положительный: сигнал выше пороговой концентрации, повторный анализ образца с помощью альтернативной методики
9	Эффект матрицы	DBS-карточки с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ. Сигнал должен быть ниже предела обнаружения
n	Анализ DBS- low-QC карточек	Контроль образцов DBS- low-QC карточек проводится после анализа образцов 15 пациентов и в конце анализа каждой серии
n+1	Эффект матрицы	

DBS-карточки сравнения (blank-DBS-cards), DBS-карточки с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ, и DBS-QC карточки помещали в отдельные лотки экстракционной системы «DBS-MS-500». DBS-карточки, с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ, анализировали между испытаниями проб пациентов, с целью подтверждения отсутствия загрязнения анализируемой пробы следами предыдущей пробы.

Если испытуемые образцы были отобраны в разных местах, чтобы исключить загрязнение пробы, в ход анализа вводят дополнительный этап. В таком случае, при нанесении образцов на карточку, пятно 1 (ячейку 1) оставляют пустой, и в лаборатории, перед проведением анализа, на эту ячейку наносят образец крови, не содержащий исследуемые вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Время анализа одного образца по методике экспресс анализа для 28 наркотических веществ составляет 5 минут. Время анализа одного образца по методике общего скрининга с использованием базы данных судебной токсикологии («Forensic Toxicology Database», «Shimadzu»), позволяющей определить более 1250 веществ, составляет 20 минут. Для каждого наркотического вещества была получена линейная зависимость в интервале пороговая-токсическая концентрация (табл. 3). Использование пяти MRM переходов для идентификации каждого соединения позволило повысить общую интенсивность сигнала и получить достаточно данных для их подтверждения. Дополнительная регулировка времени сканирования, позволяющая увеличить или уменьшить интенсивность сигнала, позволила снизить предел количественного определения (LOQ) некоторых веществ (табл. 1). Чтобы ускорить время сбора данных MRM-переходов, для каждого соединения были определены соответствующие интервалы времени удерживания (см. приложение).

Таблица 3

Результаты анализа DBS-QC карточек

	Относительное стандартное отклонение, %				Корреляция R ²		Пороговая концентрация [22], нг/мл	Токсическая концентрация нг/мл
	5 нг/мл	25 нг/мл	250 нг/мл	500 нг/мл	5-500 нг/мл	25-1000 нг/мл		
Кодеин	10.4	10.5	9.7	11.6	0.992	0.997	50	1100
6-моноацетилморфин (6-МAM)	22.3	9	13.4	15.6	0.992	n/a	10	n/a
3,4-метилендиокси-метамфетамин (MDMA)	14.3	8.5	6.8	6.3	0.995	0.999	100	1000
Амфетамин	12.6	9.6	4.9	7.1	0.996	0.999	100	1000
Метамфетамин	13.2	11.3	8	9	0.995	0.998	100	n/a
N-метилдиэтаноламин (MDEA)	11.8	8.7	6.9	6.6	0.994	0.997	100	n/a
4,4'-метиленди-анилин (MDA)	9.4	5.1	5.3	5.8	0.995	0.998	100	n/a
<i>Героин (n/a, не стабилен на карточке)</i>	4.8	7.4	4.6	5.6	0.995	0.997	50	200
Кокаин	14.8	13.3	14.7	7.7	0.999	n/a	20	1000
Морфин	18.6	9	8.2	8.6	0.993	0.998	50	200
7-аминоклоназепам	12.6	7.7	7.4	6.6	0.995	n/a	25	n/a
Хлорфенамин	11.6	3.4	1.9	7.1	0.999	n/a	25	n/a

Клозапин	11.2	5.1	6.5	3.9	0.994	n/a	25	n/a
Бромазепам	15.2	7.6	6.5	5.7	0.998	n/a	25	n/a
Мидазолам	10	4.5	3.1	4	0.995	n/a	25	n/a
Клоназепам	14.7	6.9	5.7	8.2	0.995	n/a	25	80
Клобазам	13.3	6.6	5.8	8.1	0.997	n/a	25	n/a
Оксазепам	13.8	13.3	11.1	12.6	0.999	n/a	25	1400
Алпразолам	11.9	3.9	4.5	7.1	0.991	n/a	25	350
Хлорпромазин	16.6	13.9	13.1	5.6	0.999	n/a	25	n/a
Нордiazепам	13	11.1	6.9	7	0.999	n/a	25	n/a
Дiazепам	19.4	29.9	24.8	31.8	0.995	n/a	25	3000
11-нор- Δ^9 -тетра- гидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта- 9-THC COOH)	15.4	11.8	11.9	7.4	0.998	n/a	10	n/a
4'-метил-AM-2201, 5''- фтор-JWH-122 (МAM- 2201)	16.8	11.1	10	5.6	0.996	n/a	10	n/a
Δ^9 -тетрагидро- каннабиноловая кислота A (THCA-A)	13.6	11	15.4	8.7	0.998	n/a	10	200
Δ^9 -тетрагидро- каннабинол	13.2	12.3	6.8	8.7	0.995	n/a	10	n/a
Каннабидиол	10.5	8.4	12.1	9	0.996	n/a	10	n/a

*n/a – нет данных

Линейная зависимость (корреляция) и прецизионность

При валидации методик анализировали DBS-QC карточки 6 различных концентраций в разные дни. При анализе образцов внутреннего стандарта относительное стандартное отклонение составило менее 15 % для всех исследуемых веществ в образцах различных концентраций в диапазоне 5-1000 нг/мл. Полученные результаты коэффициента корреляции и относительного стандартного отклонения для всех исследуемых веществ приведены в табл. 3. Для сравнения результатов анализа и для построения калибровочного графика использовали соотношение количество исследуемого вещества к внутреннему стандарту. По результатам анализа была получена линейная зависимость для всех исследуемых веществ. Во всех точках калибровочной функции для всех исследуемых веществ были получены прецизионные результаты. Относительное стандартное отклонение составило менее 15 %; и менее 20 % для концентрационного уровня, соответствующего пределу количественного определения (LOQ), за исключением образцов THCA-A, 6-МAM и diaзепамa. Для образцов THCA-A, 6-МAM и diaзепамa было необходимо проведение дополнительных исследований. В табл. 3 также приведены литературные данные значений пороговых и токсических концентраций наркотических веществ в образцах крови [7, 22]. Для образцов мочи были использованы те же пороговые концентрации, однако в дальнейшей работе они могут быть скорректированы в результате увеличения первичных данных. Поскольку целью методики было достоверно определить

наркотические вещества в их пороговой концентрации, все образцы, в которых содержание наркотических веществ было выше этой концентрации, были дополнительно проанализированы с помощью альтернативных методов.

На рис. 2 приведен калибровочный график зависимости отклика детектора от концентрации амфетамина для DBS-QC образца 25 нг/мл. Данное вещество было идентифицировано в одном из образцов, полученных лабораторией для токсикологического анализа, после внедрения разработанной методики. Также на рис. 2 приведен MRM спектр и структура соответствующей молекулы, сгенерированные базой данных судебной токсикологии «Shimadzu». Получено 100 % совпадение и хорошее перекрытие фрагментов масс-спектра амфетамина. В данном испытании использовали внутренний стандарт алпрозолам-D5 (рис. 2).

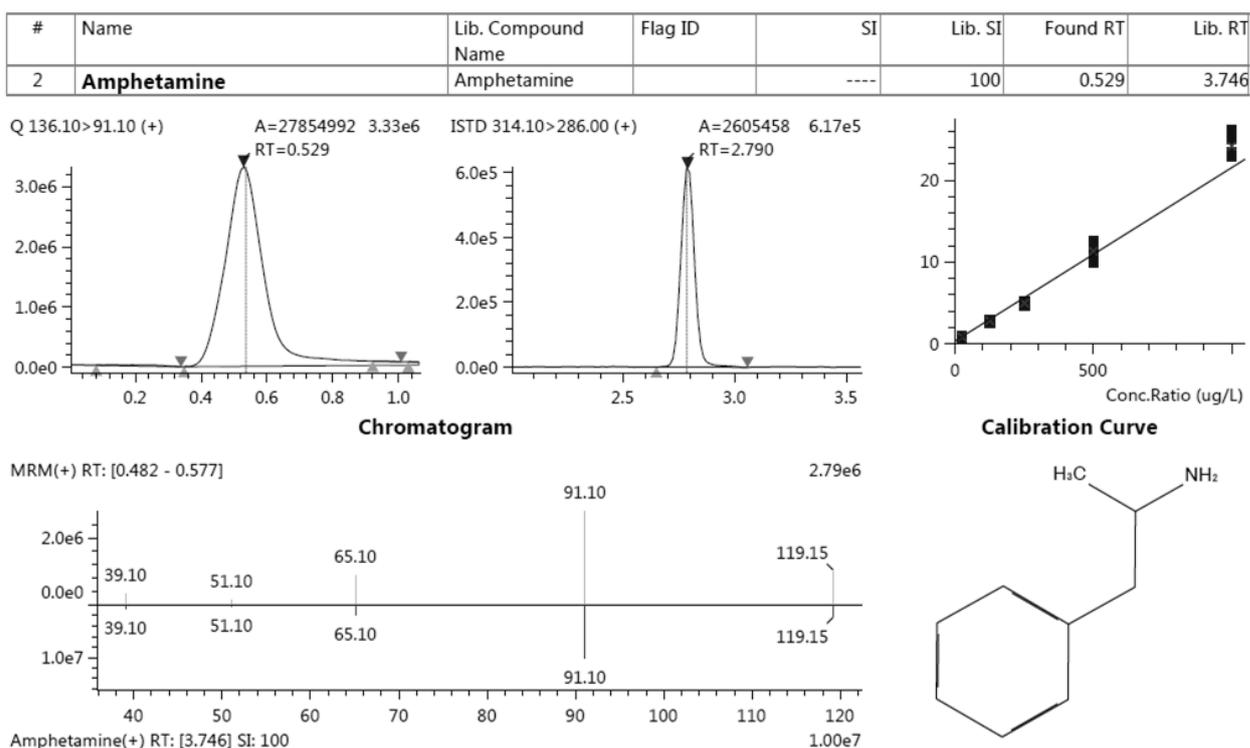


Рис. 2 Отчет базы данных по образцу амфетамина (хроматограммы амфетамина и внутреннего стандартного образца (алпрозолам-D5), калибровочная кривая, MRM спектр, и структура)

«Эффект переноса»

Контроль загрязнения последующей пробы следами предыдущей проводили путем анализа DBS-карточки с образцами крови, не содержащими исследуемых веществ («бланк-матрица»), сразу после экстрагирования образца DBS-QC карточки (1000 нг/мл). При разработке методики были выполнены требования руководства к валидации биоаналитических методик [18, 19]. Было установлено отсутствие «эффекта переноса». На

рис. 3 приведены результаты хроматографирования стандартного образца амфетамина 1000 нг/мл и «бланк матрицы». Данная процедура была оптимизирована путем программирования последовательности промывки «DBS-MS 500» и включала: промывку выходного капилляра экстракционной системы 0,1 % раствором муравьиной кислоты в смеси метанол : ацетонитрил : 2-пропанол : вода (25:25:25:25, об.) в течение 20 с под давлением 45 бар, и промывку входного отверстия экстракционной камеры раствором для экстракции в течение 10 с.

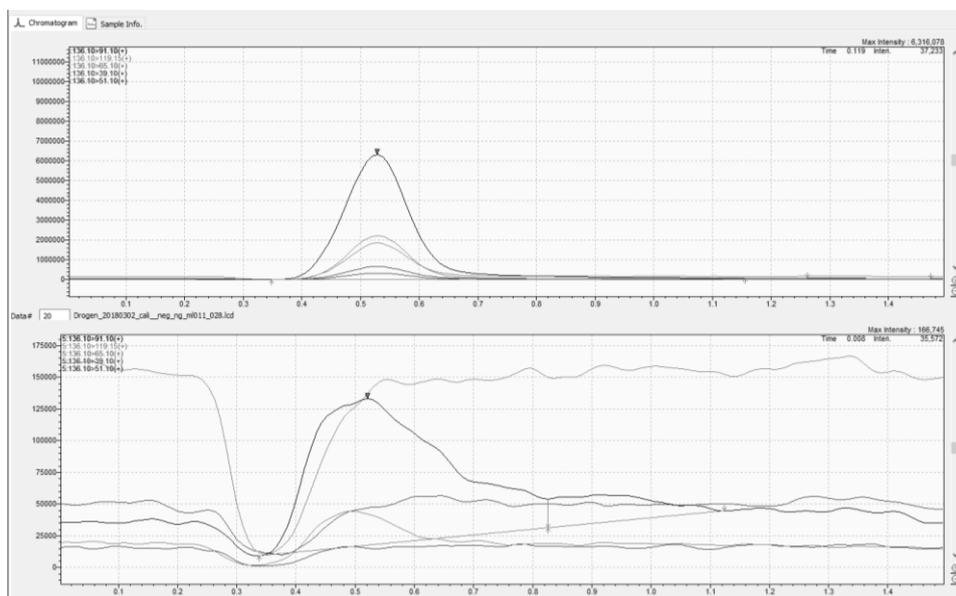


Рис. 3 Отсутствие «эффекта переноса» на примере хроматограммы стандартного вещества амфетамина 1000 нг/мл и последующей «бланк матрицы»

Образцы контроля качества и внутренний стандарт

Перед проведением анализа проводили измерение DBS-low-QC и DBS-high-QC карточек. Концентрация DBS-low-QC карточек была близкой к пороговой концентрации производных ТНС, в то время как концентрация DBS-high-QC карточек была значительно выше, что позволяло контролировать анализ. Нанесение на карточки внутренних стандартов осуществлялось в экстракционной системе «DBS-MS 500» с помощью модуля распыления непосредственно перед экстракцией: 10 мкл дейтерированного стандарта алпрозолама-D5 или кокаина-D3 (0,1 мкг/мл в метаноле) распыляли на DBS карточку. Установлено, что при хранении раствора внутреннего стандарта в холодильнике, он стабилен в течение двух недель и может быть использован на протяжении этого времени. На стадии разработки методики использовали дейтерированный стандарт алпрозолама-D5. При внедрении методики в условиях другой лаборатории, в качестве внутреннего стандарта использовали кокаин-D3, ввиду его наличия.

Перенос методики в токсикологическую лабораторию для рутинного анализа

Перенос методики DBS (для образцов крови). Методики были разработаны в исследовательской лаборатории с использованием ВЭЖХ системы «Shimadzu LC-MS 8060». Следующим этапом работы был перенос методик в лабораторию для рутинного анализа, оборудованную ВЭЖХ системой «Shimadzu LC-MS 8040». С помощью инструмента оптимизации программного обеспечения «Labsolution» осуществляли корректировку напряжений MRM исследуемых веществ. Для построения калибровочной функции анализировали 5 образцов в трех повторениях в диапазоне от 10 до 500 нг/мл исследуемого наркотического вещества в крови, т.к. данный концентрационный диапазон представляет интерес для рутинного анализа. Предварительно подготовленные DBS-QC-карточки анализировали до и после калибровочных образцов в соответствии с описанным ходом анализа.

Практически для всех соединений были получены приемлемые результаты: коэффициент корреляции более 0,995 и относительное стандартное отклонение менее 15 %. Для производных ТНС коэффициент корреляции был более 0,985 и относительное стандартное отклонение менее 25 % (см. приложение).

Для ВЭЖХ системы «Shimadzu LC-MS 8040» чувствительность обнаружения ТНС-производных находится в предельных значениях, однако, при выборе пороговой концентрации 25 нг/мл (а не 10 нг/мл) могут быть получены надежные результаты.

Адаптация методики для образцов мочи. Поскольку токсикологическую лабораторию достаточно часто поступают образцы мочи, разработанная методика была адаптирована для определения того же перечня наркотических веществ в моче методом «сухих пятен» (DUS). На образцы мочи, не содержащие исследуемых веществ, наносилась та же смесь стандартов, которая использовалась для образцов крови. Затем была произведена калибровка по 3 точкам в диапазоне от 10 до 400 нг/мл. Объем нанесения образцов мочи на карточку составил 10 мкл. Карточки для нанесения мочи покрыты специальным пигментным веществом, для того чтобы бесцветная жидкость при нанесении была видна (см. фотографию карточек DUS в приложении) и могла быть зафиксирована встроенной фотокамерой экстракционной системы «DBS-MS 500». По результатам анализа были получены следующие метрологические характеристики: коэффициент корреляции > 0,995 и относительное стандартное отклонение менее 15 % (менее 25 % при LOQ), за исключением производных ТНС, для которых стандартное отклонение было ниже 25 % (за исключением LOQ, см. приложение). Также морфин и MDA не были идентифицированы вследствие их метаболизма.

Образцы рутинного анализа

Была проведена апробация разработанных методик методом DBS-LC-MS/MS на положительных образцах из лаборатории г.Даммама. Для анализа использовали кровь и мочу одного и того же подозреваемого. Результаты были положительными на наличие амфетамина и 11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабиноловой кислоты как в моче, так и в крови. Для обеих матриц была выбрана одна и та же пороговая концентрация. В крови были обнаружены Δ^9 -тетрагидроканнабинол и каннабидиол, а в моче – ТНСА-А, что связано с метаболизмом ТНСА: нативная ТНСА обнаруживается в крови, а карбоксилированная ТНСА обнаруживается в моче. Полученные данные были сопоставимы с результатами анализа, проведенного в лаборатории г. Даммам с помощью альтернативных методик, что является подтверждением возможности использования разработанной методики для анализа высушенных пятен биологических жидкостей (сухих матриц).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработанные методики были успешно перенесены из исследовательской лаборатории в практическую лабораторию, где проводится рутинный анализ. Чувствительность системы «Shimadzu LC-MS 8040» была достаточной для анализа практически всех веществ, однако предел обнаружения производных ТНС находится на пределе чувствительности прибора. С другой стороны, при анализе образцов мидазолама и клозапина в концентрации 1000 нг/мл, сигнал MRM достигал насыщения, поэтому при изучении линейности представлены результаты в концентрациях до 500 нг/мл. Использование данного оборудования дает возможность анализировать микроколичества наркотических веществ. Так, при уменьшении объема образца до одной капли крови, содержащей наркотические вещества в «реальных» концентрациях, в систему для анализа поступает всего нескольких пикограмм. Такого маленького количества вещества вполне достаточно для обнаружения и количественного определения. Использование специального оборудования, позволяющего автоматизировать обработку до 500 DBS-карточек без какого-либо вмешательства аналитика, дает возможность быстро и экономично провести скрининг большого количества образцов.

Использование тандемной масс-спектрометрии позволяет обнаружить вещества, которые не разделяются хроматографически, по их MRM данным. В случае, когда различные соединения имеют одинаковые переходы MRM и не разделяются, можно провести идентификацию соединений по структуре их дочерних ионов. Так, морфин и 7-аминоклоназепам элюируются через 0,62 минуты и имеют сходную массу родительского иона (иона-предшественника), равную 286 m/z, однако структура дочерних ионов (фрагментных ионов) различна, что позволяет их идентифицировать.

Чтобы усилить сигнал определенных наркотических веществ и снизить их LOQ, регулировалось время сканирования. Увеличение времени сканирования от 5 до 20 мс значительно увеличивает отношение сигнал/шум (signal noise ratio, SNR). Например, SNR для кодеина составляло 11,67 при 5 мс, 13,81 при 10 мс и 20,35 при 20 мс. При этом, абсолютная площадь пика существенно не увеличивается, но снижается фоновый шум, и, следовательно, увеличивается величина SNR, что позволяет снизить предел обнаружения.

Внутренние стандарты использовали для контроля и нормализации эффективности экстрагирования, чтобы обеспечить правильную работу системы и избежать ложно отрицательных результатов [15, 25]. Нанесение внутреннего стандарта на пятно DBS-карточки до экстракции является оптимальным для количественного определения. Согласно с результатами исследования П. Абу-Раби, уровень гематокрита может влиять на эффективность экстрагирования пробы из пятна, поэтому внутренний стандарт необходимо наносить перед экстракцией [25]. Добавление внутреннего стандарта к образцу крови до нанесения на DBS карточку представляется невозможным, поскольку обычно забор образцов и их нанесение на карточку происходит не в условиях лаборатории.

Для контроля установленных валидационных характеристик биоаналитической методики и оценки достоверности результатов анализа исследуемых образцов использовались карточки контроля качества – low-QC и high-QC. На начальном этапе карточки QC готовили непосредственно в лаборатории с использованием распылительного модуля «DBS-MS 500». Образец low-QC отражал пороговую концентрацию целевого наркотического вещества, а образец high-QC – токсическую концентрацию. Это позволило напрямую сравнивать результаты анализа рутинных образцов и low-QC, и получать положительные или отрицательные результаты скрининга с большей надежностью в выбранном концентрационном диапазоне.

Карточки DBS со стандартными веществами хранятся в морозильной камере и долгосрочные исследования стабильности данных карточек продолжаются. Поскольку анализ карточек в экстракционной системе «DBS-MS 500» проводится при комнатной температуре, стабильность исследуемых веществ на карточках требует изучения. Исследования стабильности веществ на карточках при глубокой заморозке и при комнатной температуре проводятся в лаборатории Регионального токсикологического центра г. Даммам.

Особенностью экстракционной системы «DBS-MS 500» является экстрагирование карточки в горизонтальном положении. Небольшой объем растворителя подается при повышенном давлении снизу через изолированный участок на задней поверхности DBS карточки. Для экстракции не требуется никаких других растворителей (ВЭЖХ класса) или

расходных материалов, что делает анализ более экономичным и хорошо подходит для анализа большого количества образцов. Так как основным расходным материалом является DBS-карточка, которая состоит из целлюлозы, техника анализа является экологичной по сравнению с пробоподготовкой альтернативными методами.

Аналитическая методика была успешно применена для анализа наркотических веществ в образцах мочи. Исключением стало определение MDA и морфина, т.к. оба соединения быстро метаболизируются до сульфатов и глюкуронида перед экскрецией с мочой [25]. Для данных веществ методика должна быть адаптирована для анализа их метаболитов, что требует проведения дополнительных исследований.

Методика общего скрининга с использованием базы данных («Forensic Toxicology Database», «Shimadzu») позволяет обнаруживать и другие наркотические вещества, поскольку инструмент поиска сравнивает гомологичные дочерние ионы с массой иона-предшественника в качестве предварительного фильтра возможных вариантов. С помощью этой новой функции, например, новые синтетические каннабиноиды могут быть обнаружены по одинаковому характеру фрагментации исходной молекулы, независимо от массы иона-предшественника. С другой стороны, это может также привести к более чем одному совпадению с базой данных при определении соединений схожих по химической структуре. Например, при анализе образца MDA результат показывает 100 % совпадение базы данных с MDMA и MDEA (рис. 4), поскольку они имеют одну и ту же схему фрагментации. В этом случае их можно отличить по массе иона-предшественника.

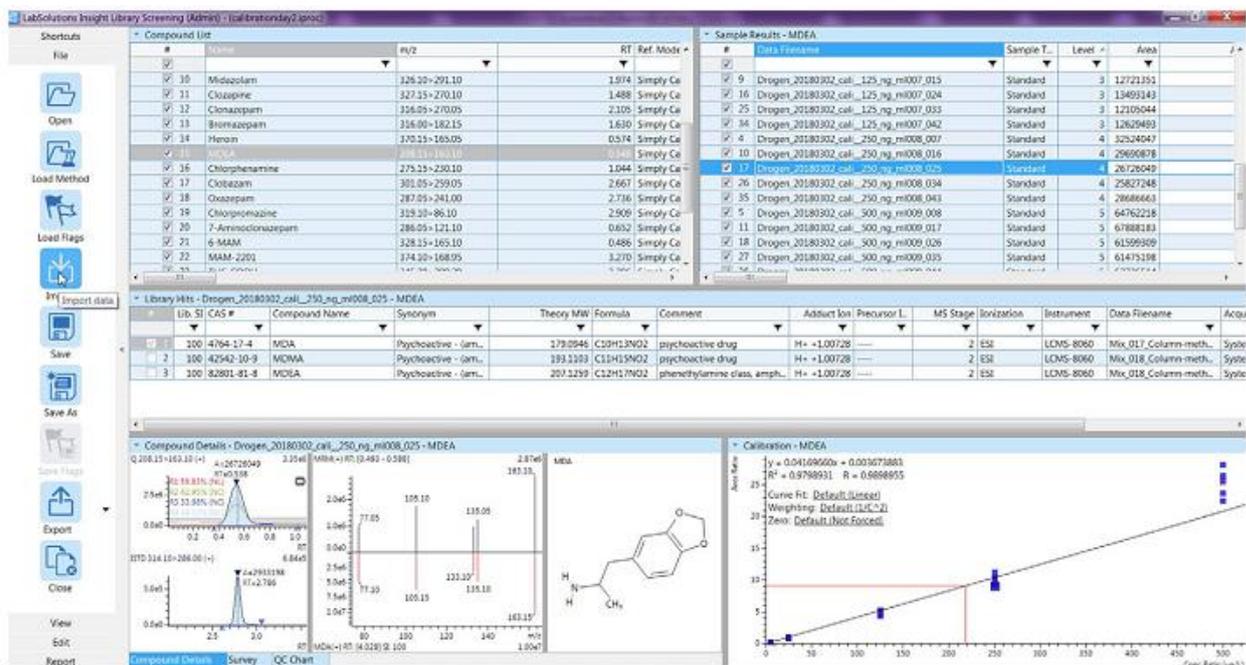


Рис. 4 Результаты анализа MDA, показывающие также положительный результат для MDMA и MDEA

Весь ход анализа экспресс методики и общей методики скрининга был полностью автоматизирован. Каждый этап контролировался и документировался без какого-либо участия аналитика. Каждая стадия подготовки пробы стандартизирована путем автоматизации. Область применения данного метода была расширена с использованием базы данных судебной токсикологии («Forensic Toxicology Database», «Shimadzu»), для выявления и количественной оценки более 1250 наркотических веществ в течение 20 мин.

ВЫВОДЫ

Впервые разработан автоматизированный ход анализа высокопроизводительного скрининга наркотических веществ и внедрен в лабораторию для рутинного анализа. На сегодняшний день методика ежедневно используется для мониторинга безопасности на рабочем месте и для анализа образцов подозреваемых на алкогольное, наркотическое опьянение. Образцы крови и мочи анализируются с помощью DBS-LC-MS/MS системы. В зависимости от задач анализа используется либо экспресс-методика или методика общего скрининга. Весь процесс анализа – от забора проб для анализа до формирования отчета, связан с системой штрих-кода. Карточки контроля качества могут быть подготовлены лабораторией с использованием модуля распыления «DBS-MS 500». Все этапы анализа документируются, и методики соответствуют требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP) [23]. Разработанные методики могут быть легко модифицированы и внедрены в условия других лабораторий, расширен перечень объектов анализа.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Благодарность

Авторы хотели бы поблагодарить всех сотрудников лаборатории и фармацевтов исследовательской лаборатории Регионального токсикологического центра г. Даммам за участие в проекте, за поддержку и выполнение работы на высочайшем уровне.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Moeller, M. R., Steinmeyer, S. & Kraemer, T. (1998) Determination of drugs of abuse in blood. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, **713**, 91–109
- [2] Mercolini, L. & Protti, M. (2016) Biosampling strategies for emerging drugs of abuse: towards the future of toxicological and forensic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **130**, 202–219
- [3] Sim, J., Kim, E., Yang, W., Woo, S. & In, S. (2017) An LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 15 antipsychotics and two metabolites in hair and its application to rat hair. *Forensic Science International* **274**, 91–98

- [4] Resano, M., Belarra, M. A., García-Ruiz, E., Aramendía, M. & Rello, L. (2018) Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **99**, 75–87
- [5] Sadler Simões, S., Castañera Ajenjo, A. & Dias, M. J. (2018) Dried blood spots combined to an UPLC–MS/MS method for the simultaneous determination of drugs of abuse in forensic toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **147**, 634–644
- [6] Oliveira, R. V, Henion, J. & Wickremsinhe, E. R. (2014) Automated high-capacity on-line extraction and bioanalysis of dried blood spot samples using liquid chromatography/high-resolution accurate mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, **28**, 2415–26
- [7] Gaugler, S., Rykl, J., Grill, M. & Cebolla, V. L. (2018) Fully automated drug screening of dried blood spots using online LC-MS / MS analysis. *Journal of Applied Bioanalysis*, **4**, 7–15
- [8] Guthrie, R. & SUSI, A. (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, **32**, 338–343
- [9] Gaugler, S. *et al.* (2018) Extended and Fully Automated Newborn Screening Method for Mass Spectrometry Detection. *International Journal of Neonatal Screening*, **4**, 2
- [10] Lemonde, H. (2014) Newborn screening for inborn errors of metabolism. *Paediatrics & Child Health*, **25**, 103–107
- [11] Milosheska, D., Grabnar, I. & Vovk, T. (2015) Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **75**, 25–39
- [12] Enderle, Y., Foerster, K. & Burhenne, J. (2016) Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **130**, 231–243
- [13] Nys, G., Kok, M., Servais, A.-C. & Fillet, M. (2017) Beyond dried blood spot: current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, **97**, 326–332
- [14] Kostić, N. *et al.* (2015) Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC-MS/MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **109**, 79–84
- [15] Duthaler, U., Berger, B., Erb, S., Battegay, M., Letang, E., Gaugler, S., Krähenbühl, S. (2017) Automated high throughput analysis of antiretroviral drugs in dried blood spots. *Journal of Mass Spectrometry*, **52**, 534–542
- [16] Odoardi, S., Anzillotti, L. & Strano-Rossi, S. (2014) Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic science international*, **243C**, 61–67
- [17] Ambach, L., Hernández, R., König, S. & Weinmann, W. (2014) Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, **6**, 367–75
- [18] Antelo-Domínguez, Á. *et al.* (2013) Simultaneous determination of cocaine and opiates in dried blood spots by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, **117**, 235–241
- [19] Sausseureau, E., Lacroix, C., Gaulier, J. M. & Goulle, J. P. (2012) On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **1-7**, 885–886
- [20] Sempio, C., Morini, L., Vignali, C. & Groppi, A. (2014) Simple and sensitive screening and quantitative determination of 88 psychoactive drugs and their metabolites in blood through LC-MS/MS: Application on postmortem samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **970**, 1–7
- [21] (2018) Shimadzu, Forensic toxicology database.

- https://www.shimadzu.com/an/lcms/forensic_toxicology-database/index.html. (Accessed: 19-Apr, 2018)
- [22] (2017) Baer, D.M. Cutoff and toxicity levels for drug of abuse testing. http://www.clr-online.com/CLR2017-13_Table-of-Cutoff-Toxicity-DOA.pdf. (Accessed: 25-Aug, 2017)
- [23] (2011) European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (Accessed: 25-Aug, 2017)
- [24] Abu-Rabie, P., Denniff, P., Spooner, N., Chowdhry, B. Z. & Pullen, F. S. (2015) Investigation of different approaches to incorporating internal standard in DBS quantitative bioanalytical workflows and their effect on nullifying hematocrit-based assay bias. *Analytical Chemistry*, **87**, 4996–5003
- [25] Schwaninger, A.e. et. al., (2011) Urinary Excretion Kinetics of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and Its Phase I and Phase II Metabolites in Humans following Controlled MDMA Administration. *Clinical Chemistry*, **57**, 12, 1748-1756

Время удерживания, MRM диапазон и время сканирования DBS-LC-MS/MS методик

Название	Ret. Time	Start	End	Dwell	Event Time
	[мин]	[мин]	[мин]	[мс]	[мс]
Кодеин	0.46	0	1.5	20	0.105
6-моноацетилморфин (6-МAM)	0.47	0	1.5	5	0.030
3,4-метилendioксиметамфетамин (MDMA)	0.50	0	2.5	5	0.030
Амфетамин	0.51	0	1.5	5	0.030
Метамфетамин	0.51	0	1.5	5	0.030
N-метилдиэтаноламин (MDEA)	0.52	0	1.5	5	0.030
4,4'-метилendioанилин (MDA)	0.52	0	1.5	5	0.030
Героин	0.52	0	1.5	20	0.105
Кокаин	0.58	0	1.5	2.5	0.018
Морфин	0.62	0	1.5	20	0.105
7-аминоклоназепам	0.62	0	1.5	5	0.030
Хлорфенамин	0.99	0	1.5	5	0.030
Клозапин	1.45	1	2.5	5	0.030
Бромазепам	1.57	1	2.5	5	0.030
Мидазолам	1.95	1.5	2.5	5	0.030
Клоназепам	2.08	1.5	2.5	5	0.030
Клобазам	2.66	2	3.5	5	0.030
Оксазепам	2.73	2	3.5	5	0.030
Алпразолам D-5 (внутренний стандарт)	2.79	2	4	5	0.006
Алпразолам	2.80	2	3.5	2.5	0.018
Хлорпромазин	2.91	2	3.5	5	0.030
Нордиазепам	2.95	2.5	4	5	0.030
Диазепам	3.00	2.5	4	5	0.030
11-нор- Δ ⁹ -тетра-гидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта-9-THC COOH)	3.22	2.5	4	20	0.105
4'-метил-AM-2201, 5''-фтор-JWH-122 (MAM-2201)	3.27	2.5	4	2.5	0.018
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабиноловая кислота A (THCA-A)	3.28	2.5	4	20	0.105
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабинол	3.33	2.5	4	20	0.105
Каннабидиол	3.33	2.5	4	20	0.105

Примечание. Ret. time – время удерживания; Start – начало; End – конец; Dwell – время сканирования/выдержки для каждого сигнала иона, мс; Event time – Время появления

Результаты калибровки DBS в лаборатории Даммам

Название	Относительное стандартное отклонение			
	25 нг/мл	50 нг/мл	100 нг/мл	Корреляция
	[%]	[%]	[%]	R ²
Морфин	5.8	12.4	5.5	0.999
Амфетамин	2.4	3.4	0.6	0.999
Диазепам	10.1	4.9	12.8	0.999
Алпразолам	5.8	7.8	2.3	0.999
Метамфетамин	2.3	6.7	3.9	0.998
Кодеин	10.5	1.2	2.6	0.999
3,4-метилendioксиметамфетамин (MDMA)	1.1	1.9	1.1	0.999
Кокаин	0.5	5.3	1.4	0.998
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабинол	29.5	3.6	0.5	0.999
Мидазолам	2.7	6.0	2.9	0.999
Клозапин	2.6	5.2	1.4	0.999
Клоназепам	2.7	6.0	1.6	0.999
Бромазепам	5.4	1.2	1.4	0.999
Оксазепам	6.7	2.0	2.3	0.999
6-моноацетилморфин (6-МAM)	12.5	5.4	3.4	0.999
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабиноловая кислота А (THCA-A)	6.8	24.0	21.9	0.984
11-нор- Δ ⁹ -тетра-гидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта-9-THC COOH)	37.0	17.9	4.0	0.997
Нордiazепам	1.7	1.1	2.0	0.999
4,4'-метилendio-анилин (MDA)	0.6	6.4	5.1	0.999
Каннабидиол	39.1	21.5	6.2	0.999
ISTD variation over all samples	5.4 %			

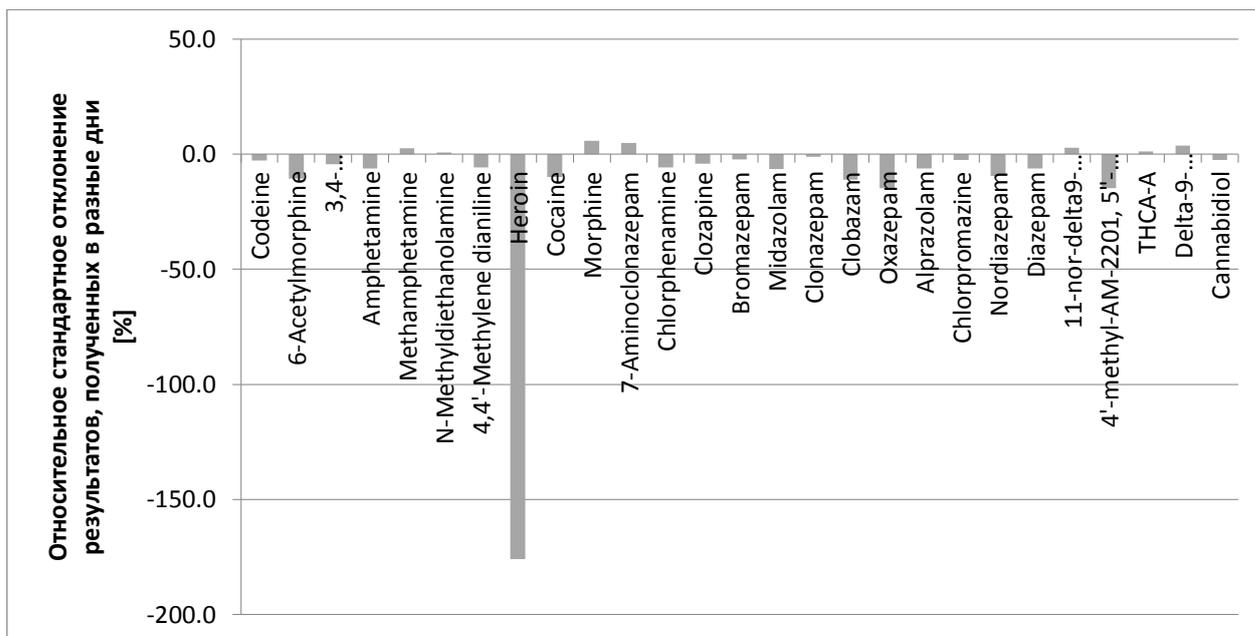
Результаты калибровки DUS лаборатории Даммам

Название	Относительное стандартное отклонение			
	25	50	100	Корреляция
	нг/мл	нг/мл	нг/мл	ция
	[%]	[%]	[%]	R ²
Морфин	141.4	26.4	27.3	0.999
Амфетамин	19.3	12.6	7.8	0.998
Диазепам	6.2	4.4	3.0	0.999
Алпразолам	4.2	2.4	2.5	0.999
Метамфетамин	9.5	14.5	21.8	0.999
Кодеин	20.7	2.5	3.1	0.999
3,4-метилendioксиметамфетамин (MDMA)	3.6	1.3	4.3	0.999
Кокаин	4.6	2.6	0.8	0.999
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабинол	25.1	13.1	9.8	0.999
Мидазолам	6.8	6.9	2.2	0.999
Клозапин	9.7	5.3	6.2	0.999
Клоназепам	3.2	1.7	3.0	0.999
Бромазепам	9.5	3.6	15.0	0.999
Оксазепам	5.4	4.7	0.2	0.999
6-моноацетилморфин (6-МAM)	9.6	1.8	5.0	0.999
Δ ⁹ -тетрагидро-каннабиноловая кислота А (THCA-A)	29.0	18.2	10.8	0.994
11-нор- Δ ⁹ -тетра-гидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта-9-THC COOH)	21.3	18.4	11.4	0.999
Нордизепам	11.1	1.9	4.2	0.999
4,4'-метилendio-анилин (MDA)	6.2	3.0	3.2	0.017
Каннабидиол	30.5	11.8	2.9	0.999
ISTD variation over all samples	2.5 %			

Карточка DUS для образцов мочи



Стабильность при комнатной температуре в течение 2 дней



Вещество	Dev.*	Вещество	Dev.*
	[rel. %]		[rel. %]
Кодеин	-2.7	Мидазолам	-6.5
6-моноацетилморфин (6-МAM)	-10.6	Клоназепам	-1.1
3,4-метилendioксиметамфетамин (MDMA)	-4.3	Клобазам	-11.0
Амфетамин	-6.3	Оксазепам	-14.7
Метамфетамин	2.6	Алпразолам	-6.1
N-метилдиэтаноламин (MDEA)	0.7	Хлорпромазин	-2.5
4,4'-метилendioанилин (MDA)	-5.8	Нордиазепам	-9.5
Героин	-176.1	Диазепам	-6.2
Кокаин	-9.9	11-нор- Δ ⁹ -тетра-гидроканнабиноловая кислота (11-нор-дельта-9-THC COOH)	2.7
Морфин	5.8	4'-метил-AM-2201, 5''-фтор-JWH-122 (MAM-2201)	-14.8
7-аминоклоназепам	4.8	Δ ⁹ -тетрагидро-каннабиноловая кислота А (THCA-A)	1.3
Хлорфенамин	-5.7	Δ ⁹ -тетрагидро-каннабинол	3.8
Клозапин	-4.1	Каннабидиол	-2.5
Бромазепам	-2.3		

* Относительное стандартное отклонение между результатами, полученными в разные дни, при комнатной температуре