

---

Главное управление здравоохранения администрации Челябинской области

**ЧЕЛЯБИНСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО  
СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ**

**Утверждаю:**  
Начальник ЧОБСМЭ,  
профессор

\_\_\_\_\_ П.И.Новиков  
“ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2002г.

**Методика количественного определения морфина, кодеина и димедрола в  
крови методом газовой хроматографии с масс- селективным детектором  
(метод ВЛОУПРО)**

“Методика количественного определения морфина, кодеина и димедрола в крови методом газовой хроматографии с масс- селективным детектором”// Челябинск, Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, 2002, 15с.

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

Настоящая методика предназначена для количественного определения в крови морфина, кодеина и димедрола, а также идентификации в крови некоторых других труднолетучих и наиболее часто употребляемых наркотических и лекарственных веществ основного характера методом хроматографии с масс-спектральным детектированием на газовом хроматографе HP-5890 (серия II) с масс-селективным детектором HP -5972 фирмы «HEWLETT PACKARD». Методика предусматривает использование некоторых положений международного стандарта «GLP», необходимого для международной аттестации химического анализа.

Перед серией анализов необходимо провести настройку масс - селективного детектора по стандартному веществу (перфторбутиламин), вводимому непосредственно в масс-спектрометр -»Autotune«. Для разделения большинства лекарственных неполярных или слабополярных веществ в газовом хроматографе применяются кварцевые капиллярные колонки типов HP-5, HP-1, Ultra-2 и Ultra-1, которые содержат пленку неполярной метилсиликоновой (HP-1 и Ultra-1) или частично полярной с 5% фенил-метилсиликоновой фазы (HP-5 и Ultra-2). Для количественного анализа кодеина и морфина в виде их пропионовых эфиров и дифенгидрамина (основания димедрола) подходят оба типа колонок. Параметры, при которых строились калибровочные кривые и проводилась оценка метрологических характеристик: колонка HP5-MS длиной 30 м., внутренним диаметром 0,25 мм, начальная температура колонки - 120°C, выдержка 1,0 мин., увеличение температуры со скоростью 20 град/мин до 300°C с выдержкой при конечной температуре -7 минут. Режим постоянного потока «Constant flow»- 1,44 мл/мин. Начальное давление на колонке 17,0 psi. Температура инжектора 250°C, устройства сопряжения с детектором -285°C. Ввод пробы без разделения потока со сбросом избытка через 1 мин. в отношении потоков 1:15 (Split/Splitless). Вводимый объем образца в этилацетате 1-1,5 мкл. Регистрация ионного тока осуществляется через 6,4 мин после ввода пробы. Напряжение на электронном умножителе с 6,4 до 8,45 мин - на 300 вольт выше Autotune, с 8,45 до 15 мин - на 600 вольт выше Autotune.

### **Изолирование, дериватизация и очистка**

К 2 мл крови добавляется 50 мкл раствора смеси внутренних стандартов этилморфина г/х 0,01 г/л и циклизина г/х 0,04 г/л, 1 мл 20% раствора тетрабората натрия, подогретого до 50-60°C и 8 мл смеси хлороформ : н-бутанол (9:1). Смесь встряхивается 5 минут и центрифугируется со скоростью 3000 об/мин. в течение 5 минут. Органический экстракт отделяется и пропускается через безводный сульфат натрия. Растворитель испаряется в токе воздуха досуха, к объекту добавляется по 50 мкл триэтиламина и пропионового ангидрида и смесь нагревается в закрытом флаконе 30 минут при 90°C. После остывания во флакон добавляется 0,5 мл 0,1н раствора соляной кислоты и 2 мл гексана, смесь встряхивается 1 минуту и помещается на 30-40 минут в морозильное отделение холодильника до замораживания водного слоя. Верхний гексановый слой сливается, а к водному слою добавляется 0,6 мл 1 н раствора едкого натра, проверяется рН среды (более 9) и объект экстрагируется 3 мл хлороформа (встряхивается 5 минут). Нижний хлороформный слой отделяется и пропускается через новую порцию безводного сульфата натрия и испаряется при 40°C в токе воздуха досуха.

### **Газохроматографический анализ**

К сухому остатку добавляется 80-100 мкл этилацетата и 1-1,5 мкл анализируется в методе BLOPPRO в режиме SIM по ионам:

I группа ионов (6,4-7,5 мин) - 186,201,275 (тримеперидин), 58,155,245 (трамадол-Н<sub>2</sub>O), 58,165,167 (дифенгидрамин).

II группа ионов (7,45-8,45 мин) - 58, 162, 135 (МДМА пропионовый эфир), 165, 167,194 (циклизин - внутренний стандарт), 124,140,271 (атропин - H<sub>2</sub>O), 58,188,319(трамадола пропионовый эфир).

III группа ионов (8,45-9,3 мин) - 58,202,215 (амитриптилин), 58,234,280 (имизин), 180,230,212 (кетамин пропионовый эфир), 194,250,285 (клонидина 1-пропионовый эфир), 98,218,219 (циклодол).

IV группа ионов (9,3-10,1 мин) - 124,140,359 (атропина пропионовый эфир), 194,250,306 (клонидина 2-пропионовый эфир), 283,256,285 (диазепам), 58,272,318 (хлорпромазин) 328,228,282 (тизерцин).

V группа ионов (10,1-10,55 мин) - 355, 282, 229 (кодеина пропионовый эфир), 369,296,340 (этилморфина пропионовый эфир- внутренний стандарт).

VI группа ионов (10,55-11,0 мин) -327,268,383 (6-МAM пропионовый эфир).

VII группа ионов (11,0-12,5 мин) -341,397,324 (морфина 2-пропионовый эфир). 312, 325, 382 (клозапина пропионовый эфир), 328,298,383 (буторфанола пропионовый эфир).

VIII группа ионов (12,5-15 мин) – 334,335,333 (стрихнин).

Поиск указанных соединений по временам удерживания и реконструированным хроматограммам характеристических ионов реализован в макрокомандах машинной станции «рго» и «рго2», входящих в группу макрокоманд с именем файла «n1.mas» (см. приложения). На рис. 1-3 приложения приведены калибровочные кривые для количественного определения морфина, кодеина и дифенгидрамина (основания димедрола) в крови по методу BLOPYPRO. Калибровочные кривые линейны в диапазоне концентраций морфина, кодеина и димедрола 0,05-2,0 мкг/мл. В таблице 1 приведены метрологические характеристики определения морфина, кодеина и димедрола по описанному выше методу. А в таблице 2 результаты контрольных анализов.

Для обеспечения пределов обнаружения, указанных в таблице 1, площадь пика внутреннего стандарта (этилморфина) должна быть не менее 30 тыс. ед. с интегратором RTE и 300 тыс. ед. с интегратором ChemStation. Концентрации анализируемых веществ от 0,02 до 0,05 мкг/мл, определенные в ходе анализа, при условии удовлетворительной идентификации интерпретируются как “следовое количество”.

Таблица 1  
Метрологические характеристики метода BLOPYPRO

Предел обнаружения по морфину, кодеину и дифенгидрамину, мкг/мл	0,02
Предел количественного определения, мкг/мл	0,05
Линейность, мкг/мл	0,05-2,0

Последовательность анализов с подготовкой калибровочной кривой приведена в таблице 3.

Следует отметить, что в процессе дериватизации часть анализируемых веществ не претерпевает никаких превращений и анализируется в нативном виде (дифенгидрамин, тримеперидин, циклизин, амитриптилин, имипрамин, тригексифенидил, хлорпромазин, левомепромазин, диазепам и стрихнин), а другие вещества претерпевают превращения при действии пропионового ангидрида с триэтиламино. Схемы превращений, происходящих при дериватизации, приведены на рис. 1-3. Изучение процесса переноса аналитов из анализа в анализ

в шприце и инжекторе хроматографа приведено в таблице 4. (при десятикратной промывке шприца хлороформом после ведения). Результаты показали, что образцы с содержанием анализа от 1,0 до 2,0 мкг/мл могут давать перенос анализа в следующую пробу с концентрацией выше предела обнаружения метода. Поэтому после анализа образцов с концентрациями выше 1,0 мкг/мл рекомендуется промывать шприц до 20 раз, промыть инжектор хроматографа 2 мл этилацетата и далее анализировать "холодную" пробу крови до получения отрицательного результата.

Таблица 2.  
Результаты контрольных анализов на точность и воспроизводимость

№ серии	Статистика	Морфин, мкг/мл		Кодеин, мкг/мл		Дифенгидрамин, мкг/мл	
		Нижний контроль (0,05)	Верхний контроль (1,0)	Нижний контроль (0,05)	Верхний контроль (1,0)	Нижний контроль (0,05)	Верхний контроль (1,0)
1		0,055	0,91	0,044	0,97	0,048	0,96
		0,05	0,95	0,05	1,11	0,063	1,11
		0,057	1,01	0,044	0,89	0,040	0,90
		0,041	1,07	0,045	1,15	0,042	1,16
		0,062	0,91	0,057	1,06	0,049	1,01
		0,044	1,00	0,049	1,13	0,060	1,25
	Среднее	0,052	0,98	0,048	1,05	0,050	1,06
	Точность,%	103,0	97,5	96,3	105,0	100,3	106,3
	Ср.квадр.откл.	0,008	0,06	0,005	0,100	0,009	0,13
	Коэфф. вар.%	15,57	6,48	10,46	9,53	18,74	12,45
2		0,047	1,06	0,044	1,02	0,054	1,02
		0,044	0,88	0,054	0,99	0,051	0,99
		0,061	1,02	0,057	1,07	0,045	1,02
		0,047	1,03	0,062	1,09	0,05	1,01
		0,047	0,96	0,059	1,02	0,044	1,00
		0,051	1	0,057	1,05	0,041	1,00
	Среднее	0,050	0,99	0,056	1,04	0,048	1,01
	Точность,%	99,0	99,2	111,0	104,0	95,0	100,7
	Ср.квадр.откл.	0,006	0,06	0,006	0,04	0,005	0,01
	Коэфф. вар.%	12,24	6,45	11,21	3,55	10,38	1,20
3		0,049	0,89	0,053	0,96	0,046	0,90
		0,058	0,960	0,058	1,00	0,055	1,04
		0,043	1,05	0,052	1,04	0,055	1,11
		0,051	0,95	0,046	0,99	0,049	1,02
		0,049	1,05	0,047	0,95	0,053	1,17
		0,048	1,08	0,043	1,12	0,044	1,14
	Среднее	0,0498	0,997	0,0497	1,009	0,0503	1,063
	Точность,%	99,5	99,7	99,4	100,9	100,6	106,3
	Ср.квадр.откл.	0,006	0,07	0,005	0,06	0,005	0,10
	Коэфф. вар.%	11,20	7,42	9,63	6,13	9,37	9,28
<b>Генеральное среднее</b>		<b>0,0503</b>	<b>0,988</b>	<b>0,0511</b>	<b>1,033</b>	<b>0,0493</b>	<b>1,044</b>
<b>Точность,%</b>		<b>100,5</b>	<b>98,8</b>	<b>102,2</b>	<b>103,3</b>	<b>98,6</b>	<b>104,4</b>
<b>Ср.квадр.откл.</b>		<b>0,0011</b>	<b>0,0116</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0214</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0325</b>
<b>Коэфф. вар.%</b>		<b>2,16</b>	<b>1,18</b>	<b>7,57</b>	<b>2,07</b>	<b>3,20</b>	<b>3,11</b>

Таблица 3.

Стандартная серия рутинных анализов  
с калибровкой

№ образца	Тип образца
1	Бланк +В.С.
2	0,02 мкг/мл
3	0,05 мкг/мл
4	0,3 мкг/мл
5	1,00 мкг/мл
6	2,00 мкг/мл
7	Бланк +В.С.
8	Нижний контроль
9-25	Анализируемые образцы
26	Верхний контроль

Таблица 4.

Результаты переноса аналитов

№ образца	Название пробы	Определяемая концентрация, нг/мл		
		Морфин	Кодеин	Дифенгидрамин
1	2000 нг/мл	1863	2128	1949
2	Бланк 1	30,8	33,6	23,2
3	Бланк 2	6,8	0	0
4	1000 нг/мл	959	996	1043
5	Бланк 1	0	2,3	0

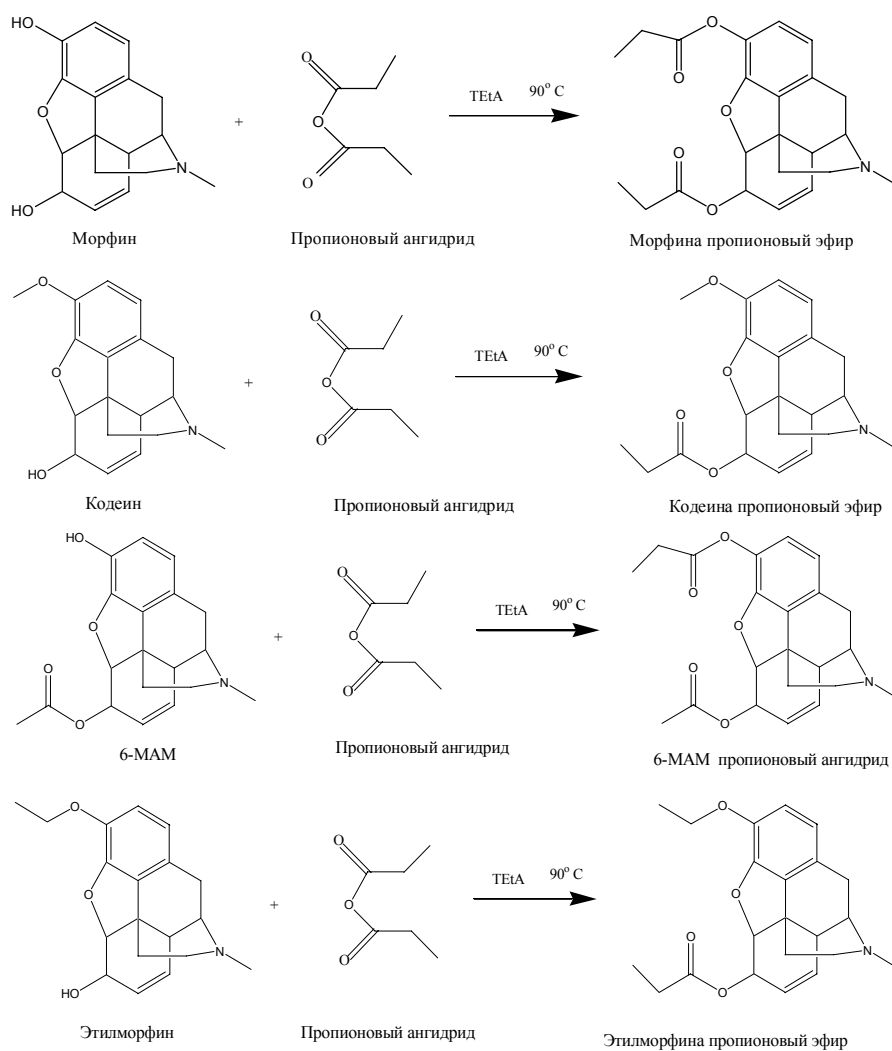


Рис.1. Схемы получения пропионовых эфиров морфина, кодеина, 6-МММ и этилморфина

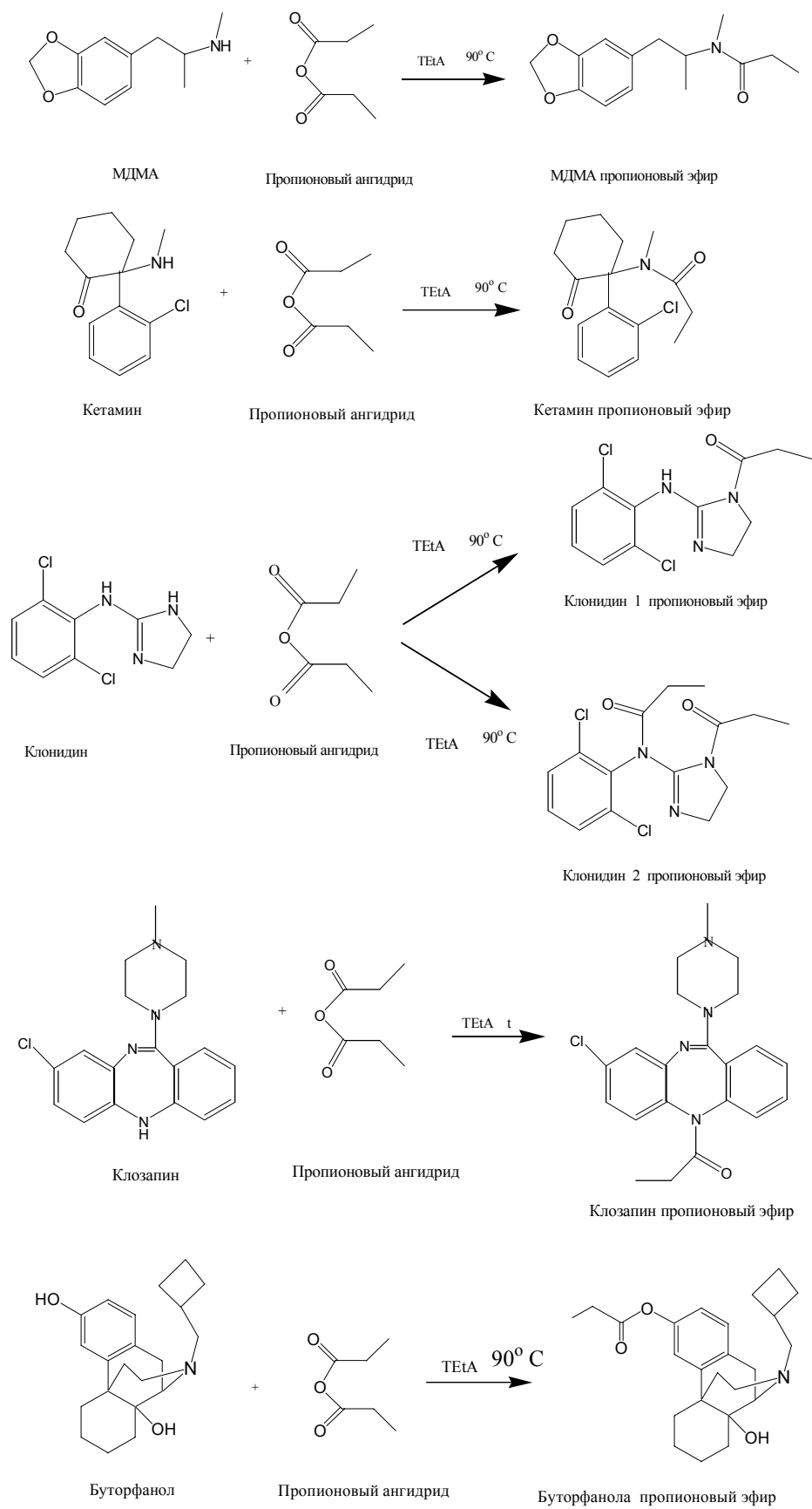


Рис.2. Схемы получения пропионовых эфиров МДМА, кетамина, клонидина, клозапина и буторфанола

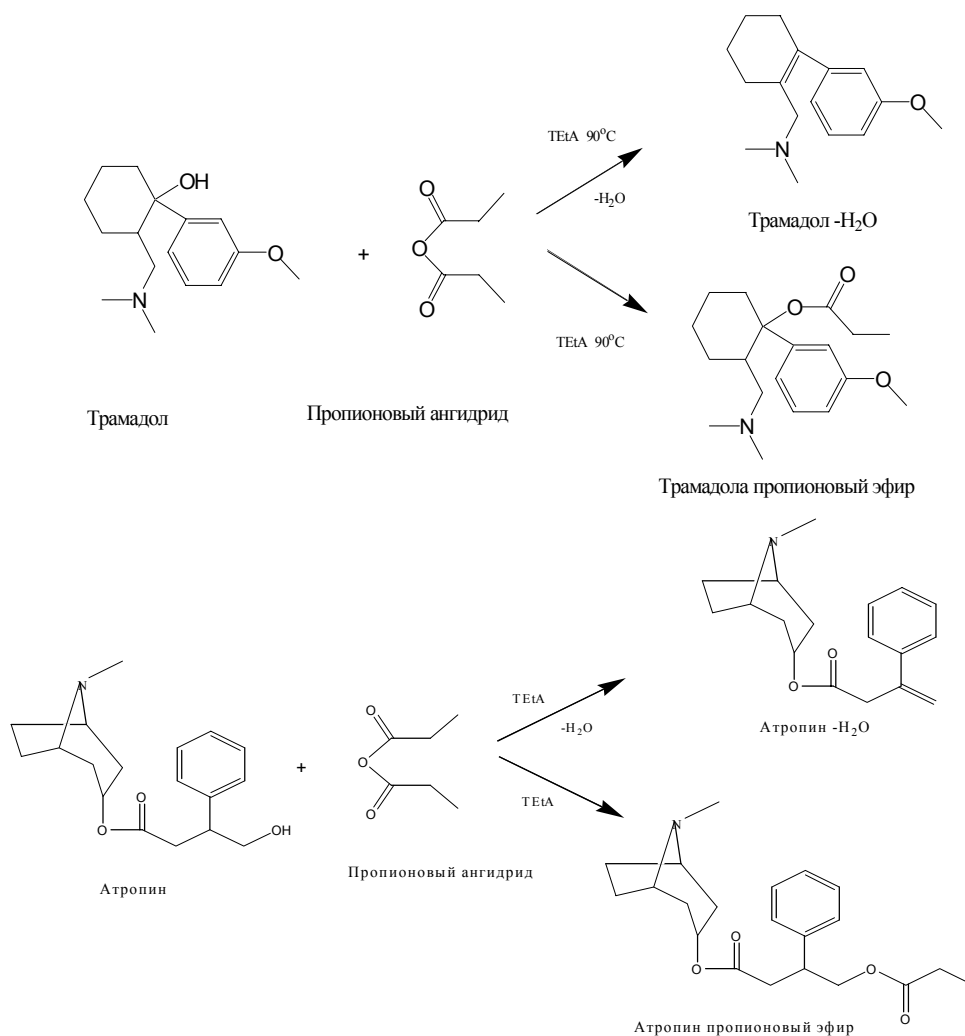


Рис.3. Схемы реакций пропионового ангидрида с трамадолом, атропином и буторфанолом.

Результаты анализа машинная станция формирует в виде рапорта, приведенного в таблице 5 (файл BL\_BU.XLS), в котором помимо количества анализируемых соединений приводятся данные по площадям пиков целевых ионов и качеству идентификации пиков (отношение площадей пиков подтверждающих ионов к площади целевого пика). Кроме того, результаты

Таблица 5.

Morphine, codeine & dimedrol in blood propionyl

Custom Reports Example Template

File D:\HPCHEM1\DATA\10161KOP.D  
 Operator Melentjev  
 Date 15 Aug 102 8:07 am  
 Sample 2 ml blood OPY PrO 100 mkl EtAc  
 Misc Info 1.5 mkl

Results

R.T.	Compound		Concentration	Area	Qualifiers	Q1	Min	Max	Q2	Min	max
10,43	Ethylmorphine PrO	ISTD	250,0 ng/ml	33102		129	96	144	16,9	12	18,1
10,29	Codeine PrO		79,0 ng/ml	12576		175	128	192	66,2	48	72,1
11,25	Morphine 2PrO		519,9 ng/ml	40206		66,8	56	84,1	52,2	44,1	66,1
7,7724	Cyclizine	ISTD	1000 ng/ml	44506		202	136	204	125	88,1	132
6,914	Diphenhydramine		336,3 ng/ml	19938		276	240	360	32,8	28,1	42,1



заносятся в базу данных (файл BL\_BU\_DB.XLS) На рис. 4-27 приложения приведены хроматограммы по характеристическим ионам для веществ, которые контролируются в данном методе.

\*Примечание. Если доказана хорошая межсерийная воспроизводимость результатов контрольных анализов без подготовки калибровочной кривой к каждой серии, то допускается анализ серии образцов, в которую включены только контрольные образцы. При этом после анализа "нижнего" контроля (см. табл.3) рекомендуется настроить ионные соотношения анализируемых веществ в методе BLOPPRO по этому образцу для последующей правильной идентификации анализируемых соединений в образцах, так как ионные отношения в некоторой степени зависят и от настройки масс селективного детектора.

### **Оборудование**

1. Газовый хроматограф HP5890 серии II с масс-селективным детектором HP5972A. Капиллярная кварцевая колонка HP-5MS 30м\*0,25 мм.
2. Набор пипеток -дозаторов.
3. Термошкаф или термоблок с температурой не ниже 100°C.
4. Аппарат для встряхивания АБУ-6с или аналогичный.
5. Центрифуга на 3000-5000 об/мин.
6. Компрессор воздушный KB-1 или подобный.
7. Весы аналитические ВЛР-200 или аналогичные по классу точности.
8. Бытовой холодильник с морозильным отделением.
9. Стакан из тефлона объёмом 250 мл.

### **Реактивы и материалы**

1. Хлороформ квалификации "чх".
2. Бутанол квалификации "хч" или "чда".
3. Гексан квалификации "чх".
4. Этилацетат квалификации "хч" для хроматографии.
5. Тетраборат натрия десятиводный квалификации "хч".
6. Сульфат натрия безводный квалификации "чда".
7. Карбонат калия квалификации "хч".
8. Соляная кислота концентрированная "чда".
9. Едкий натр квалификации "чда".
10. Триэтиламин квалификации "ч".
11. Пропионовый ангидрид фирмы "Ferak Berlin", Германия.
12. Раствор морфина г/х 1% для инъекций.
13. Порошок кодеина основания "фарм".
14. Порошок дионина г/х "фарм".
15. Раствор димедрола 1% для инъекций.
16. Циклизин г/х фирмы "ICN Biomedicals"
17. Растворы других лекарственных и наркотических веществ, которые контролируются в данном методе, но не определяются количественно, могут быть приготовлены из имеющихся в наличии лекарственных форм.

## Инструкция по стандартным операционным процедурам

\* Приготовление 20% раствора тетрабората натрия: К 95 г десятиводного тетрабората натрия, отвешенного на технических весах в тefлоновый стакан, добавляется 155 мл дистиллированной воды и стакан нагревается на электрической плитке до полного растворения реактива. Перед каждым следующим употреблением раствор необходимо нагреть до полного растворения кристаллов (50-60°C).

\* Обезвоживание и очистка триэтиламина: Триэтиламин, поступающий в продажу, содержит, как правило, воду, которая будет мешать этерификации с помощью пропионового ангидрида. Для обезвоживания триэтиламина к нему добавляется прокаленный при 170°C карбонат калия (около 1/10 объема), смесь перемешивается и настаивается около 5 минут. Для контроля обезвоживания в смесь добавляется безводный сульфат меди, который не должен приобретать голубую окраску. Обезвоженный триэтиламин сливается и перегоняется. Хранится плотно закупоренным с небольшим количеством прокаленного карбоната калия.

\* Приготовление 1н раствора соляной кислоты. 42,5 мл концентрированной соляной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 500 мл, тщательно перемешивают.

\* Приготовление 1н раствора едкого натра. 22,5 г едкого натра растворяют в 25 мл дистиллированной воды. Колбу плотно закрывают и оставляют до следующего дня. Прозрачную жидкость осторожно сливают с осадка и разбавляют свежепрокипяченной дистиллированной водой до 500 мл.

\* Приготовление раствора внутренних стандартов: Стандартный раствор дионина (этилморфина г/х) с концентрацией 10 г/л приготавливается растворением порошка дионина 50 мг в 3 мл этанола с добавлением 2 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, подписывается (Этилморфина г/х - 10г/л, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт) и хранится в холодильнике. Стандартный раствор циклизина с концентрацией 1 г/л (в пересчете на основание) готовится растворением 28,5 мг циклизина г/х в 25 мл метанола, подписывается (Циклизин - 1 г/л в MeOH, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт), запаивается в ампулы и хранится в холодильнике. Срок годности растворов 1 год. Навески порошков берутся на аналитических весах с точностью до 0,1 мг, растворитель отмеряется цифровой пипеткой или мерной колбой на 25 мл. Рабочий раствор, состоящий из смеси внутренних стандартов с концентрацией 0,01 г/л этилморфина г/х и 0,04 г/л циклизина приготавливается по мере надобности добавлением 25 мкл стандартного раствора этилморфина г/х (10 г/л) и 1000 мкл циклизина (1г/л) в мерную колбу на 25 мл и заполнением до метки этанолом (метанолом). На этикетке пишется "Смесь В.С. для метода BLOPYPRO" и дата приготовления. Рабочий раствор запаивается в ампулы и хранится в холодильнике не более 1 месяца.

\* Приготовление стандартных растворов анализируемых соединений:

- Исходный раствор морфина г/х с концентрацией 10г/л берется из ампул коммерческого препарата.

- Исходный раствор кодеина с концентрацией 10г/л приготавливается растворением порошка кодеина (основание) 20 мг в 1 мл метанола с добавлением 1 мл 0,1н раствора соляной кислоты, подписывается (Кодеин- 10г/л, дата приготовления и подпись лица, приготовившего стандарт) и хранится в холодильнике до 1 года.

- исходный раствор дифенгидрамина г/х (димедрола) с концентрацией 10 г/л берется из ампул коммерческого препарата.

- Все навески порошка берутся на аналитических весах с точностью до 0,1 мг, растворитель отмеряется цифровой пипеткой.

\*Приготовление рабочих растворов для калибраторов:

Рабочие растворы для калибраторов готовятся из исходных растворов анализируемых соединений (морфина г/х - 10г/л, кодеин - 10 г/л, димедрол -10 г/л). Раствор с содержанием морфина, кодеина и дифенгидрамина по 1 г/л (на основание) готовится добавлением в виалу 113 мкл раствора морфина г/х (10г/л), 100 мкл раствора кодеина (10г/л), 114 мкл раствора димедрола (10г/л) и 675 мкл метанола (этанола). Раствор может храниться в запаянной ампуле или закрытой виале до 1 года. Раствор с содержанием морфина, кодеина и дифенгидрамина по 0,1 г/л готовится добавлением в виалу 100 мкл рабочего раствора с содержанием анализируемых соединений по 1г/л и 900 мкл метанола (этанола). Раствор может храниться в закрытой виале не более месяца. Раствор с содержанием морфина, кодеина и дифенгидрамина по 0,01 г/л готовится добавлением в виалу 10 мкл рабочего раствора с содержанием анализируемых соединений по 1г/л и 990 мкл метанола(этанола). Раствор не хранится и готовится непосредственно перед использованием.

\* Приготовление калибраторов:

Для приготовления калибраторов используют схему, приведенную в таблице 6.

К 2 мл "холостой" крови добавляется соответствующее количество одного из рабочих растворов (по таблице 6). После этого пробы проходят все процедуры пробоподготовки и анализа, предусмотренные методом вместе с анализируемыми образцами. По результатам анализов калибраторов строится калибровочная кривая. Коэффициент корреляции калибровочной кривой должен быть не менее 0,99, а свободный член уравнения для расчета концентрации близок к 0 (не более +0,02), все концентрации калибровочной кривой (кроме ПрО) должны отличаться от целевых не более, чем на 20%. Точка ПрО должна надежно фиксировать анализируемые соединения, в точке "Бланк" анализируемые соединения не должны обнаруживаться.

Таблица 6.

Схема приготовления калибраторов

№ п.п	Название пробы	Калибровочная конц. в крови, нг/мл	Конц. рабочего раствора г/л	Объем рабочего раствора в мкл на 2 мл крови
1	Бланк	0	0	0
2	Точка 1(ПрО)	20,0	0,01	4
3	Точка 2	50,0	0,01	10
4	Точка 3	300,0	0,01	60
5	Точка 4	1000,0	0,1	20
6	Точка 5	2000,0	0,1	40

\* Приготовление и анализ контрольных образцов:

Вместе с серией испытуемых проб крови (15-20 шт.) по одной и той же методике, с использованием одних и тех же реактивов и внутреннего стандарта должны быть проанализированы пробы "контрольной" и "холостой" крови. В качестве "холостой" пробы может быть использована кровь (плазма) людей, не употреблявших длительное время лекарственных и наркотических средств.

Однако, до ее использования в качестве "холостой" она должна быть проанализирована по той же методике, что и испытуемые пробы. "Контрольные" образцы крови готовятся из "холостой" крови заправкой в нее рассчитанных количеств анализируемых соединений. Рабочие растворы анализируемых соединений для приготовления "контрольных" проб должны быть приготовлены из чистых стандартов анализируемых соединений, полученных из других источников, не тех, что использованы для приготовления калибраторов. Если это условие соблюсти нельзя, то растворы должны быть получены, по крайней мере, из другого взвешивания анализируемого вещества или другой ампулы стандарта, не тех, что использованы для приготовления калибраторов. Рабочие растворы для "нижнего" и "верхнего" контролей (по 1 мл) приготавливаются смешением стандартных растворов анализируемых соединений по схеме, приведенной в таблице 7. Для получения контрольных образцов "нижнего" или "верхнего" стандартов необходимо добавить к 2 мл "холостой" крови 10 мкл рабочих растворов "нижнего" или "верхнего" стандарта. При этом в "нижнем" контроле, получается по 50 нг/мл всех контролируемых соединений (кроме клонидина (10 нг/мл), клозапина (200 нг/мл), кетамина, левомепромазина, трамадола ( по 100 нг/мл), а в верхнем по 500 нг/мл (клонидина - 25 нг/мл). Одновременно делается по 10 образцов "нижних" и "верхних" контролей, которые, закрываются крышкой и хранятся в морозильной камере холодильника, там же хранятся и этаноловые рабочие растворы для приготовления "контрольных" образцов крови.

Перед серией анализов проводится анализ "холостой" крови. В "холостом" опыте должен фиксироваться только внутренний стандарт. Этим опытом проверяется отсутствие примесей анализируемых соединений во всем тракте пробоподготовки и анализа. В случае обнаружения в "холостом" опыте анализируемых соединений проводится повторный ГХ анализ или повторная пробоподготовка и анализ "холостой" крови. Только после получения отрицательного результата "холостого" опыта можно анализировать контрольные и исследуемые образцы. В образце нижнего контроля по макрокомандам должны быть визуальны обнаружены все контролируемые вещества (обычно их концентрация в нижнем контроле на уровне терапевтической). Если какое-либо вещество не обнаруживается в образце нижнего контроля, то его характеристики (время удерживания и вид хроматограммы по характеристическим ионам) можно взять из контрольных образцов предыдущей серии, а смесь стандартов для нижнего контроля (см. табл.7) приготовить заново.

Результаты анализа "контрольных" проб хранятся в папке с контрольным экземпляром методики. Все изменения и калибровки должны протоколироваться, и протоколы также хранятся в папке с контрольным экземпляром методики. При расхождении протокольных результатов с истинными более 20 % "контрольные" образцы крови готовятся и анализируются заново. При повторном расхождении более 20 % проводится перекалибровка с повторным приготовлением и анализом всех контрольных и анализируемых проб. Кроме того, в ходе анализа серии образцов, после каждого положительного результата выше 1,0 мкг/мл по морфину, кодеину или димедролу в исследуемом образце необходимо проанализировать "холостую" кровь до получения отрицательного рапорта по анализируемым соединениям во избежание переноса анализируемых соединений из анализа в анализ в шприце и инжекторе газового хроматографа. Соблюдение этих условий анализа позволяет избежать многих ошибок, являющихся источниками ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Таблица 7.

Схема приготовления “контрольных” образцов крови.

Соединение	Концентрация раствора, г/л	Объем раствора для нижнего стандарта, мкл	Объем раствора для верхнего стандарт, мкл
Морфин	0,1	100	-
Морфина г/х	10	-	11,3
Кодеин	0,1	100	-
Кодеин	10	-	10
Димедрол (основ.)	0,1	100	-
Димедрол (г/х)	10	-	11,4
Амитриптилин	1,0	10	100
Атропин	1,0	10	100
Диазепам	1,0	10	100
Имипрамин	5,0	2	20
Кетамин	0,5	40	-
Кетамин(г/х)	50	-	2,2
Клозапин	2,5	16	40
Клонидин	0,1	20	50
Левомепромазин	0,1	200	-
Левомепромазин	4,0	-	25
Промедол	1,0	10	100
МДМА	1,0	10	100
Стрихнин	1,0	10	100
Трамадол	1,0	20	-
Трамадол	10,0	-	10
Тригексифенидил	1,0	10	100
Тримеперидин	1,0	10	100
Хлорпромазин	5,0	2	20
Этанол		320	0

## Приложения

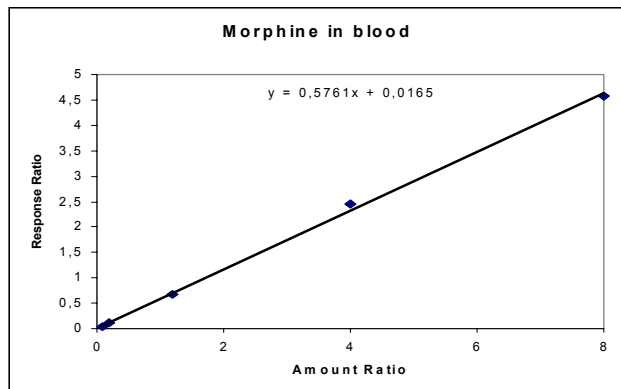


Рис.1. Калибровочная кривая на морфин.

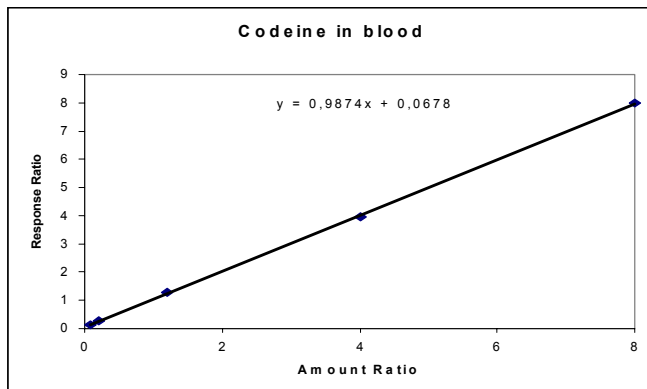


Рис.2. Калибровочная кривая на кодеин.

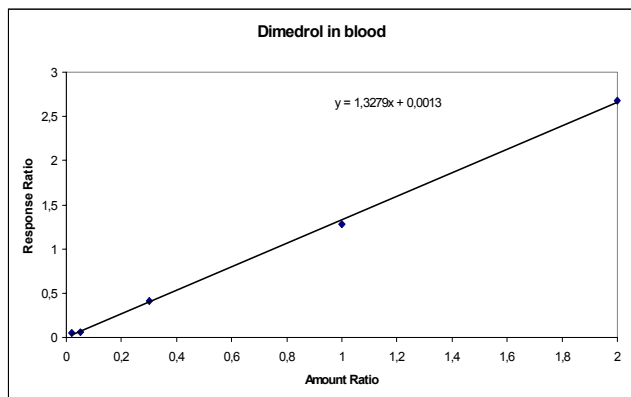


Рис.3. Калибровочная кривая на дифенгидрамин.

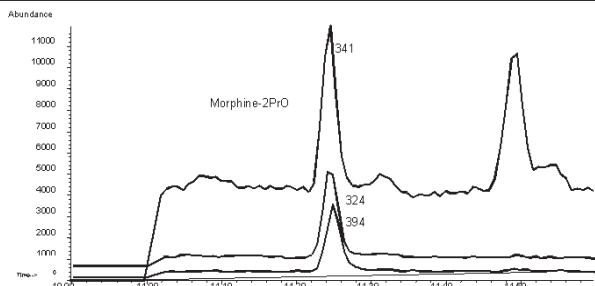


Рис.4. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира морфина (50 нг/мл).

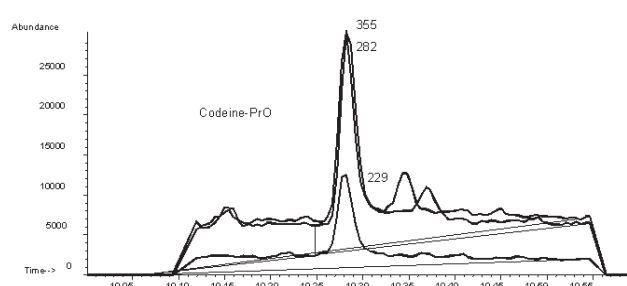


Рис.5. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира кодеина (50 нг/мл).

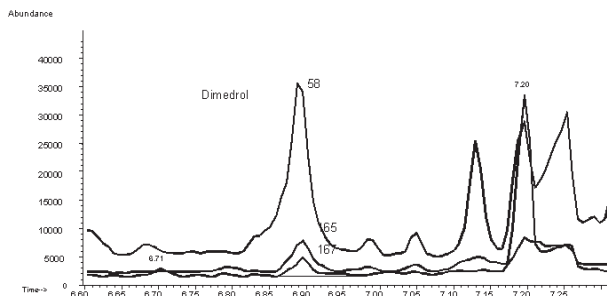


Рис.6. Хроматограмма по характеристическим ионам дифенгидрамина (50 нг/мл).

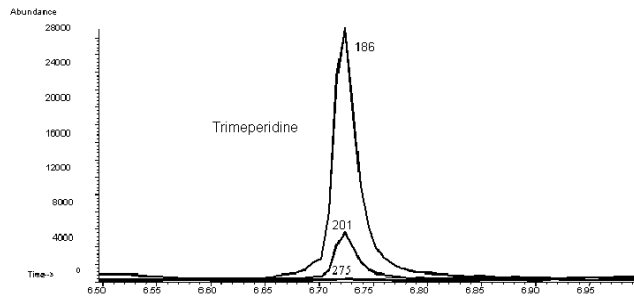


Рис.7. Хроматограмма по характеристическим ионам тримепиридина (50 нг/мл).

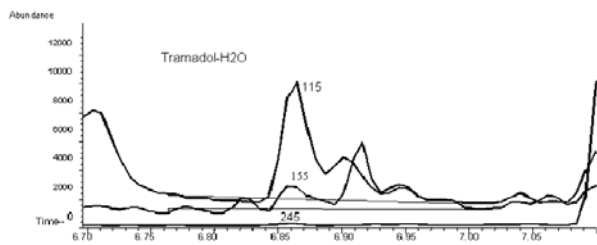


Рис.8. Хроматограмма по характеристическим ионам продукта обезвоживания трамадола .

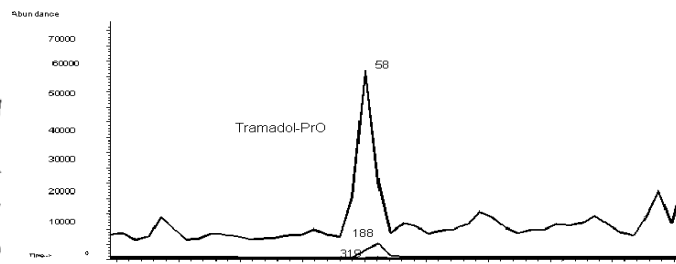


Рис.9. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира трамадола (50нг/мл).

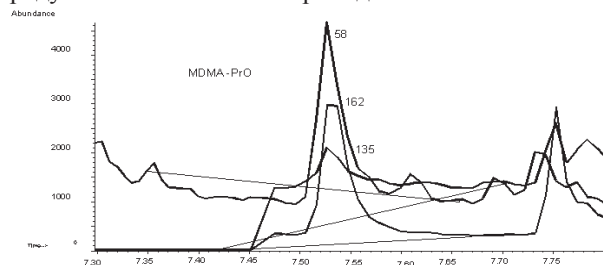


Рис.10. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира МДМА (50 нг/мл).

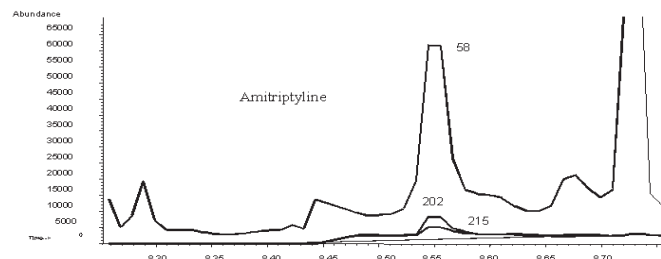


Рис.11. Хроматограмма по характеристическим ионам amitriptyline (50 нг/мл).

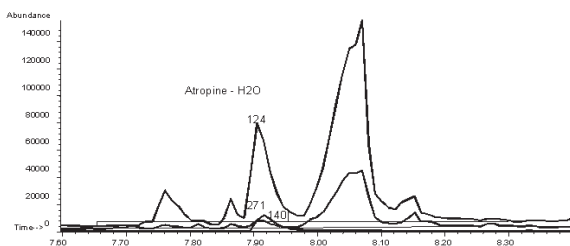


Рис.12. Хроматограмма по характеристическим ионам продукта обезвоживания атропина .

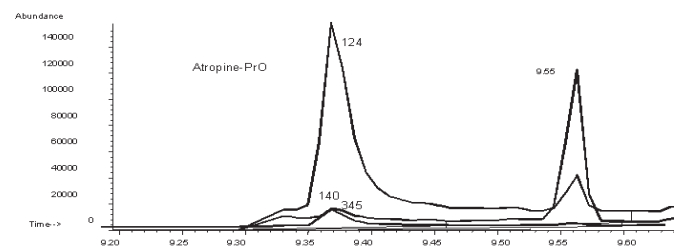


Рис.13. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира атропина (500 нг/мл).

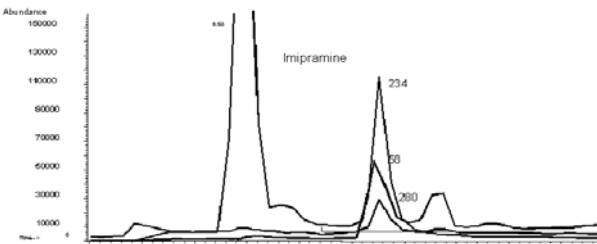


Рис.14. Хроматограмма по характеристическим ионам имипрамина (500 нг/мл).

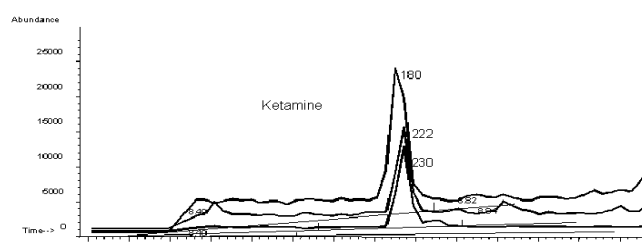


Рис.15. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира кетамина (50 нг/мл).

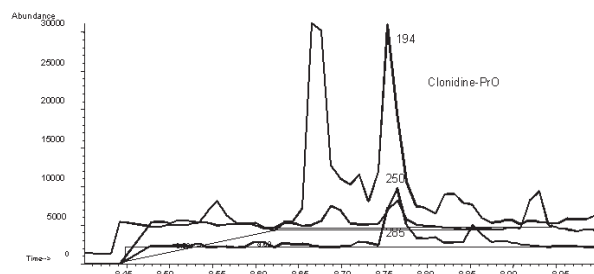


Рис.16. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира клонидина (25 нг/мл).

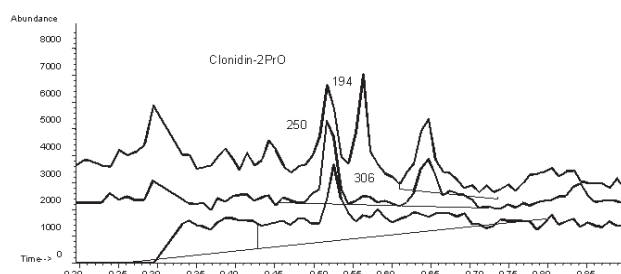


Рис.17. Хроматограмма по характеристическим ионам 2пропионового эфира клонидина (25 нг/мл).



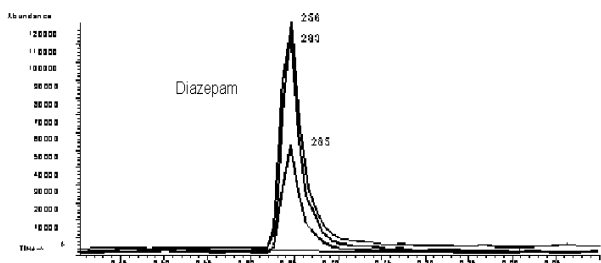


Рис.18. Хроматограмма по характеристическим ионам диазепама (500 нг/мл).

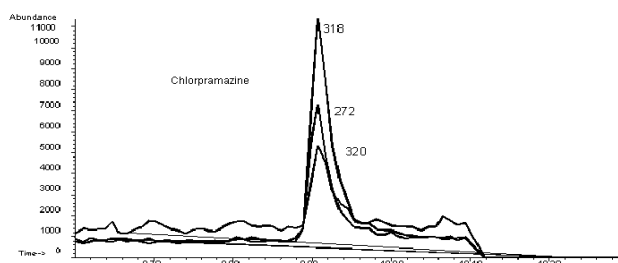


Рис.19. Хроматограмма по характеристическим ионам хлорпромазина (500 нг/мл).

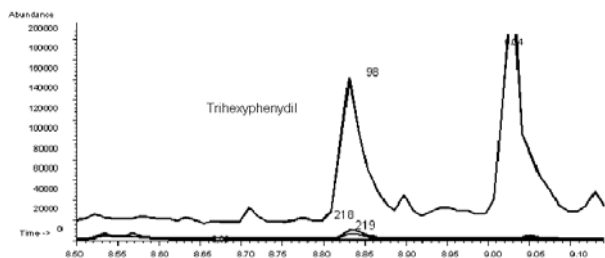


Рис.20. Хроматограмма по характеристическим ионам тригексифенидила(циклодола) (500 нг/мл).

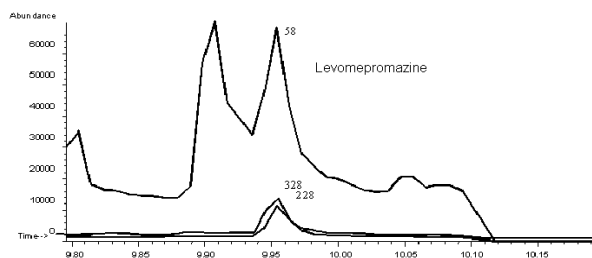


Рис.21. Хроматограмма по характеристическим ионам левомепромазина(тизерцина) (500 нг/мл).

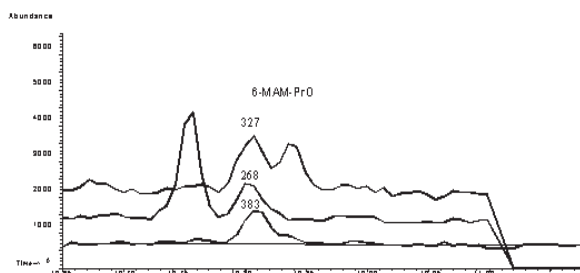


Рис.22. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира 6-МAM.

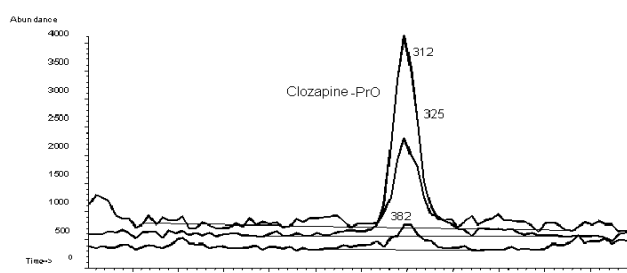


Рис.23. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира клозапина (200 нг/мл).

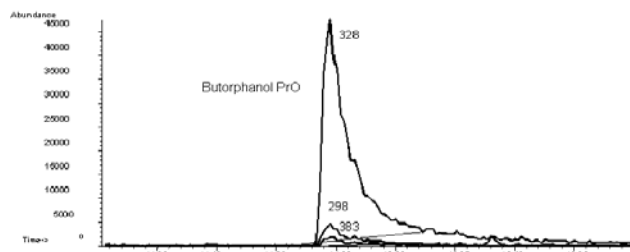


Рис.24. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира буторфанола (500 нг/мл)

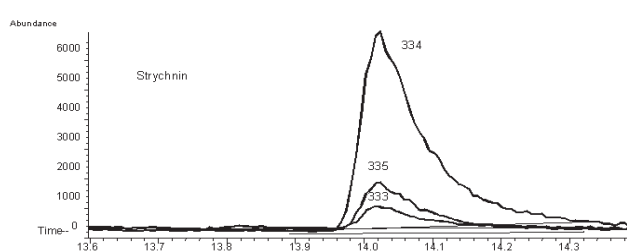


Рис.25. Хроматограмма по характеристическим ионам стрихнина (500нг/мл).

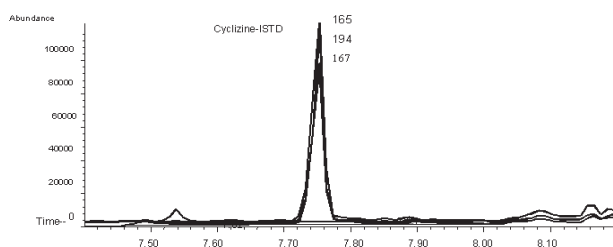


Рис.26. Хроматограмма по характеристическим ионам внутреннего стандарта(В.С.) -циклизина (1000 нг/мл).

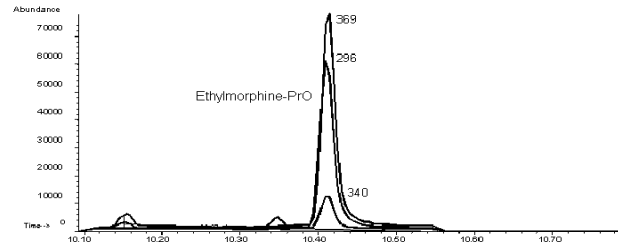


Рис.27. Хроматограмма по характеристическим ионам пропионового эфира В.С. этилморфина (250 нг/мл).



**Макрокоманды для интегрирования и поиска пиков по характеристическим ионам на хроматограммах в методе BLOPYPRO**

```

name pro !
local thigh
file
tic ,ro
format merged
initthresh 10
tlow=6.5
thigh=7.5
chr tlow:thigh,58,165,167
integrate x,tlow:thigh
dr 5
IN1
    annotate 5,0,ii,t,"Dimedrol"
exc x,r1
tlow=7.4
thigh=8.2
chr tlow:thigh,165,194,167
integrate x,tlow:thigh
dr 6
IN1
    annotate 6,0,ii,t,"Cyclizine-ISTD"
exc x,r2
tlow=9.2
thigh=10.1
chr tlow:thigh,124,140,345
integrate x,tlow:thigh
dr 7
IN1
    annotate 7,0,ii,t,"Atropine-PrO"
exc x,r3
tlow=7.6
thigh=8.4
chr tlow:thigh,124,140,271
integrate x,tlow:thigh
dr 8
IN1
    annotate 8,0,ii,t,"Atropine - H2O"
exc x,r4
tlow=10.0
thigh=10.6
chr tlow:thigh,355,282,229
integrate x,tlow:thigh
dr 9
IN1
    annotate 9,0,ii,t,"Codeine-PrO"
exc x,r5
tlow=10.1
thigh=10.8
chr tlow:thigh,369,296,340
integrate x,tlow:thigh
dr 10
IN1
    annotate 10,0,ii,t,"Ethylmorphine-PrO"
exc x,r6
tlow=10.9
thigh=11.6
chr tlow:thigh,341,397,324
integrate x,tlow:thigh
dr 11
IN1
    annotate 11,0,ii,t,"Morphine-2PrO"
exc x,r7
tlow=8.2
thigh=8.8
chr tlow:thigh,58,202,215
integrate x,tlow:thigh
dr 12

```

```

IN1
    annotate 12,0,ii,t,"Amitriptyline"
exc x,r8
tlow=10.6
thigh=11.1
chr tlow:thigh,327,268,383
integrate x,tlow:thigh
dr 13
IN1
    annotate 13,0,ii,t,"6-MAM-PrO"
exc x,r9
tlow=7.3
thigh=7.8
chr tlow:thigh, 58,162,135
integrate x,tlow:thigh
dr 14
IN1
    annotate 14,0,ii,t,"MDMA -PrO"
tlow=13.6
thigh=14.4
chr tlow:thigh,334,335,333
integrate x,tlow:thigh
dr 15
IN1
    annotate 15,0,ii,t,"Strychnin"
tlow=9.4
thigh=10.2
chr tlow:thigh,283,256,285
integrate x,tlow:thigh
dr 16
IN1
    annotate 16,0,ii,t,"Diazepam"
return
name pro2 !
local thigh
file
tic ,ro
format merged
initthresh 10
tlow=6.5
thigh=7
chr tlow:thigh, 186,201,275
integrate x,tlow:thigh
dr 5
IN1
    annotate 5,0,ii,t,"Trimeperidine"
exc x,r1
tlow=9.9
thigh=10.4
chr tlow:thigh,58,328,228
integrate x,tlow:thigh
dr 6
IN1
    annotate 6,0,ii,t,"Levomepromazine"
exc x,r2
tlow=11.5
thigh=12.1
chr tlow:thigh,312,325,382
integrate x,tlow:thigh
dr 7
IN1
    annotate 7,0,ii,t,"Clozapine-PrO"
exc x,r3
tlow=8.4
thigh=9.1
chr tlow:thigh,194,250,285
integrate x,tlow:thigh
dr 8
IN1
    annotate 8,0,ii,t,"Clonidine-PrO"
exc x,r4

```

```

tlow=9.2
thigh=9.9
chr tlow:thigh,194,250,306
integrate x,tlow:thigh
dr 9
IN1
    annotate 9,0,ii,t,"Clonidin-2PrO"
exc x,r5
tlow=6.7
thigh=7.2
chr tlow:thigh,115,155,245
integrate x,tlow:thigh
dr 10
IN1
    annotate 10,0,ii,t,"Tramadol-H2O"
exc x,r6
tlow=7.8
thigh=8.5
chr tlow:thigh,58,188,319
integrate x,tlow:thigh
dr 11
IN1
    annotate 11,0,ii,t,"Tramadol-PrO"
exc x,r7
tlow=8.2
thigh=9
chr tlow:thigh,58,234,280
integrate x,tlow:thigh
dr 12
IN1
    annotate 12,0,ii,t,"Imipramine"
exc x,r8
tlow=8.4
thigh=9.2
chr tlow:thigh,98,218,219
integrate x,tlow:thigh
dr 13
IN1
    annotate 13,0,ii,t,"Trihexyphenidil"
exc x,r9
tlow=8.3
thigh=9.1
chr tlow:thigh,180,230,222
integrate x,tlow:thigh
dr 14
IN1
    annotate 14,0,ii,t,"Ketamine PrO"
tlow=9.6
thigh=10.3
chr tlow:thigh,318,272,320
integrate x,tlow:thigh
dr 15
IN1
    annotate 15,0,ii,t,"Chlorpromazine"
tlow=11.5
thigh=12.0
chr tlow:thigh,328,298,383
integrate x,tlow:thigh
dr 16
IN1
    annotate 16,0,ii,t,"Butorphanol PrO"
return
name IN1
getscalars ,x[1]
t=0.8*Yhigh
ii=(tlow+0.1)*60000
return

```