

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**
**ANALYTICAL METHODS IN CHEMISTRY
AND CHEMICAL TECHNOLOGY**



ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-17-3-253-267>

УДК 543.544.5.068.7

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Валидация методики количественного определения
наркотических и психотропных веществ в моче
методом СВЭЖХ-МС/МС**

**Н.Б. Савельева¹, Г.В. Ишутенко¹, А.В. Полосин¹, Ф.В. Радус²,
Д.С. Полянский², С.А. Курбаткин², Ю.А. Ефимова², П.В. Постников^{1,✉}**

¹Национальная антидопинговая лаборатория (Институт) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДА МГУ), Москва, 105005 Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Аннотация

Цели. Валидировать и ввести в рутинную практику НАДА МГУ новую, отвечающую требованиям ISO/IEC 17025, методику количественного определения 31 сильнодействующих и наркотических вещества и их метаболитов в моче с использованием быстрого и высокочувствительного метода хромато-масс-спектрометрии.

Методы. Анализ спайкованных с растворами стандартов образцов мочи проводили методом сверхэффективной жидкостной хроматографии–тандемной масс-спектрометрии (СВЭЖХ-МС/МС).

Результаты. В работе установлены диагностические пары прекурсор/ион-продукт и найдены энергии соударения, позволяющие однозначно идентифицировать анализируемые вещества; оптимизированы условия гидролиза при проведении пробоподготовки; определены селективность, линейность, предел качественного определения, предел количественного определения (установлен в рамках договора с фирмой-заказчиком), эффект матрицы и неопределенность измерения. Систематизированные данные приведены в итоговой таблице и сгруппированы по классам определяемых веществ.

Выводы. Представленная методика обладает важными преимуществами – отсутствием сложной и продолжительной пробоподготовки, а также коротким временем метода анализа – около 10 мин, что позволяет существенно снизить трудозатраты, продолжительность и себестоимость анализа. Дополнение новыми определяемыми веществами обеспечит ее универсальность и позволит расширить область применения.

Ключевые слова: СВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС/МС, валидация, количественное определение, наркотические сильнодействующие и психотропные вещества

Для цитирования: Савельева Н.Б., Ишутенко Г.В., Полосин А.В., Радус Ф.В., Полянский Д.С., Курбаткин С.А., Ефимова Ю.А., Постников П.В. Валидация методики количественного определения наркотических и психотропных веществ в моче методом СВЭЖХ-МС/МС. *Тонкие химические технологии.* 2022;17(3):253–267. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-3-253-267>

RESEARCH ARTICLE

Validation of a method for the quantitative determination of narcotic and psychotropic substances in urine by UHPLC–MS/MS

Nadezhda B. Savelieva¹, Grigory V. Ishutenko¹, Andrey V. Polosin¹, Fedor V. Radus², Dmitry S. Polyansky², Sergey A. Kurbatkin², Yulia A. Efimova², Pavel V. Postnikov^{1,✉}

¹National Anti-Doping Laboratory (Institute), M.V. Lomonosov Moscow State University (NADL MSU), Moscow, 105005 Russia

²MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Abstract

Objectives. To validate a new method for the quantitative determination of 31 potent and narcotic substances and their metabolites in urine that meets the requirements of ISO/IEC 17025 using a fast and highly sensitive method of chromato-mass spectrometry with a view to introducing such a method into the routine practice of the National Anti-Doping Laboratory of the Lomonosov Moscow State University (NADL MSU).

Methods. Urine samples soldered with standard solutions were analyzed using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS).

Results. Diagnostic precursor/ion-product pairs and collision energies were established to allow unambiguous identification of the analyzed substances. During sample preparation, hydrolysis conditions were optimized. Selectivity, linearity, limits of qualitative determination, limit of quantitative determination (established under the contract with the customer firm), matrix effect, and measurement uncertainty were defined. Systematized data grouped by classes of analytes are given in the final table.

Conclusions. *The important advantages of the presented technique are the absence of complex and lengthy sample preparation, as well as the short time of the analysis method (about 10 min), which can significantly reduce duration along with labor and analysis costs. The addition of new analytes will ensure the versatility of the technique, as well as expanding its scope.*

Keywords: *UHPLC–MS/MS, GC–MS/MS, validation, quantitation, narcotic potent and psychotropic substances*

For citation: Savelieva N.B., Ishutenko G.V., Polosin A.V., Radus F.V., Polyansky D.S., Kurbatkin S.A., Efimova Yu.A., Postnikov P.V. Validation of a method for the quantitative determination of narcotic and psychotropic substances in urine by UHPLC–MS/MS. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2022;17(3):253–267 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-3-253-267>

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия появление новых наркотических и психотропных веществ приводит к неуклонному росту злоупотреблений ими и приобретает масштабы глобальной проблемы. Согласно информации, представленной Международным комитетом по контролю за наркотиками Организации Объединенных наций за 2020 г.¹, несмотря на пандемию COVID-19, которая создала беспрецедентные проблемы для поставок контролируемых лекарственных средств и систем здравоохранения всех стран мира в целом, количество изъятых сильнодействующих веществ остается на стабильно высоком уровне. Увеличилось число электронных торговых площадок в Интернете и даркнете. Зашифрованные защищенные приложения и социальные сети стали играть заметную роль в поиске таких субстанций на потребительском уровне. Ввиду этого актуальность химико-токсикологического анализа и контроля за приемом сильнодействующих веществ существенно возросла. В результате активного употребления наркотических

средств и психотропных веществ, неуклонно растет число лиц с наркотической зависимостью, увеличивается количество тяжелых интоксикаций, приводящих к летальному исходу [1].

В связи с этим, одной из актуальнейших и значимых задач современного токсикологического анализа является разработка экспрессных, новых, точных и совершенствованные уже применяемых методик обнаружения контролируемых веществ и их метаболитов в объектах биологического происхождения, а также их валидация и внедрение в повседневную (рутинную) практику лабораторий.

На сегодняшний момент хроматографические методы определения в сочетании с масс-спектрометрией широко применяются в различных химико-токсикологических исследованиях, обеспечивая высокие показатели селективности и чувствительности [2–4]. Ранее для рутинного анализа в основном использовали методы газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС/МС), однако пробоподготовка занимала много времени, включая применение стадии дополнительной очистки, этапы экстракции и дериватизации для малолетучих органических соединений. По этой причине наиболее привлекательными методами для проведения скринингового анализа на наличие наркотических, сильнодействующих и психотропных веществ стали методы жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС) [5].

Ранее во ФГУП «Антидопинговый центр» (предшественник Национальной антидопинговой лаборатории Московского государственного университета (НАДЛ МГУ) им. М.В. Ломоносова) была введена в действие методика токсикологического

¹ Доклад Международного комитета по контролю над наркотиками за 2020 год. Организация Объединенных Наций: Международный комитет по контролю над наркотиками, Вена; 2021. 167 с. URL: https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2020/Annual_Report/E_INCB_2020_1_rus.pdf (Дата обращения 10.02.2022 г.) [Report of the International Narcotics Control Boards (INCB) for 2020. United Nations: International Narcotics Control Board). Vein; 2021. 167 p. URL: https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2020/Annual_Report/E_INCB_2020_1_rus.pdf (Accessed February 10, 2022).]

мониторинга образцов мочи для выявления классов опиатов, стимуляторов, каннабиноидов, барбитуратов и бензодиазепинов. Критерии Всемирного Антидопингового Агентства (ВАДА) для анализа проб мочи были взяты за основу для проведения валидации методики из технических документов TD_IDCR и TD_DL тех лет^{2,3}. Скрининговый анализ и процедуры подтверждения для большинства соединений выполняли методами СВЭЖХ-МС/МС, однако часть веществ и их метаболитов определяли методом ГХ-МС/МС.

С целью унификации анализа определяемых веществ методом СВЭЖХ-МС/МС и приведения методики в соответствие с новыми нормативными документами⁴, в 2020 г. в Лаборатории была проведена ревалидация методики количественного определения веществ, перечисленных в табл. 1. В результате была оптимизирована пробоподготовка, а хромато-масс-спектрометрические параметры сгруппированы по классам определяемых соединений. Соответствие валидации методики требованиям новой версии ISO/IEC 17025 было подтверждено органом по аккредитации Ассоциацией Аналитических Центров «Аналитика»⁵.

Выполненное нами исследование было направлено на разработку экспрессной и высокоселективной методики количественного определения 31 вещества и их метаболитов, входящих в группу токсикологического мониторинга.

Выполнение химико-токсикологического тестирования сотрудников предприятий, задействованных в работах, требующих повышенного внимания, или на сменных круглосуточных работах, проводили в соответствии с условиями договора, заключенного с фирмой-заказчиком. Перечень определяемых соединений приведен в табл. 1.

² WADA Technical Document – TD2021IDCR. 2021. URL: <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2021idcr> (Дата обращения 11.02.2022 г. / Accessed February 11, 2022).

³ WADA Technical Document – TD2021IDL. 2021. URL: <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2021idl> (Дата обращения 11.02.2022 г. / Accessed February 11, 2022).

⁴ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [ISO/IEC 17025-2019. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (in Russ.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732> (Accessed February 11, 2022).]

⁵ Ассоциация аналитических Центров «Аналитика». URL: <https://aac-analitica.ru/akkreditaciya.html> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [Association of Analytical Centers “Analytica.” (in Russ.). URL: <https://aac-analitica.ru/akkreditaciya.html> (Accessed February 11, 2022).]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сертифицированные стандартные образцы

Для проведения экспериментов использовали сертифицированные стандартные образцы с исходной концентрацией 1.0 мг/мл: амфетамин, метилendioксиамфетамин (МДА), метилendioксиэтиламфетамин (МДЭА), метилendioксиметамфетамин (МДМА), метамфетамин, амобарбитал, бутабарбитал, буталбитал, пентабарбитал, секобарбитал, фенобарбитал, алпразолам, клоназепам, лоразепам, мидазолам, оксазепам, нордiazепам, темазепам, триазолам, флуразепам, бензоилэксгонин, гидрокодон, гидроморфон, кодеин, 6-моноацетилморфин, морфин, оксикодон, оксиморфон, пропоксифен, метадон, дельта-9-тетрагидроканнабиол-9-кислота (ТТК) приобретены у LGC (Великобритания).

Внутренние стандарты (Internal Standard, ISTD) с исходной концентрацией 0.01 мг/мл: *d*₅-демоксепаи (ISTD 1), *d*₃-морфин (ISTD 2) и *d*₅-фенобарбитал (ISTD 3), приобретены у Cerilliant (США), бупранолол (ISTD 4) и мефрузид (ISTD 5) приобретены у NMI (Австралия).

Все производители сертифицированных стандартных образцов удовлетворяют требованиям ISO 17034⁶. Производители, не имеющие аккредитации по ISO 17034, документально подтвердили идентичность и чистоту стандартных образцов от компетентных лабораторий, удовлетворяющих требованиям стандарта ISO/IEC 17025, что подтверждено сертификатами анализа.

Реагенты и расходные материалы

Ацетонитрил (*Merck*, Германия), метанол (*Merck*) и муравьиная кислота (*Acros Organics*, Бельгия) были HPLC grade, деионизированная вода для анализа (18.2 мОм) была получена с использованием системы Milli-Q (*Millipore*, США).

Реагенты для пробоподготовки: карбонат калия (чистота не менее 99%), гидрокарбонат калия (чистота не менее 99%), сульфат натрия безводный (чистота не менее 99.5%), диэтиловый эфир (чистота не менее 95%) производства *Sigma-Aldrich* (США); калия дигидрофосфат (чистота не менее 99%), натрия фосфат двухосновный дигидрат (чистота не менее 99%), азид натрия (чистота не менее 99%) производства *Merck* (Германия); β-глюкокоронидаза *Escherichia Coli* K 12 (*Roche Diagnostics*,

⁶ Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 17034-2021 Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200181084> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [ISO 17034-2021 General requirements for the competence of reference material producers. (in Russ.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200181084> (Accessed February 11, 2022).]

Таблица 1. Целевые соединения, определяемые по программе химико-токсикологического исследования в соответствии с требованиями фирмы-заказчика

Table 1. Target compounds determined according to the program of chemico-toxicological analysis in accordance with the requirements of the customer company

Вещества/метаболиты Compounds/Metabolites	Пороговые значения, нг/мл Thresholds, ng/mL
Амфетамин, Метилендиоксиамфетамин (МДА), Метилендиоксиэтиламфетамин (МДЭА), Метилендиоксиметамфетамин (МДМА), Метамфетамин Amphetamine, Methylenedioxyamphetamine (MDA), Methylenedioxymethamphetamine (MDEA), Methylenedioxyamphetamine (MDMA), Methamphetamine	250
Амобарбитал, Бутабарбитал, Буталбитал, Пентабарбитал, Секобарбитал, Фенобарбитал Amobarbital, Butobarbital, Butalbital, Pentobarbital, Secobarbital, Phenobarbital	100
Альпразолам, Клоназепам, Лоразепам, Мидазолам, Нордiazепам, Оксазепам, Темазепам, Триазолам, Флуразепам Alprazolam, Clonazepam, Lorazepam, Midazolam, Nordiazepam, Oxazepam, Temazepam, Triazolam, Flurazepam	100
Бензоилэкгонин Benzoylecgonine	100
Гидрокодон, Гидроморфон, Кодеин, Морфин, Оксикодон, Оксиморфон Hydrocodone, Hydromorphone, Codeine, Morphine, Oxycodone, Oxymorphone	100
6-Моноацетилморфин (6-МAM) 6-Monoacetylmorphine (6-MAM)	10
Метадон, Пропоксифен Methadone, Propoxyphene	200
Дельта-9-Тетрагидроканнабиол-9-кислота (карбокси-ТГК) Delta-9-tetrahydrocannabinol-9-acid (carboxy-THC)	10

Швейцария); картриджи для твердофазной экстракции Oasis® MCX (Waters, США).

Стеклопипетки с завинчивающимися крышками 16 × 125 мм (Pyrex, США), полипропиленовые пипетки объемом 1.5 мл (Eppendorf, Германия), стеклянные флаконы номинальным объемом 2.0 мл (Macherey-Nagel GmbH & Co, Дюрен, Германия), полипропиленовые флаконы 0.2 мл (Agilent Technologies, США), кримпер, декаппер, газоплотные крышки для флаконов.

Образцы для анализа

Образцы мочи для проведения химико-токсикологического анализа были отобраны у добровольцев, каждый из которых предоставил письменное информированное согласие на использование его биологического материала в научных целях, в соответствии с требованиями этического кодекса лаборатории. Проведенные исследования не противоречат Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации⁷.

⁷ Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации. URL: http://acto-russia.org/index.php?option=com_content&task=view&id=21 (Дата обращения 11.02.2022 г.). [Declaration of Helsinki. World Medical Association. URL: http://acto-russia.org/index.php?option=com_content&task=view&id=21 (Accessed February 11, 2022).]

Данные образцы были заранее исследованы на отсутствие определяемых компонентов и использованы в работе как сертифицированный отрицательный контроль мочи (бланковая моча, Blank).

Для каждой группы соединений готовили контрольные образцы: положительный контроль мочи, содержащий количества определяемых соединений на уровне порогового значения (Positive Control Urine, PCU), и содержащий количества определяемых соединений с заданной концентрацией, отличной от порогового значения (LabQC). В качестве матрицы использовали сертифицированный отрицательный контроль мочи (Blank).

Оборудование

Тройной квадрупольный масс-спектрометр «TSQ Vantage» (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, США), в сочетании с жидкостным хроматографом модели UltiMate 3000 (Dionex, Германия) (СВЭЖХ-МС/МС), термостат-инкубатор с программируемой температурой (Binder, Германия), термостат жидкостный низкотемпературный (Grant, Великобритания), твердотельный инкубатор с программируемой температурой (Grant, Великобритания), ротационный перемешиватель

RV-10 (IKA, Германия), вортекс V-1 plus (BioSan, Латвия), настольная центрифуга с горизонтальным ротором Rotina (Hettich, Германия), аналитические весы Discovery DV215CD (Ohaus, США) (точность 5 знаков), автоматические дозаторы переменного объема 10–200 мкл и 100–1000 мкл (Eppendorf, Германия), диспенсер объемом 10 мл (Brand, Германия).

Пробоподготовка

Пробоподготовка включала следующие основные этапы: ферментативный гидролиз, экстракция, удаление растворителя и перерастворение для ввода в СВЭЖХ-МС/МС систему.

Для выполнения пробоподготовки количественного определения целевых соединений брали 12 пробирок с закручивающимися крышками (16 × 125 мм), маркировали их маркерами Cal0 (Blank), Cal1, Cal2, Cal3, Cal4, Cal5, Cal6, PCU в пяти повторах. В первые 7 пробирок добавляли по 1 мл сертифицированного отрицательного контроля мочи (Blank), в пробирки 8–12 по 1 мл образца мочи, содержащую количества определяемых соединений на уровне порогового значения (PCU).

Пробоподготовку образцов мочи для валидации выполняли два независимых специалиста следующим образом. В пробирки с маркировкой Cal0–Cal6 и PCU добавляли по 20 мкл смеси внутренних стандартов ISTD 1–ISTD 3. Далее в каждую пробирку приливали 1 мл буферной смеси для гидролиза (pH 7.4), вортексировали. Затем образцы поместили в термостат-инкубатор с программируемой температурой 57 ± 3 °C на 60 ± 10 мин. После этого пробирки охлаждали до комнатной температуры (25 °C) и добавляли в каждую по 1 мл карбонатного буферного раствора (pH 9–11), 1–2 г сульфата натрия и встряхивали в течение 5–10 с. Далее в каждую пробирку добавляли 5 мл диэтилового эфира, закрывали крышкой и помещали в ротационный перемешиватель на 20 ± 5 мин. Затем пробирки с образцами центрифугировали при 2700–3100 об/мин в течение 3–4 мин; помещали в жидкостный термостат с программируемой заданной температурой (–30 °C) до заморозания водного слоя (5–10 мин). Далее органический слой переносили в пробирки 16 × 125 мм, упаривали досуха в твердотельном нагревателе при 70 °C, к сухому остатку добавляли по 200 мкл раствора (Diluent), содержащего 0.1% раствор муравьиной кислоты в смеси метанол/вода = 5:95, v/v, с добавлением растворов внутренних стандартов (ISTD 4, ISTD 5). Затем каждую пробирку вортексировали в течение 5–10 с, полученные экстракты переносили в полипропиленовые виалы на 0.2 мл, закрывали крышками для виал и ставили на прибор.

Условия инструментального анализа

СВЭЖХ-МС/МС анализ образца проводили при следующих параметрах: аналитическая колонка: Acquity BEH-C18 100 мм, 2.1 мм, толщина пленки 1.7 мкм (Waters, США). Скорость потока подвижной фазы – 0.35 мл/мин. Программа элюирования началась с 0.5 мин изократической стадии при 95% 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в воде (А) и 5% 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в метаноле (В), с последующим линейным увеличением до 95% раствора (В) течение 4.5 мин и последующей выдержке при 95% (В) в течение 2.5 мин. Затем раствор уравнивался до конца анализа в течение 10 мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Детектирование проводили в режиме селективного мониторинга реакций (Selective reaction monitoring, SRM) положительных и отрицательных ионов. Ионный источник с подогревом и электрораспылением (HESI II). Давление газа в камере соударения – 1.5 мТорр (аргон 99.9995%). Температура испарителя – 370 °C, температура капилляра – 350 °C. Напряжение распыления – 4000 В.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

Валидацию метода проводили в соответствии с требованиями, установленными в ISO/IEC 17025⁸, ГОСТ Р 8.795-2012⁹, с руководством по оценке неопределенности измерения ISO/IEC Guide 98-3:2008¹⁰, а также техническими документами TD2021IDCR и TD2021DL WADA.

⁸ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. Межгосударственный стандарт. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [ISO/IEC 17025-2019. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. (in Russ.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200166732> (Accessed February 11, 2022).]

⁹ ГОСТ Р 8.795-2012. Национальный стандарт Российской Федерации. Государственная система обеспечения единства измерений. Методики идентификации химических веществ методом хромато-масс-спектрометрии. Общие требования. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200102300> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [GOST R 8.795-2012. National Standard of Russian Federation. State system for ensuring the uniformity of measurements. Identification of chemicals substance by a chromat-mass spectrometry method. The general requirements. (in Russ.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200102300> (Accessed February 11, 2022).]

¹⁰ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Межгосударственный стандарт. Неопределенность измерения. Руководство по выражению неопределенности измерения (GUM). 2008. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200146871> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement. Part 3. Guide to the expression of uncertainty in measurement. 2008. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200146871> (Accessed February 11, 2022).]

Селективность

Для исследования потенциального мешающего влияния матрицы проводили пробоподготовку сертифицированного отрицательного контроля мочи (Blank) и контрольных образцов мочи с добавлением смеси каждой группы соединений на уровне порогового значения. На полученных масс-хроматограммах определяемых соединений в соответствующих интервалах сканирования времени удерживания (Retention Time, RT) аналитов в пределах ± 0.1 мин должны отсутствовать интерферирующие (мешающие) пики компонентов матрицы с отношением сигнал/шум, превышающим 3:1.

Линейность

Для построения линейной зависимости количественного определения компонентов проводили пробоподготовку серии калибровочных растворов, содержащих компоненты в диапазоне 50–300% (Cal0–Cal6) от пороговых концентраций.

По результатам анализа определяли и строили графические зависимости концентрации от полученного сигнала, линейность калибровочных кривых оценивали с помощью коэффициентов корреляции R^2 , которые должны быть не ниже 0.99.

Предел количественного и качественного определения

Пределу количественного определения (Limit of Quantitation, LOQ) соединения соответствует наименьшая концентрация, укладывающаяся в диапазон линейной зависимости методики. Для получения данного валидационного параметра проводили пробоподготовку сертифицированного отрицательного контроля мочи (Blank) с добавлением наименьшего значащего по концентрации калибровочного раствора.

Предел качественного обнаружения (Limit of Detection, LOD) методики установили ранее при разработке и валидации первичной процедуры анализа путем приготовления серий последовательных разведений растворов в моче с конечной концентрацией определяемых веществ на уровне 10% (и менее) от порогового значения.

Эффект матрицы

С целью оценки влияния компонентов мочи на определение аналита (Matrix effect, ME) проводили исследование контрольных образцов мочи с

добавлением смеси каждой группы соединений на уровне порогового значения и соответствующих растворов тех же аналитов в растворителе с той же концентрацией. Влияние матрицы мочи оценивали по формуле (1):

$$ME, \% = \frac{\text{Площадь пика контрольного образца (PCU)}}{\text{Площадь пика контрольного раствора}} \times 100\%. \quad (1)$$

Значение ME, превышающее 100%, указывало на усиление ионизации, а значение ниже 100% свидетельствовало об подавлении ионизации матрицей образца.

Неопределенность измерения

Определение проводили в соответствии с Руководством по выражению неопределенности измерений (GUM)¹¹, которое устанавливает общие правила для оценки и выражения неопределенности измерений в лабораториях, аккредитованных по ISO/IEC 17025. При оценке неопределенности применяли внутрिलाбораторный подход, основанный на определении промежуточной прецизионности (внутрिलाбораторной воспроизводимости), состоящей из трехкомпонентной модели измерения: суммы измерений среднего значения метода измерения (m), оценки систематической ошибки метода (B) и вклада случайной ошибки (e) (2):

$$y = m + B + e. \quad (2)$$

Объединенную стандартную неопределенность (u_c) рассчитывали как корень суммы квадратов промежуточной прецизионности PCU (u_{prec}), промежуточной прецизионности калибраторов (u_{cal}), неопределенности смещения относительно заданного значения PCU при наличии систематической ошибки (u_{bias}) и неопределенности, учитывающей процесс пробоподготовки аналитов (u_{other}) по формуле (3):

$$u_c = \sqrt{u_{\text{prec}}^2 + u_{\text{cal}}^2 + u_{\text{bias}}^2 + u_{\text{other}}^2}. \quad (3)$$

¹¹ ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008. Межгосударственный стандарт. Неопределенность измерения. Руководство по выражению неопределенности измерения (GUM). 2008. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200146871> (Дата обращения 11.02.2022 г.). [ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement. Part 3. Guide to the expression of uncertainty in measurement. 2008. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200146871> (Accessed February 11, 2022).]

Для оценки неопределенности измерений использовали серию калибровочных растворов для каждой группы соединений и соответствующие положительные контроли мочи, содержащие количества определяемых соединений на уровне порогового значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основная цель настоящей работы состояла в разработке и валидации экспрессного и надежного метода количественного определения целевых соединений в образцах мочи. Были установлены диагностические пары прекурсор/ион-продукт и энергии соударения, позволяющие однозначно идентифицировать анализируемые соединения. В процессе разработки метода для каждого соединения получены оптимальные условия ионизации. Итоговые данные по всему перечню определяемых веществ представлены в табл. 2.

Перед выполнением валидации метода были подобраны условия основных стадий пробоподготовки – гидролиза и экстракции. Были оценены возможности применения кислотного и ферментативного гидролиза для соединений, образующих конъюгаты в процессе метаболизма. Основная часть метаболитов образует производные глюкуроновой кислоты, и лишь в незначительном количестве выделяется в виде сульфатов, ацетатов и некоторых других солей [6]. Для определения большей части веществ при проведении пробоподготовки используют оба типа гидролиза, однако при выборе кислотного гидролиза требуются достаточно агрессивные условия: соляная кислота в высокой концентрации (10N) и продолжительное термостатирование (не менее 30 мин) при высокой температуре (выше 90 °C), что может оказывать негативное влияние на структуры некоторых полярных метаболитов анализируемых соединений (бензодиазепины, ТПК) [7]. Ферментативный гидролиз, в свою очередь, не требует таких условий: используют ферменты бета-глюкуронидазы *E-coli*, добавленные в фосфатный буферный раствор (pH 6.5–7.0) и инкубируют при температуре 57 °C в течение 60 мин [8, 9]. Важным преимуществом ферментативного гидролиза является его высокая специфичность за счет снижения в матрице мочи мешающих пиков, связанных с отщеплением полисахаридных фрагментов молекул, а также предотвращение распада лабильных соединений и исключение применения агрессивных сред (снижение класса опасности). С учетом вышеперечисленных факторов и унификации пробоподготовки для всех соединений, выбор был сделан в пользу ферментативного гидролиза.

В некоторых литературных источниках приводятся данные о том, что по сравнению с жидкостно-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) твердофазная экстракция (ТФЭ) обладает значительным преимуществом, поскольку позволяет получать более чистые элюаты [10], что особенно важно при определении веществ с низкой концентрацией. В процессе выбора условий пробоподготовки было проведено сравнение результатов после проведения ЖЖЭ образцов диэтиловым эфиром и карбонатным буферным раствором (pH 9.5–11) с добавлением сульфата натрия, с результатами ТФЭ картриджами Oasis. В связи с тем, что пороговые значения количественного определения валидируемых соединений значительно превышали LOD (см. табл. 3), существенной разницы в анализе полученных экстрактов не было обнаружено. Поэтому выбор был сделан в пользу ЖЖЭ, что в конечном итоге существенно снизило стоимость и время пробоподготовки анализа.

Селективность

Анализ участков масс-хроматограмм показал, что на полученных масс-хроматограммах определяемых соединений в соответствующих интервалах сканирования времени удерживания RT анализов в пределах ± 0.1 мин отсутствовали интерферирующие пики компонентов матрицы с отношением сигнал/шум, превышающим 3:1.

Линейность

Для каждого определяемого вещества была построена линейная зависимость концентрации серии калибровочных растворов [11, 12], содержащих компоненты в диапазоне 50–300% (Cal0–Cal6) порогового значения концентрации от отношения сигнала определяемого компонента к сигналу соответствующего внутреннего стандарта. На рисунке в качестве примера приведен график линейной калибровочной кривой гидроморфона.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что коэффициенты корреляции R^2 для каждого соединения оказались выше установленного значения 0.99 (минимальное значение составило 0.9918 для 6-МAM и максимальное – 0.9992 для клоназепама и триазолама). Полученные результаты свидетельствуют о линейной зависимости в выбранном диапазоне концентраций (см. табл. 3).

Предел количественного определения

Полученные данные по LOQ и LOD для каждого вещества представлены в табл. 3. Значения LOQ и LOD удовлетворяют требованиям фирмы заказчика (см. табл. 1).

Таблица 2. Хромато-масс-спектрометрические характеристики определяемых веществ
Table 2. Chromato-mass-spectrometric characteristics of analytes

Соединение Compound	RT, мин RT, min	Тип ионизации Type of ionization	Ион-прекурсор, m/z (а.е.м.) Precursor ion, m/z (a.u.m.)	Продукт-ион (энергия соударений), m/z (V) Product ion (collision energy), m/z (V)
Демоксепан- d_5 (ISTD 1) Демоксепан- d_5 (ISTD 1)	3.60	+	292.1	180.1 (22)
				124.1 (37)
Морфин- d_3 (ISTD 2) Morphine- d_3 (ISTD 2)	1.27	+	302.1	199.1 (25)
				128.1 (34)
Фенобарбитал- d_5 (ISTD 3) Phenobarbital- d_5 (ISTD 3)	1.77	–	236.1	193.1 (13), 42.0 (20)
Бупранолол (ISTD 4) Bupranolol (ISTD 4)	4.10	+	272.1	216.1 (15)
				218.1 (15)
Мефрузид (ISTD 5) Mefruside (ISTD 5)	4.28	+	380.9	189.0 (30)
Амфетамин Amphetamine	2.78	+	136.1	119.1 (7)
				91.1 (16)
МДА MDA	2.80	+	180.1	163.1 (10)
				135.1 (20)
МДМА MDMA	2.83	+	194.0	163.1 (12)
				135.1 (21)
МДЭА MDEA	3.00	+	208.1	135.1 (21)
				163.1 (12)
Метамфетамин Methamphetamine	2.85	+	150.1	91.1 (23)
				119.1 (10)
Амобарбитал Amobarbital	3.66	–	225.1	42.1 (25)
				182.1 (10)
Бутабарбитал Butabarbital	4.35	–	201.1	168.1 (13)
				42.1 (20)
Буталбитал Butalbital	2.45	–	223.1	180.2 (10)
				42.1 (25)
Пентабарбитал Pentobarbital	3.52	–	225.1	42.1 (25)
				182.1 (10)
Секобарбитал Secobarbital	4.60	–	237.1	42.1 (25)
				194.1 (10)
Фенобарбитал Phenobarbital	4.04	–	231.1	188.1 (12)
				42.1 (19)
Алпразолам Alprazolam	4.15	+	309.1	205.1 (41)
			311.1	205.1 (40)
Клоназепам Clonazepam	3.75	+	316.1	270.1 (24)
				214.1 (37)

Таблица 2. Окончание
 Table 2. Continued

Соединение Compound	RT, мин RT, min	Тип ионизации Type of ionization	Ион-прекурсор, m/z (а.е.м.) Precursor ion, m/z (a.u.m.)	Продукт-ион (энергия соударений), m/z (V) Product ion (collision energy), m/z (V)
Лоразепам Lorazepam	4.10	+	323.1	277.1 (21)
			321.1	275.1 (21)
Мидазолам Midazolam	2.95	+	326.1	291.1 (26)
			328.1	291.1 (26)
Нордiazепам Nordiazepam	4.37	+	271.1	140.1 (27)
				208.1 (27)
Оксазепам Oxazepam	4.10	+	287.1	241.1 (22)
				289.1
Темазепам Temazepam	4.25	+	301.1	255.1 (29)
				303.1
Триазолам Triazolam	4.14	+	343.1	308.1 (25)
				345.1
Флуразепам Flurazepam	2.90	+	388.1	315.1 (25)
				390.1
Бензоилэжгонин Benzoylecgonine	3.30	+	290.1	168.1 (19)
				105.1 (30)
Гидрокодон Hydrocodone	2.73	+	300.1	128.1 (10)
				199.1 (11)
Гидроморон Hydromorone	1.87	+	286.1	157.1 (11)
				185.1 (20)
Кодеин Codeine	2.58	+	300.1	152.1 (17)
				165.1 (14)
Морфин Morphine	1.36	+	386.1	152.1 (15)
				165.1 (8)
Оксикодон Oxycodone	2.67	+	316.1	241.1 (5)
				256.1 (20)
Оксиморфон Oxycodone	1.54	+	302.1	227.1 (11)
				284.1 (12)
6-МAM	2.76	+	328.1	165.1 (13)
				211.1 (12)
Пропоксифен Propoxyphene	3.40	+	266.1	143.1 (19)
				128.1 (33)
Метадон Methadone	4.40	+	310.1	265.1 (14)
				219.1 (24)
Карбокси-THC Carboxy-THC	5.82	-	343.1	245.2 (31)
				191.2 (39)

Таблица 3. Валидационные характеристики методики
Table 3. Validation characteristics of the methodology

Соединение Compound	LOD, нг/мл LOD, ng/mL	LOQ*, нг/мл LOQ*, ng/mL	Линейность, нг/мл Linearity, ng/mL	R^2 ($n = 10$)	МЕ, %	u_c , %
Амфетамин Amphetamine	0.5	125	125–750	0.9986 ± 0.0008	95.9 ± 5.1	6.5
МДА MDA	2.0	125	125–750	0.9990 ± 0.0004	99.2 ± 4.6	6.2
МДЭА MDEA	0.5	125	125–750	0.9983 ± 0.0012	101.5 ± 2.8	7.3
МДМА MDMA	0.5	125	125–750	0.9986 ± 0.0007	99.8 ± 3.3	7.6
Метамфетамин Methamphetamine	0.5	125	125–750	0.9986 ± 0.0008	101.5 ± 3.9	6.7
Амобарбитал Amobarbital	10	100	100–1000	0.9956 ± 0.0024	86.1 ± 5	8.8
Бутабарбитал Butobarbital	10	100	100–1000	0.9943 ± 0.0020	98.0 ± 5	8.7
Буталбитал Butalbital	10	100	100–1000	0.9950 ± 0.0020	59.2 ± 7	7.3
Пентабарбитал Pentobarbital	10	100	100–1000	0.9952 ± 0.0025	79.4 ± 6	8.6
Секобарбитал Secobarbital	10	100	100–1000	0.9958 ± 0.0021	85.6 ± 8	8.3
Фенобарбитал Phenobarbital	10	50	50–2000	0.9979 ± 0.0014	86.1 ± 5	10.6
Алпразолам Alprazolam	0.5	50	50–300	0.9987 ± 0.0070	94.7 ± 2.4	8.7
Клоназепам Clonazepam	0.5	50	50–300	0.9992 ± 0.0004	95.2 ± 4.6	7.1
Лоразепам Lorazepam	0.5	50	50–300	0.9987 ± 0.0006	106.0 ± 3.7	8.3
Мидазолам Midazolam	0.5	50	50–300	0.9987 ± 0.0005	92.1 ± 3.0	8.1
Оксазепам Oxazepam	0.5	50	50–300	0.9972 ± 0.0025	102.7 ± 4.3	9.8
Нордiazепам Nordiazepam	0.5	50	50–300	0.9990 ± 0.0030	90.8 ± 3.7	7.2
Темазепам Temazepam	0.5	50	50–300	0.9971 ± 0.0016	99.1 ± 4.3	8.2
Триазолам Triazolam	0.5	50	50–300	0.9992 ± 0.0003	90.5 ± 2.1	6.8
Флуразепам Flurazepam	0.5	50	50–300	0.9980 ± 0.0013	100.8 ± 1.9	8.5
Бензоилэкггонин Benzoylecgonine	1.0	50	50–300	0.9989 ± 0.0006	130.0 ± 2.0	5.6
Гидрокодон Hydrocodone	1.0	50	50–300	0.9971 ± 0.0030	105.1 ± 3.0	11.9
Гидроморфон Hydromorphone	2.0	50	50–300	0.9989 ± 0.0003	109.6 ± 3.1	6.9

Таблица 3. Окончание
Table 3. Continued

Соединение Compound	LOD, нг/мл LOD, ng/mL	LOQ*, нг/мл LOQ*, ng/mL	Линейность, нг/мл Linearity, ng/mL	R^2 ($n = 10$)	ME, %	u_c , %
Кодеин Codeine	1.0	50	50–300	0.9968 ± 0.0034	106.9 ± 2.6	12.7
Морфин Morphine	1.0	50	50–300	0.9987 ± 0.0006	100.3 ± 1.0	11.6
Оксикодон Oxycodone	1.0	50	50–300	0.9959 ± 0.0038	100.9 ± 3.0	13.2
Оксиморфон Oxymorphone	2.0	50	50–300	0.9965 ± 0.0024	95.6 ± 2.7	12.1
6-МAM	0.2	5	5–30	0.9918 ± 0.0025	97.5 ± 1.5	16.2
Пропоксифен Propoxyphen	10	100	100–600	0.9985 ± 0.0010	112.2 ± 5.7	7.5
Метадон Methadone	0.5	100	100–600	0.9982 ± 0.0009	99.0 ± 4.5	6.9
Карбокси-ТГК Carboxy-THC	2.0	5	5–200	0.9983 ± 0.0012	95.2 ± 6	19.0

* В соответствии с условиями договора с заказчиком.

* In accordance with the terms of the contract with the customer.

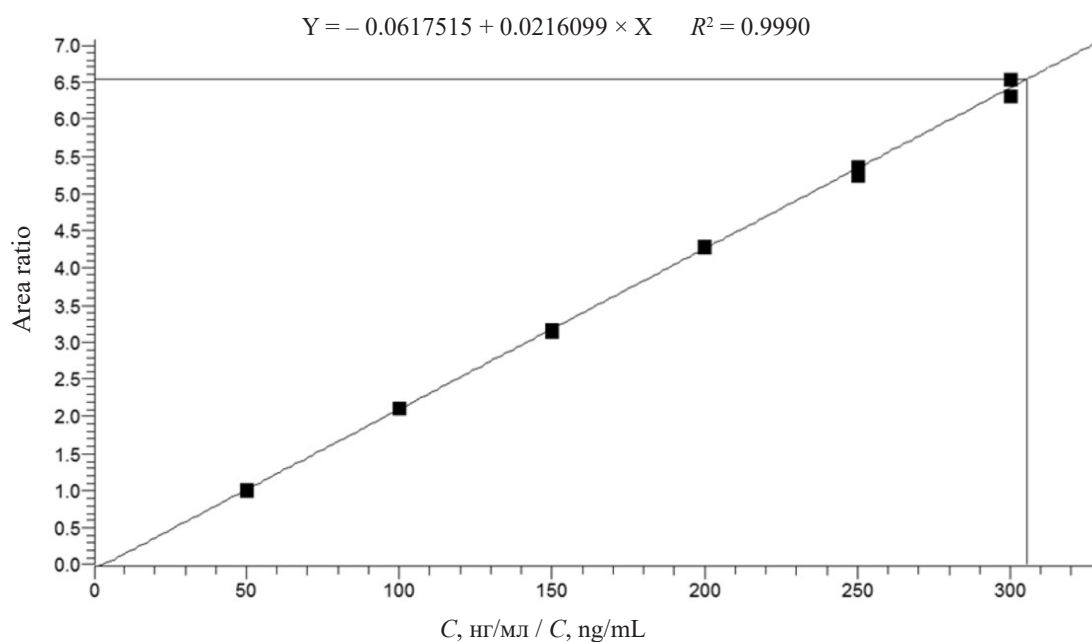


Рисунок. График линейной калибровочной кривой гидроморфона.
Figure. Linear calibration curve plot of hydromorphone.

Эффект матрицы

У большинства анализируемых соединений наблюдали значения ME в диапазоне 85–115%, что, указывает на то, что полученный матричный эффект является незначительным [13]. Минимальное значение ME было получено для буталбитала, $59.2 \pm 7\%$, а максимальное – для бензоилэгонина, $130.0 \pm 2.0\%$. Данные приведены в табл. 3.

Неопределенность измерения

Определение промежуточной прецизионности проводили на основе выборки данных из 5 проб PCU, выполненных двумя специалистами в течение 5 дней ($n = 50$). Каждый результат PCU, в свою очередь, являлся средним значением из трех повторных измерений. Для полученного массива данных проводили оценку на выбросы: определяли

медиану выборки, нижний и верхний квартили, внутренние и внешние границы диапазона по методике, предложенной в ISO/IEC Guide 98-3:2008. В однородной выборке скорректированных (при необходимости) значений образцов PCU определяли среднее значение, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение в условиях воспроизводимости (промежуточной прецизионности, u_{prec}). Промежуточную прецизионность калибровочных растворов (u_{cal}) для каждого аналита вычисляли как корень из суммы квадратов относительного стандартного отклонения уровней калибровочной кривой и точности между заданным и полученным значением концентрации для каждого уровня. Неопределенности смещения относительно заданного значения PCU оценивали при наличии систематической ошибки (u_{bias}). Систематическую погрешность определяли с помощью теста Стьюдента. Неопределенность, учитывающую процесс пробоподготовки аналитов (u_{other}), рассчитывали, как корень из суммы квадратов неопределенностей стандартного образца (согласно сертификату качества), аликвотирования образца мочи автоматическими дозаторами и разбавления образца мочи (при приготовлении растворов).

Значение объединенной неопределенности вычисляли по формуле (3). Максимальное значение неопределенности составило 19%, данные представлены в табл. 3. Данная методика может применяться для количественного определения представленного перечня веществ (см. табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была существенно переработана и валидирована новая, введенная в рутинную практику НАДЛ МГУ методика количественного определения 31 сильнодействующих и наркотических веществ и их метаболитов в моче с использованием быстрого и высокочувствительного СВЭЖХ-МС/МС метода. Методика обладает важными преимуществами – отсутствием сложной и продолжительной пробоподготовки (например, ТФЭ и образование TMS-производных), а также коротким временем метода анализа – около 10 мин, что позволяет существенно снизить трудозатраты, продолжительность и себестоимость анализа. Дополнение новыми определяемыми соединениями обеспечит ее универсальность и позволит расширить область применения без потери чувствительности и селективности при выполнении химико-токсикологического анализа или допинг-контроля.

Усовершенствованная методика ревалидирована в соответствии с требованиями ISO/IEC 17025-2019

и внесена в область аккредитации НАДЛ МГУ. С момента внедрения валидированной методики и до настоящего времени было проанализировано более 750 образцов мочи и выявлено более 30 подтвержденных положительных проб, что обеспечивает высокий уровень детектируемости и чувствительности.

Вклад авторов

Н.Б. Савельева – разработка плана проведения экспериментов, анализ полученных результатов, первичная обработка экспериментальных данных, написание текста статьи;

Г.В. Ишутенко – проведение экспериментальных исследований, научно-техническое сопровождение, анализ полученных результатов, первичная обработка экспериментальных данных, правка финальной версии статьи;

А.В. Полосин – проведение экспериментальных исследований, научно-техническое сопровождение, анализ полученных результатов, правка финальной версии статьи;

Ф.В. Радус – первичная обработка экспериментальных данных;

Д.С. Полянский – проверка и систематизация валидационных параметров данных;

С.А. Курбаткин – первичная обработка экспериментальных данных;

Ю.А. Ефимова – систематизация и обработка полученных результатов, редактирование рукописи, подготовка материалов к публикации;

П.В. Постников – формулирование целей и задач, обсуждение экспериментов и результатов, общее руководство процессом валидации, написание текста статьи, редактирование рукописи, правка финальной версии статьи, подготовка материалов к публикации.

Authors' contributions

N.B. Savelieva – development of a plan for conducting experiments, analysis of the results obtained, primary processing of experimental data, and writing the text of the article;

G.V. Ishutenko – conducting experimental research, scientific and technical support, analysis of the obtained results, primary processing of experimental data, and editing the final version of the article;

A.V. Polosin – conducting experimental studies, scientific and technical support, analysis of the results obtained, and editing the final version of the article;

F.V. Radus – primary processing of experimental data;

D.S. Polyansky – verification and systematization of data validation parameters;

S.A. Kurbatkin – primary processing of experimental data;

Yu.A. Efimova – systematization and processing of the obtained results, editing the manuscript, and preparation of materials for publication;

P.V. Postnikov – formulation of aims and objectives, discussion of experiments and results, general management of the validation process, writing the text of the article, editing the manuscript, editing the final version of the article, and preparing materials for publication.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buser G.L., Gerona R.R., Horowitz B.Z., Vian K.P., Troxell M.L., Hendrickson R.G., Houghton D.C., Rozansky D., Su S.W., Leman R.F. Acute kidney injury associated with smoking synthetic cannabinoid. *Clin. Toxicol.* (Phila). 2014 52(7):664–673. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.932365>
2. Negishi S., Nakazono Y., Iwata Y.T., Kanamori T., Tsujikawa K., Kuwayama K., Inoue H. Differentiation of regioisomeric chloroamphetamine analogs using gas chromatography–chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 2015;33(2):338–347. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0280-y>
3. Maresová V., Chadt J., Prikryl L. Simultaneous determination of amphetamines and amphetamine-derived designer drugs in human urine by GC-MS. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006;27(Suppl. 2):121–124.
4. Choi H., Heo S., Choe S., Yang W., Park Y., Kim E., Lee J. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;405(12):3937–3944. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6560-z>
5. Aszyk J., Kot-Wasik A. The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several “legal highs” products. *Monatsh. Chem.* 2016;147:1407–1414. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1773-z>
6. Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. *Химико-токсикологический анализ психотропных лекарственных препаратов: учебное пособие*. Иркутск: Издательство ИГМУ; 2021. 81 с.
7. Старовойтова М.К., Миначенкова А.С., Крысько М.В., Слустовская Ю.В., Стрелова О.Ю., Кушлин В.Н. Сравнительная характеристика методик ферментативного гидролиза для изолирования токсичных веществ из цельной крови и волос. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2020;63(3):23–29. <https://doi.org/10.17116/sud-med20206303123>
8. Mazzarino M., de la Torre X., Botrè F. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;392(4):681–698. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2292-5>
9. Thevis M., Thomas A., Schänzer W. Current role of LC-MS/MS in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;401(2):405–420. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4859-9>
10. Kim Y., Jeon M., Min H., Son J., Lee J., Kwon O.-S., Kim K.H. Development of a multi-functional concurrent assay using weak cation-exchange solid-phase extraction (WCX-SPE) and reconstitution with a diluted sample aliquot for anti-doping analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018;32(11):897–905. <https://doi.org/10.1002/rcm.8119>
11. Zybin D.I., Seregin A.S., Askretkov A.D., Orlova N.V., Seregin Y.A., Prostyakova A.I., Kapustin D.V. Development and validation of a method for the determination of the specific activity of recombinant monoclonal antibody eculizumab. *Fine Chem. Tech.* 2020;15(2):77–85. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-2-77-85>
12. Du L., Li G., Gong W., Zhu J., Liu L., Zhu L., Liu Z. Establishment and validation of the LC-MS/MS method for the determination of lincomycin in human blood: Application to an allergy case in forensic science. *J. Forensic Leg. Med.* 2021;77:102094. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2020.102094>

REFERENCES

1. Buser G.L., Gerona R.R., Horowitz B.Z., Vian K.P., Troxell M.L., Hendrickson R.G., Houghton D.C., Rozansky D., Su S.W., Leman R.F. Acute kidney injury associated with smoking synthetic cannabinoid. *Clin. Toxicol.* (Phila). 2014 52(7):664–673. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.932365>
2. Negishi S., Nakazono Y., Iwata Y.T., Kanamori T., Tsujikawa K., Kuwayama K., Inoue H. Differentiation of regioisomeric chloroamphetamine analogs using gas chromatography–chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicol.* 2015;33(2):338–347. <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0280-y>
3. Maresová V., Chadt J., Prikryl L. Simultaneous determination of amphetamines and amphetamine-derived designer drugs in human urine by GC-MS. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006;27(Suppl. 2):121–124.
4. Choi H., Heo S., Choe S., Yang W., Park Y., Kim E., Lee J. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;405(12):3937–3944. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6560-z>
5. Aszyk J., Kot-Wasik A. The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several “legal highs” products. *Monatsh. Chem.* 2016;147:1407–1414. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1773-z>
6. Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. *Химико-токсикологический анализ психотропных лекарственных препаратов: учебное пособие* (Chemical-toxicological analysis of psychotropic drugs. Textbook). Irkutsk: ISMU; 2021. 81 p. (in Russ.).
7. Starovoitova M.K., Minachenkova A.S., Krysko M.V., Slustovskaya Yu.V., Strelowa O.Yu., Kuklin V.N. Comparative characteristics of enzymatic hydrolysis methods for isolating toxic substances from whole blood and hair. *Sudebno-Meditsinskaya Ekspertiza*. 2020;63(3):23–29 (in Russ.). <https://doi.org/10.17116/sudmed20206303123>
8. Mazzarino M., de la Torre X., Botrè F. A screening method for the simultaneous detection of glucocorticoids, diuretics, stimulants, anti-oestrogens, beta-adrenergic drugs and anabolic steroids in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;392(4):681–698. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2292-5>
9. Thevis M., Thomas A., Schänzer W. Current role of LC-MS/MS in doping control. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;401(2):405–420. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4859-9>
10. Kim Y., Jeon M., Min H., Son J., Lee J., Kwon O.-S., Kim K.H. Development of a multi-functional concurrent assay using weak cation-exchange solid-phase extraction (WCX-SPE) and reconstitution with a diluted sample aliquot for anti-doping analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018;32(11):897–905. <https://doi.org/10.1002/rcm.8119>
11. Zybin D.I., Seregin A.S., Askretkov A.D., Orlova N.V., Seregin Y.A., Prostyakova A.I., Kapustin D.V. Development and validation of a method for the determination of the specific activity of recombinant monoclonal antibody eculizumab. *Fine Chem. Tech.* 2020;15(2):77–85. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2020-15-2-77-85>
12. Du L., Li G., Gong W., Zhu J., Liu L., Zhu L., Liu Z. Establishment and validation of the LC-MS/MS method for the determination of lincomycin in human blood: Application to an allergy case in forensic science. *J. Forensic Leg. Med.* 2021;77:102094. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2020.102094>

13. Márta Z., Bobály B., Fekete J., Magda B., Imre T., Szabó P.T. Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018;160:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.016>

13. Márta Z., Bobály B., Fekete J., Magda B., Imre T., Szabó P.T. Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018;160:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.016>

Об авторах:

Савельева Надежда Борисовна, главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1). E-mail: nsavelieva@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-3988-6043>

Ишутенко Григорий Владимирович, зам. начальника отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1). E-mail: ishutenko@dopingtest.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5406-2571>

Полосин Андрей Вячеславович, главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1). E-mail: polosin@dopingtest.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0009-7362>

Радус Федор Валерьевич, ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Полянский Дмитрий Сергеевич, ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: polyansky@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Курбаткин Сергей Александрович, ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: kurbatkins@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2984-2178>

Ефимова Юлия Александровна, к.х.н., доцент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Постников Павел Викторович, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский пер., д. 10, стр. 1). E-mail: drpavelpostnikov@gmail.com. SPIN-код РИНЦ 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

About the authors:

Nadezhda B. Savelieva, Chief Specialist of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: nsavelieva@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-3988-6043>

Grigory V. Ishutenko, Deputy Head of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: pathfinder111@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5406-2571>

Andrey V. Polosin, Chief Specialist of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: streanger72@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-0009-7362>

Fedor V. Radus, Assistant, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Dmitry S. Polyansky, Assistant, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: polyansky@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Sergey A. Kurbatkin, Assistant, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: kurbatkins@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-2984-2178>

Yuliya A. Efimova, Cand. Sci. (Chem.), Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Pavel V. Postnikov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: drpavelpostnikov@gmail.com. RSCI SPIN-код 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

Поступила: 09.03.2022; получена после доработки: 11.04.2022; принята к опубликованию: 16.06.2022.

The article was submitted: March 09, 2022; approved after reviewing: April 11, 2022; accepted for publication: June 16, 2022.