

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть

27.09.2010 г.

Регистрационный № 061-0610

**МЕТОДИКА ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПИАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

УЗ «Городской клинический наркологический диспансер» г. Минска

АВТОРЫ:

д-р мед. наук, проф. Камышников В.С., Чубуков А.М., Вергун О.М.,

Шилейко И.Д..

Минск 2010

В современной лабораторной диагностике острых отравлений и состояний опьянения, вызванных употреблением наркотических веществ, должен использоваться весь спектр стандартизированных методик исследования.

Технология химико-токсикологического исследования включает последовательно выполняемые этапы химико-токсикологического анализа (ХТА): предварительную идентификацию групповой принадлежности наркотических средств с использованием методов «сухой» химии, при получении положительного результата использование различных вариантов подготовки проб и проведение подтверждающих исследований с применением методов тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектированием; методов спектрофотометрии, фотометрии с использованием полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов; иммунохимических методов анализа (поляризационный иммунофлуоресцентный анализ, иммунохроматография, иммунотурбидиметрия), высокоэффективной жидкостной хроматографии и др.

Выбор той или иной технологии проведения химико-токсикологического анализа зависит от задач исследования, экономических возможностей и оснащенности лаборатории.

Разработанная и описанная методика предназначена для качественного обнаружения и количественного определения опиных алкалоидов и их производных в биологических жидкостях организма человека.

Основной целью ХТА является идентификация опиатов, вызвавших отравление или состояние опьянения.

Кровь (не менее 20 мл) или сыворотку (не менее 10 мл) отбирают в сухую чистую пробирку без добавления антикоагулянтов и консервантов.

Мочу (не менее 100 мл) собирают в чистую сухую пластиковую или стеклянную посуду без консервантов. Для анализа следует применять только прозрачные образцы, при необходимости мочу следует фильтровать или центрифугировать.

Примеси (отбеливатели или другие окисляющие агенты), попадающие в образцы мочи на преаналитическом этапе, могут давать ошибочные результаты тестирования.

Одним из наиболее распространенных методов предварительного анализа, позволяющим провести скрининговый поиск групповой принадлежности наркотических средств, является иммунохроматографический метод исследования. Тест-полоски на основе моноклональных антител просты в использовании и высокочувствительны. Отличительной особенностью экспресс-тестов является их способность выявлять как нативные соединения (например, морфин, кодеин), так и некоторые метаболиты (например, 3 β -морфинаглукуронид). Вместе с тем не исключается возможность ложноположительного результата из-за наличия кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры. При

тестировании образцов мочи с содержанием на 25% ниже или выше установленного порога обнаружения (cut-off) в некоторых случаях отмечаются нечеткие результаты (категория «неподтвержденных» результатов). Поэтому для исключения ошибок после получения положительного результата при определении опийных алкалоидов в обязательном порядке необходим подтверждающий химико-токсикологический анализ любым другим более специфичным методом.

В случае отрицательного результата при исследовании с помощью экспресс-тестов дальнейший анализ проводить нецелесообразно из-за достаточно высокой чувствительности иммунохимических методов. Технология исследования с использованием тест-полосок на наличие наркотических средств и психотропных веществ описана в инструкции, утвержденной Минздравом Республики Беларусь.

На рис. 1 описан алгоритм химико-токсикологического анализа.

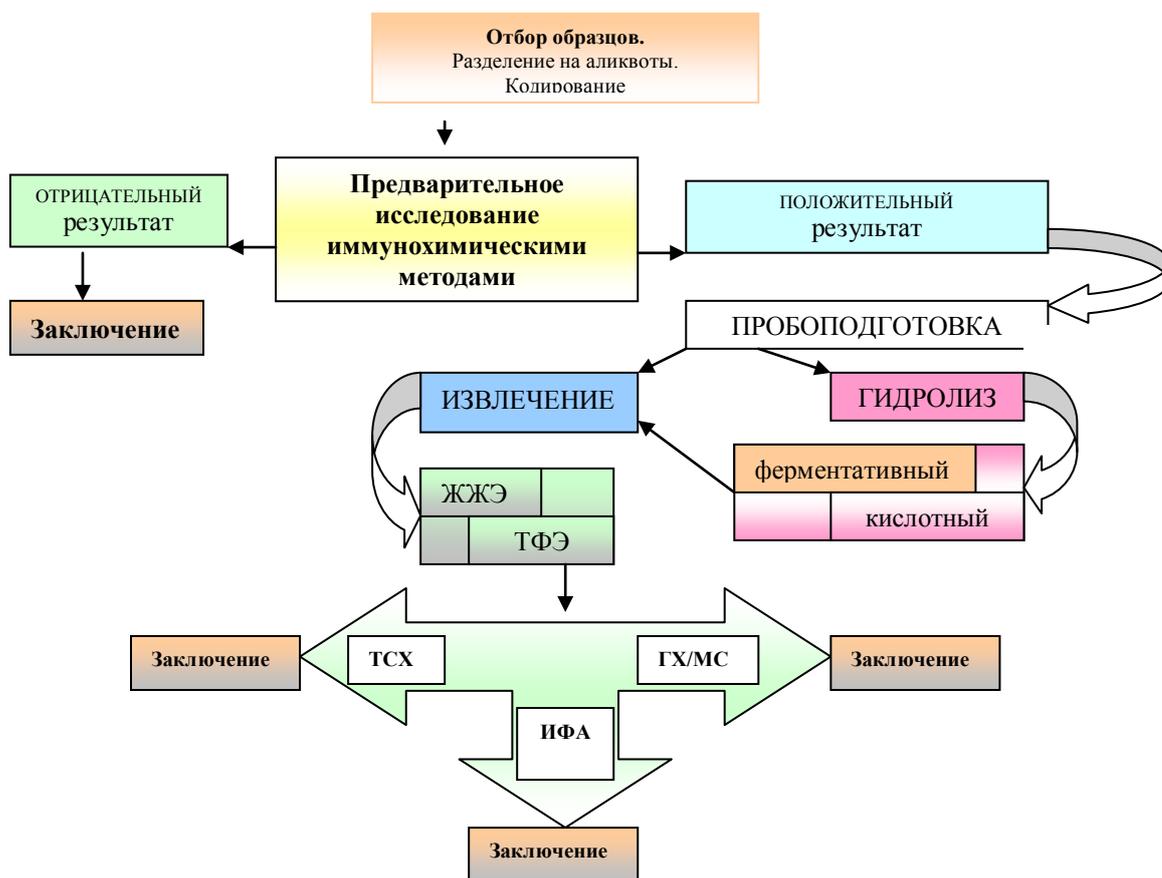


Рис 1. Рекомендуемый алгоритм лабораторно-диагностического исследования при отравлении опиатами

ПОДГОТОВКА ПРОБЫ

Подготовка пробы производится разными способами в зависимости от используемых аналитических методов: жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), твердофазная экстракция (ТФЭ) и гидролиз с последующей экстракцией.

Жидкость-жидкостная экстракция

При наличии достаточного количества образца биологического материала для изолирования опиатов из биологических жидкостей применяют жидкость-жидкостную экстракцию.

Образец биологической жидкости (50 мл) помещают в делительную воронку, подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 8,5–9,0 по универсальному индикатору. Прибавляют 30 мл смеси органических растворителей в различных соотношениях. Можно использовать любую из предлагаемых смесей:

1. Метиленхлорид — изопропиловый спирт (9:1).
2. Хлороформ — н-бутиловый спирт (9:1).
3. Хлороформ — изоамиловый спирт (9:1).

Смесь интенсивно встряхивают многократными инверсиями (не менее 30 раз), после разделения фаз (1–2 мин) отделяют органический слой и пропускают через безводный сульфат натрия в выпарительную чашку*. Для достижения более эффективного концентрирования извлекаемых веществ экстракцию повторяют еще два раза по описанной схеме, органические извлечения объединяют. Объединенные органические извлечения выпаривают досуха в токе теплого воздуха (40 °С). Сухой остаток растворяют в 10 мл хлороформа и аликвоты (точные объемы) полученного извлечения исследуют любыми аналитическими методами.

* В случае образования стойкой эмульсии при проведении экстракции необходимо центрифугировать при 2500 об./мин в течение 3 минут.

Твердофазная экстракция (ТФЭ)

При наличии малого количества биологического объекта, а также для получения извлечения с незначительным содержанием эндогенных соединений используют способ твердофазной экстракции.

Для изолирования опиатов применяют в основном смешанные сорбенты, в которых силанольные группы связаны частично с алкильными углеводородными радикалами средней длины (C8, C18) и частичными катионообменными свойствами.

Этапы ТФЭ:

- Подготовка образца. Исследуемую пробу мочи (3 или 6 мл, в зависимости от емкости колонки) смешивают с 0,1 моль/л фосфатным буфером, pH 6,0–6,1.

- Подготовка колонки. Перед началом работы производят кондиционирование сорбента, для чего через колонку последовательно пропускают метанол 1–2 мл (зависит от емкости колонки), воду (2 мл) и фосфатный буфер pH 6,0 (2 мл) под вакуумом, обеспечивающим скорость потока жидкости около 2 мл/мин.

* Перед введением пробы сорбент не должен высушиваться!

- Введение образца. Пробу биологической жидкости пропускают через колонку при небольшом вакууме со скоростью около 1,5 мл/мин, но не выше 2 мл/мин.

- Высушивание колонки. Сорбент высушивают под вакуумом (при разрежении более 15 мм рт. ст. в течение 5 мин). Далее в колону вводят небольшое количество метанола (менее «мертвого объема» колонки — обычно 50 мкл) или 1 мл гексана с последующим вакуумированием колонки (при разрежении более 15 мм рт. ст. в течение 2 мин).

- Элюирование. Через колонку пропускают 2 мл элюирующей жидкости при небольшом вакууме со скоростью около 1,5 мл/мин, но не выше 2 мл/мин.

Для элюирования опийных алкалоидов обычно применяют следующие органические растворители, содержащие 2% (по объему) 25% раствора гидроксида аммония:

1. Этилацетат — аммиак.
2. Метанол — аммиак.
3. Дихлорметан-ацетон (1:1) — аммиак.
4. Дихлорметан-изопропанол (4:1) — аммиак.
5. Хлороформ-изопропанол (9:1) — аммиак.

Можно использовать 1% раствор уксусной кислоты в смеси метанола и воды (40:60).

** Допустимо пропускание элюента без применения вакуума только под действием силы тяжести.*

- Высушивание элюата. Органические растворители удаляют из элюата упариванием при 40 °С в токе азота или воздуха. Сухой остаток далее исследуют методом газовой хромато-масс-спектрометрии.

В настоящее время применяют регенерируемые колонки, которые можно использовать до 50 раз. Эти колонки после использования восстанавливают промывкой.

- Промывка колонки. Через сорбент пропускают поочередно по 2 мл деионизированной дистиллированной воды, буферного фосфатного раствора с рН 3–4 и 50% водного раствора метанола (возможно использование 1% раствора уксусной кислоты в ацетонитриле).

Гидролиз

Большая часть опийных алкалоидов и их метаболитов в организме находятся в связанном состоянии. Для разрушения этой стойкой связи проводят гидролиз с последующей экстракцией. Данный способ подготовки проб рекомендуется в случае исследования мочи после употребления извлечений из маковой соломки и семян мака с незначительным содержанием алкалоидов опия*. Гидролиз с последующей экстракцией позволяет выделять до 90% кодеина и 93% морфина из биологических объектов.

** При подготовке проб для доказательства употребления героина гидролиз использовать не рекомендуется.*

Кислотный гидролиз проводят в герметично закрытых сосудах, которые помещают в водяную, глицериновую баню или нагревательный блок.

Во флакон помещают 10 мл мочи, добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, флакон закрывают пробкой и фиксируют в специальном патроне, который помещают в кипящую водяную баню. Нагревают 30 мин. Гидролизат охлаждают и переносят в химический стакан емкостью 50 мл.

Для экстракции к охлажденному гидролизату добавляют кристаллический карбонат натрия до $\text{pH} \approx 8,0$. После опадания пены добавляют по каплям насыщенный раствор карбоната натрия до $\text{pH} \approx 9,0$ (по универсальной индикаторной бумажке). Жидкость переносят в экстракционный флакон (БСС 25) и экстрагируют 10 мл смеси метилхлорид-изопропанол (9:1) на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин. Полученное извлечение исследуют методом тонкослойной хроматографии.

Дополнительная очистка требуется для исследования методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Для этого органическое извлечение переносят в делительную воронку и экстрагируют 10 мл фосфатного буферного раствора с $\text{pH} 9,0$. Буферный раствор отделяют и отбрасывают, а органическое извлечение экстрагируют 6 мл 0,2 н раствора ацетата натрия с $\text{pH} 1,0$. Водную фазу отделяют, доводят pH до 9,0 с помощью насыщенного раствора карбоната натрия и вновь экстрагируют 10 мл смеси метилхлорид-изопропанол (9:1) на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 3 мин. Органическое извлечение отделяют и выпаривают в токе теплого воздуха досуха.

ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА (ТСХ)

Краткая характеристика метода

Метод хроматографии в тонком слое сорбента основан на принципе сорбции/десорбции веществ в закрепленном слое сорбента при их перемещении подвижной жидкой фазой. В качестве сорбентов используются силикагели, кремниевая кислота, оксид алюминия и др., которые закрепляются на специальных пластинах (подложках), изготавливаемых из стекла, пластифицированной целлюлозы, алюминиевой фольги и политерефталата (ПТФ). В слой сорбента дополнительно может быть введена флюоресцирующая добавка. ТСХ используется для дополнительной очистки определяемых веществ, их изолирования и обнаружения, а в модифицированном виде и для подтверждающего исследования опиатов (Cut-off 200 мкг/л).

Подготовительные операции

Хроматографическое разделение (проявление или элюирование) производят в герметично закрытых стеклянных камерах. Для обеспечения

герметичности прилегания крышки шлиф обрабатывают вакуумной силиконовой смазкой или очищенным вазелином.

Приготовление хроматографических систем. Отмеривание компонентов смеси производится с помощью пипеток, мерных пробирок или цилиндров (не менее 2-го класса точности). Смешивание компонентов осуществляют в мерных цилиндрах или пробирках со шлифом. (*Перемешивание в хроматографической камере недопустимо!*)

Состав рекомендуемых систем:

1. Этилацетат : этанол (или метанол) : аммиак — 17:2:1.
2. Метанол : аммиак — 100 : 1,5.
3. Метанол : н-бутанол — 6 : 4.
4. Эфир/вода : ацетон : диэтиламин — 85 : 8 : 7.
5. Толуол : ацетон : этанол : аммиак — 45 : 45 : 7 : 3.

Приготовленную систему переносят в хроматографическую камеру, которую закрывают крышкой и не менее 30 мин насыщают парами растворителей. Хроматографические системы могут использоваться не более 4–5 раз.

Для исследования методом ТСХ используются извлечения, полученные с помощью жидкость-жидкостной экстракции или гидролиза с последующей экстракцией.

Нанесение пробы. Две аликвоты (по 2 мл) извлечения, полученного из исследуемого образца после проведения пробоподготовки, наносят с помощью пастеровской пипетки на стартовую линию двух хроматографических пластин в одну точку несколькими порциями, высушивая каждую порцию в токе воздуха, на расстоянии не менее 10 мм от нижнего края и не менее 15 мм от бокового края. Одновременно на каждую пластину в два пятна на расстоянии не менее 10 мм наносят по 10 мкг метчиков морфина и кодеина в виде хлороформных растворов. Пластины высушивают до удаления запаха растворителей и помещают в подготовленную хроматографическую камеру. Фронт растворителей не должен подниматься выше 5 мм от верхнего края пластины.

После проявления пластины извлекают из камеры и высушивают в токе воздуха до полного удаления запаха растворителей.

Идентификация веществ

Одну пластину обрабатывают капельно реактивом Марки, нанося реактив от старта до финиша сначала в зону метчиков, а затем в исследуемую зону. При этом в зоне метчика морфина отмечают пятно, окрашенное в фиолетовый цвет, а в зоне метчика кодеина — в сине-фиолетовый цвет.

Вторую пластину обрабатывают по выбору одним из следующих реактивов: Фреде, Манделина, 5%-м водным раствором хлорного железа. Идентификацию производят по наличию специфической окраски (таблица 1), а также по соответствию длины пробега вещества (R_f) в сравнении с метчиками.

Таблица 1

Окраски веществ

Вещество	Реактив Марки	Реактив Фреде	Реактив Манделина	Раствор хлорного железа
Героин	Фиолетовый	Пурпурно-фиолетовый	Красно-фиолетовый	Голубой → зеленый
Кодеин, β-кодеин	Сине-фиолетовый	Зеленый	Синий → зеленый	Серый
Меконовая кислота	Бледно-розовый	Не окраш.	Серый	Красный
Моноацетилморфин	Пурпурно-фиолетовый	Пурпурно-фиолетовый	Красный → фиолетовый	Серо-голубой
Морфин	Фиолетовый	Фиолетовый	Красный → фиолетовый	Сине-голубой
Наркотин	Сине-фиолетовый → пурпурный	Не окраш.	Оливково-зеленый	Серо-голубой
Орипавин	Фиолетовый	Не окраш.	Красный → фиолетовый	Серо-голубой
Папаверин	Пурпурно-розовый	Розовый	Голубой → зеленый	Серый
Тебаин	Красно-оранжевый	Пурпурно-оранжевый	Оранжевый	Серо-голубой

Предел обнаружения опиатов методом хроматографии в тонком слое составляет 0,5–1 мг/л.

Количественное определение

Для количественной оценки содержания опиатов при проведении ТСХ используется денситометрический метод, основанный на регистрации изменения интенсивности светового луча при прохождении через окрашенное соединение либо отражении от поверхности участка пластины. Денситометр работает как в видимой части, так и в ультрафиолетовом спектре. Применение денситометра позволяет производить количественное определение опийных алкалоидов. При этом не требуется изменения существующих методик ТСХ и имеется возможность расчета любой хроматограммы.

Метод предназначен для расчета хроматограммы после окрашивания хроматографической пластины (размером 100×100 мм) любым неразрушающим реактивом.

Для количественного расчета содержания опиатов строят калибровочный график, для чего на хроматографическую пластину в 6 точек наносят 10, 20, 40, 60, 100 мкг морфина (основания) в виде хлороформного

раствора. В качестве стандарта можно использовать любой другой опийный алкалоид, имеющийся в наличии. Пластины проявляют в одной из указанных выше систем растворителей, затем высушивают до удаления запаха растворителей и обрабатывают реактивом Драгендорфа (в модификации Мунье). Обработанную пластину помещают в планшетный сканер денситометра, работающего в видимой части спектра. Изображение экспонируется видеокамерой на монитор компьютера, записывается и затем обрабатывается по специальной программе. На основании полученных данных строят калибровочный график зависимости оптической плотности отраженного луча (D) от содержания стандартного вещества (морфина) в мкг. Калибровочный график хранится в памяти ПК и используется для расчетов содержания опийных алкалоидов в исследуемых образцах.

Анализ аликвоты (5 мл) извлечения из исследуемого образца проводят по аналогичной схеме. Определение количественного содержания опиатов в исследуемой точке на хроматографической пластине проводится в автоматическом режиме. Расчет содержания вещества в 1 мл исследуемого образца биологического материала производят по следующей формуле:

$$C = \frac{m \cdot V_2}{V_3 \cdot V_1},$$

где C — содержание вещества (мкг/мл);

m — количество вещества в исследуемой точке на хроматографической пластине (мкг);

V_1 — объем пробы исследуемого образца биологического материала (мл);

V_2 — объем хлороформа, взятого для разведения сухого остатка (мл);

V_3 — объем аликвоты, использованной для количественного определения (мл).

Результаты расчета, включая хроматограмму, графики, сводят в протокол, который хранится в памяти ПК, а также распечатывается на принтере.

ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ С МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ (ГХ/МС)

Краткая характеристика метода

Метод представляет собой сочетание газохроматографического разделения веществ с последующим детектированием их масс-спектральных характеристик. Газожидкостная хроматография основана на принципе сорбции веществ неподвижной жидкой фазой и дальнейшей их десорбции потоком газа-носителя. Неподвижная жидкая фаза наносится на твердый носитель (набивные колонки) или на стенки тонкого стеклянного капилляра (капиллярные колонки). Способ масс-спектрометрического детектирования основан на регистрации ионизированных молекул веществ. При этом вычисляется отношение массы заряженных частиц материи к их заряду. Ионизация молекул анализируемого вещества производится в вакууме или

атмосфере газов. Для ионизации применяются различные процессы возбуждения, такие как электронный удар, химическая ионизация, полевая ионизация и др., после чего ионы разделяют и идентифицируют. Разделение ионов основано на их различных траекториях движения в магнитном либо электростатическом полях. Регистрация заряженных частиц осуществляется с помощью фотоумножителей. Обработка сигналов производится с помощью ПК.

Подготовительные операции

Проба готовится, начиная со стадии отбора аликвоты после гидролиза или изолирования. Аликвоту извлечения выпаривают досуха в концентрационной чашке, сухой остаток растворяют в 500 мкл этилацетата и переносят в виалу, которую закрывают крышкой и помещают в автоматический пробоотборник хроматографа, производства Agilent, Thermo Scientific, Termo Finigan, оснащенного масс-спектрометрическим детектором.

Условия разделения

Капиллярная кварцевая колонка DB-5 MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазной пленки 0,25 мкм (5% фенилметилполисилоксана).

Газ носитель гелий, давление на входе в колонку 3 пси; скорость газа через систему очистки 15 мл/мин в течение 2 мин; скорость в системе регулирующего клапана 19,6 мл/мин; скорость потока газа через колонку 1,0 мл/мин.

Ввод пробы в автоматическом режиме; объем пробы 1 мкл, режим ввода с разделением потока 1:4.

Температура инжектора 250 °С, температура колонки изменяется в программируемом режиме: начальная температура 75 °С поддерживается постоянно 2 мин, далее увеличивается со скоростью 15 град/мин до 280 °С и поддерживается постоянной в течение 15 мин. Длительность исследования 30,67 мин.

Температура интерфейса 280 °С, температура квадруполя 150 °С, температура масс-детектора 230 °С.

Схема анализа

Перед исследованием пробы анализируемого вещества необходимо:

1. Проверить «остаточную память» колонки; для этого необходимо произвести анализ растворителя, используемого для приготовления аналитической пробы.

2. Проверить стабильности параметров хроматографической и детектирующей системы; для этого необходимо произвести анализ реконструирующего раствора, содержащего внутренний стандарт. Повторить исследование 2–3 раза с целью определения воспроизводимости времени удерживания и площади пика внутреннего стандарта.

3. Произвести анализ холостой пробы с целью выявления эндогенных

соединений.

Запись хроматограммы начинается с 4-й мин после ввода пробы. Регистрацию производят в режимах Total Ion и Spectrum.

Детектирование ионов проводят при энергии электронной ионизации 70 эВ, режим сканирования ионов от 1,6–800 а.е.м., скорость сканирования 5200 а.е.м./с, с шагом 0,1 а.е.м.

Хроматограмму анализируемой пробы обрабатывают с помощью специализированной компьютерной программы, оснащенной библиотеками масс-спектров PMW Tox 3, Wiley7, NIST 05, Structures NIST 05, Palisade Complete 600K.

Оценка результатов

Идентификацию всех обнаруженных веществ проводят, сравнивая времена удерживания характеристических ионов исследуемых веществ в анализируемой аликвоте извлечения из пробы биологического материала с библиотечными данными. При обнаружении характеристических ионов с достоверностью более 75% дается заключение об обнаружении опийных алкалоидов и их производных.

Предел обнаружения опиатов методом газовой хромато-масс-спектрометрии — 5,0 нг/мл (мкг/л).

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ПФИА)

Краткая характеристика метода

Принцип поляризации флюоресценции основан на совместном протекании процессов облучения молекулы плоскополяризованным светом и флюоресценции. Поляризация обусловлена определенной взаимосвязью между ориентацией молекул, поглощением и испусканием ими света. Применительно к иммуноанализу данный метод основан на конкурентном связывании анализируемого антигена и антигена, меченного флюоресцентной меткой, со специфическими антителами. На степень поляризации флюоресценции влияют различные факторы, основными из которых являются размер (или масса) флюоресцирующей молекулы, температура и вязкость раствора. При постоянстве температуры и вязкости раствора поляризация флюоресценции будет зависеть только от размера флюоресцирующей молекулы. На этом принципе построено изучение реакции взаимодействия антиген — антитело. Метод позволяет идентифицировать групповую принадлежность веществ и количественно определять сумму опийных алкалоидов, в основе структуры которых лежит циклопентанпергидрофенантрен.

Исследование производится с помощью автоматического анализатора TDx/FLx фирмы «АВБОТТ» с использованием наборов реагентов для определения опийных алкалоидов в моче.

Данный метод не требует подготовки исследуемых проб, за исключением случаев, когда в моче содержится большое количество солей, в

таких случаях перед исследованием пробу мочи необходимо центрифугировать.

Калибровка

Калибровка производится для каждого нового набора реагента, но не реже одного раза в месяц, а также после проведения работ по обслуживанию и ремонту аппарата и в случае, если концентрации контрольных растворов не соответствуют диапазонам, указанным в инструкции к набору реагентов.

В карусель для калибровки помещают 14 (15) измерительных кювет и 14 (15) катриджей. В катриджи с помощью автоматической пипетки вносят не менее 60 мкл по две пробы каждого из 6 стандартов и по одной пробе контрольных растворов. Карусель и набор реагентов помещают в прибор и нажимают клавишу «RAN». По окончании процесса оценивают результативность калибровки по соответствию концентрации контрольных растворов диапазону, указанному в инструкции.

Анализ образцов мочи

В карусель для анализа помещают измерительные кюветы и катриджи соответственно количеству исследуемых проб (максимальное количество — 20 шт.). В катриджи вносят не менее 60 мкл каждого из образцов мочи, карусель и набор реагентов помещают в прибор и нажимают клавишу «RAN». Прибор автоматически производит анализ в течение 15–20 мин и выдает распечатку с указанием концентрации анализируемого вещества. В случае высокого содержания веществ в исследуемой пробе, когда в распечатке вместо концентрации указывается «НН», но имеется необходимость точного расчета количественного содержания вещества, выполняют разведение исследуемой мочи и повторяют анализ, а полученный результат умножают на число, соответствующее кратности разведения.

Контроль качества

Контроль качества производят ежедневно перед выполнением анализа, согласно обычной процедуре (см. условия разделения), но с использованием вместо образца мочи контрольных растворов с определенной концентрацией веществ. Отклонения в концентрациях контрольных растворов не должны быть выше или ниже диапазона, указанного в инструкции к набору реагентов.

Условия хранения и применения набора реагентов

Набор реагентов рассчитан на проведение 100 анализов, включая калибровку и контроль качества. Сохранность набора в течение всего срока годности обеспечивается путем хранения его при температуре 2–4 °С.

Предел обнаружения опиатов методом поляризационного иммунофлуоресцентного анализа — 25 нг/мл. Достоверным считается результат более 300 нг/мл.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Средства измерения и вспомогательные устройства

- Вакуумный насос KNF 022AN/18 или аналогичный.
- Весы лабораторные аналитические с погрешностью взвешивания $\pm 0,0001$ г.
- Виалы с завинчивающимся колпачком на 2 мл.
- Воронки делительные, стеклянные, объемом 250 мл.
- Воронки конические, диаметром 5 см.
- Вставки в виалу, стеклянные на 100, 500 мкл.
- Газовая арматура (трубопроводы, редуктор, скобы, штуцеры, хомуты и др.).
- Денситометр сканирующий DM2120 или аналогичный.
- Дозатор пипеточный с переменным объемом 2–20 мкл.
- Дозатор пипеточный с переменным объемом 20–200 мкл.
- Камеры хроматографические, стеклянные, объемом 500 мл.
- Колба мерная 2-5-2 по ГОСТ 1770-74.
- Колба мерная 2а-100-2 по ГОСТ 1770-74.
- Колба мерная 2а-25-2 по ГОСТ 1770-74.
- Миксер ротационный.
- Мониторинговый анализатор Abbott TDx/FLx или аналогичный.
- Патроны с навинчивающейся крышкой.
- Пипетка градуированная 2-1-2-5 по ГОСТ 29227-91.
- Пипетка пастеровская.
- Пробирка пропиленовая 15 мл с закручивающейся крышкой (BD Falcon, кат. №. 352096).
- пробирки типа Эппендорф объемом 500 мкл.
- рН-метр лабораторный.
- Секундомер по ГОСТ 5072-79.
- Стаканы по ГОСТ 23932-90.
- Станция управления и сбора хроматографических данных на базе компьютера Pentium 5.
- Флаконы из темного стекла на 2 мл, Supelco, кат. №. 27532.
- Флаконы экстракционные БСС-25.
- Флаконы экстракционные объемом 12 мл.
- Форвакуумный насос (в комплекте с хромато-масс-спектрометром).
- Холодильник-морозильник по ГОСТ 16317-95.
- Хромато-масс-спектрометр Agilent6890/5975 В или аналогичный.
- Центрифуга с бакет-ротором Элми СМ-6М.
- Цилиндр 1-100-2 по ГОСТ 1770-74.
- Цилиндр 1-10-2 по ГОСТ 1770-74.
- Цилиндр 1-50-2 по ГОСТ 1770-74.
- Чашка выпарительная, фарфоровая № 3.

- Чашка концентрационная, стеклянная, объемом 10 мл.
- Шейкер планетарный.
- Шпатель по ГОСТ 9147-80.

Реактивы и материалы

- Аммиак, раствор — 25%.
- Ацетон, ч.д.а. (ГОСТ 2603-79).
- Ацетонитрил, х.ч.
- Гелий газообразный (сжиженный) очищенный марки «А».
- Дихлорметан (хлороформ), х.ч.
- Диэтиламин, х.ч.
- Железо треххлористое, х.ч..
- Изоамиловый спирт, х.ч.
- Изопропиловый спирт, х.ч.
- Метиловый спирт, х.ч.
- Натрий сернокислый (безв.), х.ч.
- Натрий углекислый, х.ч.
- н-Бутиловый спирт, х.ч.
- Пластины хроматографические, Sorbfil ПТСХ-П-В или аналогичные.
- Пластины хроматографические, Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ или аналогичные.
- Соляная кислота (конц.), х.ч.
- Толуол, х.ч.
- Уксусная кислота (ледяная), х.ч.
- Уксусно-этиловый эфир (этилацетат), х.ч.
- Эфир диэтиловый, х.ч.

Стандартные вещества сравнения

- Морфин, р > 99%, Merck, кат. № 106111;
- Кодеин, р > 99%, Merck, кат. № 102579.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

Приготовление фосфатного буферного раствора с рН 6,1

– взвешивают 7,10 г (с точностью 0,01 г) (0,05 моль) натрия гидрофосфата Na_2HPO_4 помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в воде дистиллированной и доводят уровень жидкости до метки тем же растворителем;

– взвешивают 6,80 г (с точностью 0,01 г) (0,05 моль) калия дигидрофосфата KH_2PO_4 помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в воде дистиллированной и доводят уровень жидкости до метки тем же растворителем;

- 15 мл раствора натрия гидрофосфата Na_2HPO_4 помещают в стакан на 150 мл и приливают 85 мл раствора калия дигидрофосфата KH_2PO_4 ;
- проверяют pH раствора с помощью pH-метра, в случае необходимости корректируют: подливают раствор натрия гидрофосфата Na_2HPO_4 для увеличения pH, раствор калия дигидрофосфата KH_2PO_4 — для уменьшения (срок годности — 12 мес. при хранении в холодильнике).

Приготовление 1% (об.) раствора уксусной кислоты:

- в мерную колбу на 100 мл внести пипеткой 1 мл ледяной уксусной кислоты и довести бидистиллированной водой до метки, тщательно перемешать.

Приготовление 0,1 % раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле:

- в мерную колбу на 100 мл внести автоматической пипеткой 100 мкл муравьиной кислоты и довести ацетонитрилом до метки, тщательно перемешать.

Приготовление 5 мМ водного раствора ацетата аммония (pH 3,5):

- взвесить 0,0385 г (с точностью 0,0001 г) ацетата аммония и растворить в химическом стакане приблизительно в 50 мл воды. Довести pH до 3,5 приливая по каплям 1% раствор уксусной кислоты и контролируя pH раствора с помощью pH-метра, после чего количественно перенести содержимое стакана в мерную колбу на 100 мл, довести водой до метки, тщательно перемешать.

Ацетатный буфер pH до 5,5:

- на технических весах взвешивают $34 \pm 0,1$ г натрия уксуснокислого трехводного и растворяют в 450–550 мл дистиллированной воды. Добавляя по каплям ледяную уксусную кислоту. Срок хранения 1 год.

Реактив Драгендорфа (в модификации Мунье):

- 8 г основного нитрата висмута растворяют в 20 мл азотной кислоты удельного веса 1,18 и смешивают с раствором 27,2 г йодида калия в 30 мл воды; раствор переносят в колбу, закрывают пробкой и на 4–5 дней помещают в темное место; фильтруют через бумажный фильтр. Объем фильтрата доводят водой до 100 мл. К 1 мл полученного раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, объем доводят водой до 10 мл.

Раствор хлорного железа:

- 5 г хлорида окисного железа растворяют в 50 мл воды, объем доводят в мерной колбе водой до 100 мл. Раствор хранится в склянке темного стекла с притертой пробкой.

Реактив Марки:

– к 10 мл концентрированной серной кислоты прибавляют 0,5 мл формалина, жидкость охлаждают. Реактив хранится в склянке с притертой пробкой.

Реактив Манделина:

– 0,01 г аммония ванадиевокислого растворяют в 2 мл концентрированной серной кислоты. Используется свежеприготовленный раствор.

Реактив Фреде:

– 0,5 г аммония молибденовокислого растворяют в 2 мл концентрированной серной кислоты. Используется свежеприготовленный раствор. При хранении реактив приобретает сине-зеленую окраску, что делает его непригодным для использования.