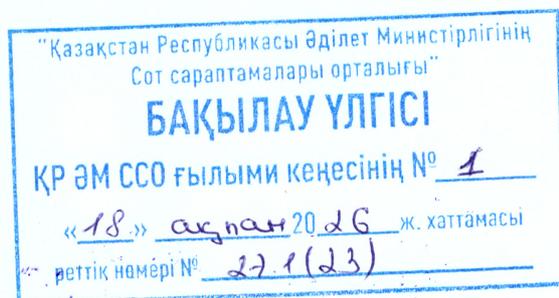


РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ  
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



**МЕТОДИКА**

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ  
ОБРАЗЦОВ СТОЧНЫХ ВОД НА НАЛИЧИЕ НАРКОТИЧЕСКИХ,  
ДРУГИХ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ИХ АНАЛОГОВ И  
МЕТАБОЛИТОВ**

(шифр специальности 27.1)

Астана, 2026г.

## ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика химико-токсикологического исследования образцов сточных вод на наличие наркотических, других психоактивных веществ, их аналогов и метаболитов
2. Шифр специальности методики	27.1(23)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. главный эксперт по химико-токсикологическому виду экспертного исследования, судебно-медицинский эксперт химико-токсикологического исследования ИСЭ по г. Астана Абенова А.К. судебно-медицинский эксперт химико-токсикологического исследования ИСЭ по г. Астана
4. Сущность методики	Выделение целевых веществ из образцов сточных вод и их идентификация масс-спектрометрическим методом в сочетании с методами жидкостной хроматографии. Идентификационные аналитические параметры: время удержания, протонированные молекулярные ионы ( $m/z$ ), спектр продукт-ионов второго порядка ( $MS^2$ ), при необходимости спектр продукт-ионов третьего порядка ( $MS^3$ ).
4.1 Объекты исследования	Образцы сточных вод населенных пунктов и локальных зданий.
4.2 Методы исследования	Масс-спектрометрический метод. Метод высокоэффективной (сверхвысокоэффективной) жидкостной хроматографии.
4.3 Краткое поэтапное описание методики.	Методика исследования включает следующие стадии: 1.Проведение подготовки анализируемых проб. - Выделение (изолирование) основных целевых соединений из объекта исследования (экспертизы) методом твердофазной экстракции. - Выделение (изолирование) из объекта исследования (экспертизы) 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты.

	<p>2. Проведение аналитического исследования анализируемых проб в целях обнаружения и идентификации целевых соединений.</p> <p>3. Оценка результатов.</p>
5. Дата утверждения методики на Ученом Совете ЦСЭ МЮ РК	№ 1 от 18.02.2026
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С.- судебно-медицинский эксперт химико-токсикологического отделения ИСЭ по г.Астана

## **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>5</b>
1. Область применения	6
2. Сущность методики	6
3. Нормативные ссылки	7
4. Используемые сокращения, термины и определения	8
5. Рекомендации по отбору образцов и хранения объектов исследования	9
6. Техническое обеспечение методики	11
7. Реактивы и стандартные образцы	11
8. Расходные материалы	12
9. Оптимальные условия выполнения измерений	13
10. Приготовление рабочих растворов	13
11. Проведение анализа образца	13
12. Оценка результатов	20
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>22</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

Практика анализа сточных вод, может быть использована в дополнение к другим традиционным следственным подходам, направленным на выявление незаконного оборота контролируемых веществ, а так же для эпидемиологического мониторинга потребления наркотических средств, психоактивных и сильнодействующих лекарственных веществ, их аналогов и метаболитов, что может способствовать принятию более целенаправленных мер противодействия распространению наркотиков.

Практическая значимость темы исследования: На этапе досудебного расследования и в судопроизводстве результаты исследования образцов сточных вод, могут быть использованы как одно из возможных доказательств правонарушения в целом, или как фактор, определяющий отдельное его обстоятельство, в случаях необходимости их представления в качестве принимаемых к рассмотрению дела доказательств.

Цель работы: Разработка и внедрение наиболее эффективных методов подготовки анализируемых проб, установление оптимальных условий проведения экспертного исследования с учетом сверхмалых концентраций целевых веществ в образцах сточных вод, а также влияния матричных помех.

Решаемые экспертные задачи: Обнаружение наркотических и других психоактивных веществ, их аналогов и метаболитов в образцах сточных вод.

## 1. Область применения

Судебная химико-токсикологическая экспертиза, химико-токсикологическое исследование.

Целевые компоненты: полярные и неполярные кислотные, основные и нейтральные наркотические и другие психоактивные соединения, их аналоги и метаболиты. *В качестве маркеров эффективности методов подготовки анализируемых проб, и используемого аналитического процесса, могут служить продукты наиболее традиционных компонентов мочи (кофеина и его метаболитов, никотина и его метаболита котинина).*

Чувствительность методики (при использовании описанных процедур подготовки образца) от 5 нанограмм целевого соединения в одном литре образца.

*Примечание: воспроизводимость результатов выполняется при условии использования указанных в методике концентрирующих патронов (соответствующих производителей продукта) и соответствия их технических характеристик, соблюдения требований к чистоте используемых реагентов и растворителей, указанных в разделе «Используемые реагенты и растворители, расходные материалы», а также основных условий проведения аналитического исследования. Любые изменения влияют на результаты экспертного исследования, вплоть до «ложноотрицательного»*

## 2. Сущность методики

Проведение двух этапной подготовки анализируемых проб направленных на выделение целевых соединений из образцов сточных вод, концентрирование и восстановление анализируемой пробы.

Первый этап: выделение из образца полярных и неполярных кислотных, основных и нейтральных соединений унифицированным методом.

Второй этап: выделение из образца гидрофобных соединений селективным методом, где основным целевым компонентом является 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты, основной метаболит дельта-9-тетрагидроканнабинола.

Проведение масс-спектрального исследования с использованием комбинированного аналитического процесса: масс-спектрометрический метод в режиме положительных и отрицательных ионов в сочетании с высокоэффективной (сверхвысокоэффективной) жидкостной хроматографией.

Принцип жидкостной хроматографии состоит в разделении соединений в анализируемой пробе, основанном на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна.

Принцип масс-спектрального исследования анализируемой пробы, основан на ионизации атомов и молекул входящих в её состав и регистрации спектра масс образовавшихся ионов. Целевые соединения в образце идентифицируются путём сопоставления известных масс целевых соединений с идентифицированными массами или по характерному рисунку фрагментации. Основой для измерения служит ионизация компонентов, позволяющая физически различать компоненты на основе характеризующего их отношения массы к заряду и, измеряя интенсивность ионного тока, производить отдельный подсчёт доли каждого из компонентов (получать масс-спектр вещества).

Описаны условия для четырёх вариантов масс-спектрометрического детектирования: трехмерной ионной ловушки (IT); масс-спектрометров высокого разрешения типа квадруполь-орбитальная ловушка (англ. Orbitrap, орбитальная ионная ловушка); тандемной трехквадрупольной масс-спектрометрии (Triple quadrupole mass spectrometer (TQMS)); квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения (Quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QToF-MS)).

Во всех указанных типах масс-спектрометров вещества ионизируются электрораспылением с образованием протонированных молекулярных ионов. Основной ион в спектре имеет максимальную интенсивность, как правило, это наиболее стабильная часть (фрагмент) молекулярного иона. Фрагмент (фрагментарный ион) это ион который образовался при распаде молекулярного иона в результате разрыва связей в структуре соединения.

Принцип фрагментации и сканирования ионов, оценочные показатели идентификации зависят от типа используемого аналитического оборудования.

Образцы анализируются как в положительном, так и в отрицательном режиме регистрации ионов. POSITIV-положительная ионизация, NEGATIV-отрицательная ионизация.

Идентификация достигается с помощью сведений о фрагментарных ионах по библиотекам спектров, которые должны содержать не менее трёх идентификационных показателей для целевых соединений.

### **3. Нормативные ссылки**

В настоящей методике использованы нормативные ссылки на следующие документы.

3.1 Приказ Министра юстиции Республики Казахстан № 484 «Об утверждении Правил организации и производства судебных экспертиз и исследований в органах судебной экспертизы» от 27 апреля 2017 года

3.2 Национальный стандарт Республики Казахстан 01.040.01 СТ РК 3805-2022 «Судебное химико-токсикологическое исследование. Термины и определения»

3.3 Стандартные операционные процедуры «Общие требования по производству судебных химико-токсикологических экспертиз (исследований)», 2016 год.

#### 4. Используемые сокращения, термины и определения

ТФЭ (*SPE - Solid-phase extraction*) твердофазная экстракция – метод подготовки проб, основанный на процессах распределения вещества между фазами в результате сорбционных или ионообменных взаимодействий.

THC (*tetrahydrocannabinol*), ТГК – тетрагидроканнабинол

THC-COOH – метаболит ТГК, 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты.

HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) - гидрофильно-липофильный баланс  
СВЭЖХ (*UHPLC -ultra-high performance liquid chromatography*)-  
сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ (*HPLC - high performance liquid chromatography*)-  
высокоэффективная жидкостная хроматография.

RT (*Retention Time*) - время удерживания: идентификационный аналитический сигнал, показатель времени, измеряемый при проведении хроматографических методов (газовой и (или) жидкостной) в химико-токсикологическом анализе.

ESI (*Electrospray ionization*) - ионизация электрораспылением

CE (*Collision Energy*) – энергия ячейки соударений, ед.изм (eV).

m/z - отношение массы к заряду

Концентрирующий картридж - картриджи (сорбционные патроны для ТФЭ) в виде шприца, внутри которых между двумя пористыми пластинами - фритами помещен определенный сорбент.

Кондиционирование (активация, уравнивание) в ТФЭ - процесс, проводимый перед экстракцией пробы, для смачивания и активации сорбента, чтобы функциональные группы сорбента могли взаимодействовать с аналитом.

Промывка сорбента в ТФЭ - процесс удаления нежелательных соединений (ионов) из сорбента.

Загрузка пробы в ТФЭ - количественный перевод образца в концентрирующий картридж.

Щелочной гидролиз - это реакция расщепления органического соединения водой в присутствии щелочей.

Элюат – фильтрат, вытекающий из хроматографической колонки

Элюирование целевых компонентов в ТФЭ – процесс смыва с сорбента концентрирующего картриджа небольшим объемом раствора, который десорбирует целевые компоненты.

## 5. Рекомендации по отбору и хранению образцов

Места отбора проб и периодичность отбора устанавливаются в зависимости от цели досудебных и (или) судебно-следственных действий или программ эпидемиологического мониторинга.

При выборе периодичности и (или) времени забора образцов, необходимо учитывать суточные колебания состава сточных вод, связанных с различными моделями экскреции человека, а также с внешними факторами, такими как осадки. Рекомендуется проводить забор образцов минимизирующих влияние погодных условий.

Забор образцов: Анализ объектов, представляющих интерес для исследования (аналитов) в сточных водах, наиболее точно проводится с помощью 24-часового составного отбора проб после грубой очистки на входе очистных сооружений, что обеспечит точную индикацию пикового поступления химических веществ и биомаркеров, выделяемых в сточные воды. Места отбора проб должны быть максимально приближены к точке сброса. Отбор проб производить на входе очистных сооружений, обслуживающих определенный район местности или локальных зданий. Для исследования образцов из локальных зданий (*например: образовательных, исправительных учреждений, развлекательных заведений и др.*) пробы отбирать из канализационной трубы, связывающей здания учреждения с городской канализационной системой.

Пробы сточных вод должны отбираться из хорошо перемешанных потоков. Допускается применение одноразовых ёмкостей для отбора проб из полиэтилена или стекла с герметично закрывающейся крышкой.

Проба должна быть представительной, объемом не менее одного литра. *При необходимости сохранения в качестве доказательного образца предоставляется дополнительный равный объём.*

Если образцы не могут быть подвержены анализу в течение 24 часов, необходимо обеспечить их хранение при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$   $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 6. Техническое обеспечение методики

### 6.1 Основные средства измерений

6.1.1 Масс-спектрометр. Система должна включать: источник электрораспыления (*при необходимости с термофокусировкой*), систему управления и обработки данных, программный пакет для управления масс-спектрометром и системой для регистрации и обработки данных. *В данной методике описаны основные параметры проведения анализа реализуемых при использовании четырёх типов масс-спектрометрического аналитического оборудования.*

6.1.2. Жидкостной хроматограф (СВЭЖХ или ВЭЖХ) с программным пакетом для управления системой для регистрации и обработки данных.

Система должна быть оснащена смесителем и системой автоматического заполнения и прокачки линий с помощью встроенного насоса.

Система должна включать: поддон для растворителей; бинарный градиентный насос высокого давления с селектором растворителей и встроенным дегазатором; термостатированный автосамплер с возможностью охлаждения и нагрева для виал (или луночных планшетов); стандартный термостат колонок с возможностью нагрева до не менее 40°C с шагом в 1 °С.; высокоэффективные колонки с обращенной фазой (фазы C18 и C8) и защитными колонками.

6.1.3 Лабораторный генератор азота со встроенными компрессорами (Производительность 24 л/мин, чистота азота 99,5%.)

6.1.4 Библиотеки идентификационных аналитических показателей для веществ вызывающих злоупотребление и контролируемых в республике, их основных метаболитов и других психоактивных веществ.

6.2 Дополнительное лабораторное оборудование, лабораторная посуда и материалы

6.2.1 Система для очистки воды методом обратного осмоса и деионизации, включая емкость для хранения деионизованной воды.

6.2.2 pH – метр (рабочий диапазон pH: 0 – 14, разрешение 0,1pH)

6.2.3 Устройство для фильтрования растворов, включая: стеклянный держатель фильтров диаметром 47 мм, приемная колба (колба Бунзена), соединительные шланги, мембранный насос.

6.2.4 Вакуумный коллектор (манифолд SPE) для ТФЭ.

6.2.5 Ручные дозаторы с переменным объемом дозирования от 1 мкл.

6.2.6 Лабораторный азотный испаритель концентратор.

6.2.7 Лабораторная ультразвуковая ванна (объемом не менее 2л).

6.2.8 Вортекс-миксер с адаптерами (регулируемая скорость 0-3000 об/мин).

6.2.9. Шейкер лабораторный возвратно-поступательный. Диапазон скорости, 100 – 350 об/мин .

6.2.10 Микроцентрифуга, 10000 об/мин.

6.2.11 Центрифуга лабораторная с ротором (для пробирок на 15 мл).

6.2.12 Центрифуга с ротором на большие объемы, макс. скорость не менее 5500 об/мин. *Рекомендуемый объём одного стакана не менее 250 мл.*

6.2.13 Весы аналитические 220 гр/0.0001 г внутр.калибровка.

6.2.14 Азотный испаритель сухого типа.

6.2.15. Виалы объемом 1,5 либо 2 мл виалы для автосамплера ВЭЖХ с микро-вставками на 75-250 мкл, либо виалы со встроенной вставкой.

6.2.16 Крышки для виал с центральным отверстием

6.2.17 Пробирки конические центрифужные с винтовой крышкой.

6.2.18 Лабораторная посуда (колбы, цилиндры, стаканы и т.п).

6.2.19 Штативы для пробирок.

6.2.20 Бутыли для подвижной фазы ВЭЖХ (материал: стекло боросиликатное, обладающее химической инертностью и устойчивостью к

растворителям), объёмы в зависимости от требований системы и длительности анализа.

6.2.21 Средства индивидуальной защиты (лабораторные халаты, шапочки, перчатки, маски, очки)

## 7. Реактивы и стандартные образцы

*Требования к реактивам: Химические реактивы классификацией «LC-MS grade» или максимально возможной чистоты (LC-MS, HPLC, GH – MS, LC, ОСЧ и ХЧ).*

7.1 Азот газообразный (содержание кислорода не должно превышать 0.001%).

7.2 Ацетат аммония

7.3 Ацетон

7.4 Ацетонитрил «только класса LC-MS grade»

7.5 Гексан

7.6 Гелий газообразный марка 5,5

7.7 Гидрофосфат натрия

7.8 Деионизированная вода (только класса LC-MS)

7.9 Дигидрофосфат калия

7.10 Изоамиловый спирт

7.11 Изопропиловый спирт (использовать класса HPLC, LC) высокой чистоты, 99,9%

7.12 Концентрированный раствор гидроксида аммония (~27%)

7.13 Концентрированная (дымящая) соляная кислота (~36%)

7.14 Концентрированная (ледяная) уксусная кислота (~36%)

7.15 Концентрированная муравьиная кислота (~98%)

7.16 Метилен хлористый

7.17 Метиловый спирт

7.18 Натрия хлорид

7.19 Натрия гидрокарбонат

7.20 Формиат аммония (твёрдый) (всегда использовать класса LC-MS)  $\geq 99,0\%$

7.21 Хлороформ

7.22 Этилацетат

7.23 Сертифицированные тестовые образцы.

7.24 Сертифицированные стандартные образцы целевых веществ. *Рекомендуется использовать в качестве исходных, растворы в концентрациях 1 мг/мл в метаноле.*

7.25 Сертифицированные изотопно меченые внутренние стандарты для контроля процедуры подготовки проб и анализа образцов. *Рекомендованные виды внутренних стандартов (выборочно): D-5 Diazepam: кломипрамина-D3, доксерпина-D3 или галоперидола-D4. reserpine.*

7.26 Фосфатный буфер (рН 6,0).

## 7.27 Ацетатный буферный раствор pH 3,0

### 8. Расходные материалы

8.1 Концентрирующие картриджи с полимерным сорбентом HLB SPE (анг. *hydrophilic-lipophilic balance, гидрофильно-липофильный баланс*) для экстракции полярных и неполярных кислотных, основных и нейтральных наркотических и другие психоактивных соединений, их аналогов и метаболитов. Масса сорбента (Sorbent mass) 130-200mg, объем не менее 6ml. Концентрирующие картриджи с катионообменным сорбент смешанного типа. *Рекомендовано использование концентрирующих патронов Matrix Polymer SPEEXTRA HLB 200 mg 6 ml. (Chromservis, EU); HLB; Oasis HLB 6 cc 200 мг 6 ml. (Waters, США) которые по результатам апробации обеспечивают наиболее эффективную экстракцию целевых соединений. Oasis MCX. (Mixed-Mode Cation-eXchange)*

*Другие рекомендованные в данной методике концентрирующие патроны для ТФЭ: Bond Elut Certify (Agilent Technologies, США), AccuBond EVIDEX (Agilent Technologies, США), содержат комбинированный сорбент с неполярным механизмом удерживания и возможностями сильного катионообменника C8. Обычно используется для экстракции основных (катионных) соединений.*

*DAU EXTRACTION COLUMN (United Chemical Technologies. США)-используется как обратная (C8), так и ионообменная (бензолсульфоновая кислота) фазы, связанные с одной частицей.*

8.2 Концентрирующие картриджи для экстракции ТГК и его метаболитов обладающие двойной функцией для кислот и гидрофобных соединений. Сорбент должен содержать две функциональные группы, включать обращенную фазу и первичный аминовый ионообменник.

*Рекомендовано использование концентрирующих патронов Clean Screen THC 200mg/6mL. (Chromservis, EU) и (United Chemical Technologies. США)*

*Другие рекомендованные концентрирующие патроны для ТФЭ смешанные картриджи, заполненные неполярным C8 и сильным сорбентом для ионообмена (SAX): Bond Elut Certify II (Agilent Technologies, США); Clean-UP Hydrophobic Endcapped C8 (Chromservis, EU).*

**Важно!** *Качество концентрирующих картриджей для твердофазной экстракции разных брендов может отличаться даже при заявленных одинаковых характеристиках. По результатам апробации подтверждена необходимость использования концентрирующих патронов указанных в данной методике производителей в процессе подготовки анализируемых проб. При использовании концентрирующих картриджей других производителей не исключается «смыв» фазы, загрязнение элюатов, необъективные результаты исследования.*

### 8.3 Септы для виал (силикон/PTFE)

8.4 Мембранные фильтры: Фильтр-носитель PTFE, 0,22 ( $\mu\text{m}$ ) мкм, диаметр фильтра 47mm

8.5 Шприцевые мембранные фильтры: Фильтр-носитель PTFE, 0,22 ( $\mu\text{m}$ ) мкм

8.6 Одноразовый лабораторный шприц 5 мл для ВЭЖХ

8.7 Стекловолоконные фильтры из 100% боросиликатного стекла без связующих веществ. Диаметр пор, мкм 1,2.

8.8 Микроцентрифужная пробирка, РР, 1,5 мл

8.9 Наконечники для дозаторов 0,1-10 мкл; 2-200 мкл, 100-1000мкл

8.10 Пробирки центрифужные 15 мл, 50 мл, конические

## 9. Оптимальные условия выполнения измерений

температура воздуха (20 — 28) °С;

относительная влажность воздуха не более 80% при 25 °С

напряжение в сети (220  $\pm$ 22) В

## 10. Приготовление рабочих растворов и подвижных фаз

10.1 Приготовление рабочих растворов и подвижных фаз для аналитической системы «Тохтурег» описана в п.10 методики экспертного исследования «Токсико-аналитический скрининг биологических образцов на наличие психоактивных веществ с использованием хромато-масс-спектрометрии amazon speed (IT MS) тип ионная ловушка». Утверждены протоколом НМС и Ученого Совета ЦСЭ МЮ РК от 28 ноября 2024 года.

10.2 Для иных аналитических систем рабочие растворы и подвижные фазы готовятся в соответствии с требованиями, утвержденными соответствующими методиками и (или) рекомендованных производителем используемого оборудования.

*Важно: Рекомендуется готовить свежие элюенты подвижной фазы раз в неделю, если они не используются.*

*Не допускается добавление свежих элюентов подвижной фазы к ранее приготовленным. Перед повторным наполнением необходимо промыть ёмкости для подвижных фаз с растворителем (водой или ацетонитрилом).*

*Хранить и готовить растворы следует в химически стойких, герметичных емкостях, например, мерных колбах и цилиндрах класса «А».*

## 11. Проведение анализа образца

11.1 Предварительная подготовка: для проведения процессов экстракции образец сточных вод необходимо центрифугировать в течение 10 минут при 5 тыс. оборотов в минуту, по возможности профильтровать через фильтр из боросиликатного стекла.

*В случае если образец был заморожен непосредственно перед проведением исследования образец СВ должен быть полностью разморожен*

*при комнатной температуре (рекомендованная температура от +20°C до +25°C) и тщательно перемешан.*

1) Техники проведения экстракции полярных и неполярных кислотных, основных и нейтральных целевых соединений методом твердофазной экстракции.

Необходимое количество концентрирующих картриджей для подготовки одного образца зависит от объема образца исследования.

Объем образца: 500 мл.

Количество SPE патронов: 2 шт (с загрузкой по 250 мл.)

*Для получения экстрактов один из предложенных протоколов проведения твердофазной экстракции.*

а) Протокол 1. Для концентрирующих картриджей содержащих сорбент HLB (*универсальный полимерный сорбент обратной фазы, разработанный для извлечения широкого спектра кислых, щелочных и нейтральных соединений*):

Концентрирующие картриджи: SPEEXTRA HLB 200 mg 6 ml. (Chromservis, EU) либо Oasis HLB. 6 cc 200 mg.

Техника проведения: 500 мл центрифугата образца (*pH образца должно быть в диапазоне 6-8*). При необходимости добавить 0,25 мл раствора внутреннего стандарта, раствор D-5 Diazepam в метаноле с концентрацией 10 мг/мл, тщательно перемешать (не менее одной минуты), используя шейкер.

Количество SPE патронов: 2 шт (с загрузкой по 250 мл.)

*Скорость потока через концентрирующий картридж на всех стадиях 1 мл/мин.*

Конденсация патрона: Пропустить через картриджи по 3 мл метилового спирта.

Уравновешивание патрона: Пропустить через картриджи по 3 мл деионизированной воды.

*Сорбент не должен быть сухой между стадиями кондиционирования и добавления пробы. Над верхним фритом (пористым диском над сорбентом) должно оставаться не менее 1 мл растворителя.*

Загрузка образца: Образец порционно переносится в картриджи. *Перевод пробы в концентрирующие картриджи осуществляется с помощью пипеток. Если время не лимитировано, то лучше всего далее добавлять анализируемый раствор по каплям. Для дозированной подачи пробы в картридж может быть использовано устройство для переливания инфузионных растворов однократного применения. Извлечение аналитов является наилучшим, если каждая порция раствора (аликвота) соприкасается с насадкой от 20 с до 1 мин.*

Промывка сорбента: пропустить двукратно картридж 5% водным раствором метанола по 1 мл.

Элюирование нейтральных соединений путем двукратного пропускания метанола, по 2 мл. *Элюаты собрать в пробирку, предварительно внести в пробирку 50 мкл 0,2М раствора хлористоводородной кислоты в метаноле.*

Пропустить двукратно по 1 мл раствора 5% раствором гидроксида аммония в метаноле. Высушивать картридж в течение 2 минут используя вакуум.

Элюирование целевых соединений основного и слабокислотного характера путем двукратного пропускания 2% раствора муравьиной кислоты в метаноле, по 2 мл. *Элюаты собрать в пробирку с первым элюатом.* Высушивать картридж в течение 2 минут используя вакуум.

Концентрирование анализируемой пробы: Собранные элюаты объединить в одну пробу и органическую фазу выпаривать до полного испарения, в токе азота или используя систему выпаривания растворителя (при температуре не более 40°C).

Сухой остаток растворить в 75-100 мкл подвижной фазы А (либо смесью подвижных фаз), рекомендованных для используемого аналитического оборудования.

б) Протокол 2. Для сорбента Oasis MCX. (Mixed-Mode Cation-eXchange) – катионообменный сорбент смешанного типа. Объем бсс, сорбента 150mg.

Образец СВ необходимо подкислить: на 500 мл пробы воды добавить 2 мл 2 М раствора хлористоводородной кислоты и тщательно перемешать (*при необходимости добавлять 2 М раствор хлористоводородной кислоты до тех пор, пока значение pH не станет меньше 2*). Далее добавить 100 мкл стандартного рабочего раствора внутреннего стандарта (50 нг/мл).

Активация: метанолом (4 мл) и подкисленной водой (4 мл, pH=2) со скоростью потока не более 4 мл/мин. Пропустите двукратно по 2 мл метанола, затем по 2 мл воды.

Загрузка образца. Пропустить по 50 мл образца СВ, со скоростью около 2 мл/мин. *При низких pH все основания пребывают в ионизированном состоянии и удерживаются по ион обменному механизму, а нейтральные и кислые молекулы – по обращенно-фазовому.*

Промывка первый этап. Пропустить 4 мл 0.1М водный раствор хлористоводородной кислоты со скоростью промывки не более 4 мл/мин. *Раствор хлористоводородной кислоты удаляет белки и привязывает щелочные молекулы к сорбенту по ионообменному механизму. На данном этапе может быть использована очищенная вода.*

Промывка второй этап. Пропустить 4 мл метанола со скоростью не более 4 мл/мин. Затем картридж сушить под вакуумом.

Элюирование первый этап (*для сбора нейтральных и кислых соединений*). Пропустить 4 мл 100% метанола. двукратно по 2 мл со скоростью не более 1 мл/мин.

Элюирование второй этап (*для сбора основных соединений*): Пропустить 4 мл 5% раствора гидроксида аммония в метаноле, двукратно по 2 мл со скоростью не более 1 мл/мин.

Концентрирование пробы: Концентрирование анализируемой пробы: Собранные элюаты объединить в одну пробу и органическую фазу выпаривать

до объёма около 150-200 мкл, в токе азота или используя систему выпаривания растворителя (при температуре не более 40°C).

в) Протокол 3. Протокол для концентрирующих картриджей, содержащих смешанные сорбенты, заполненные неполярным C8 и сильным сорбентом для ионообмена (SAX): Bond Elut Certify 130 мг (Agilent Technologies, США), AccuBond EVIDEX 200 мг (Agilent Technologies, США).

Техника проведения. 500 мл центрифугата образца (*pH* образца должно быть в диапазоне 6-8). При необходимости добавить 100 мкл раствора внутреннего стандарта, раствор D-5 Diazepam в метаноле с концентрацией 10нг/мл, тщательно перемешать (не менее одной минуты), используя шейкер.

Количество SPE патронов: 2 шт (с загрузкой по 250 мл.)

*Скорость потока через концентрирующий картридж на всех стадиях 1 мл/мин.*

Последовательно активировать картриджи метанолом (двукратно по 2 мл) и деионизированной водой (двукратно по 2 мл)

Загрузка пробы по 250 мл в каждый картридж.

Промывка: 2 мл деионизированной воды и 3 мл 0,1М хлористоводородной кислоты. Сушка 5 минут при полном вакууме

Промыть каждый картридж 2 мл метилового спирта. Высушивать в течение 5 минут используя вакуум.

Элюирование путем двукратного пропускания по 2 мл смеси растворителей метилен хлористый:изопропанол:аммиак водный (78:20:2).

Собранные элюаты объединить в одну пробу и упарить досуха. Сухой остаток растворить в 75-100 мкл подвижной фазы А (либо смесью подвижных фаз), рекомендованных для используемого аналитического оборудования.

г) Протокол 4. Для концентрирующих картриджей CLEAN SCREEN® DAU EXTRACTION COLUMN (United Chemical Technologies. США) 200 мг, объем 6 мл. Смешанный сорбент, обладающий как гидрофобными, так и катионообменными свойствами.

Подготовка образца:

К 250 мл 0,1М фосфатного буфера (*pH* 6,0) добавить 250 мл образца перемешать/взболтать и оставить на 5 минут. *pH* пробы должен составлять 5,5-6,5. При необходимости отрегулируйте *pH* с помощью 0,1М раствора одноосновного или двухосновного фосфата натрия.

Полученную смесь центрифугировать в течение 10 минут при 2000 об/мин, осадок удалить.

Количество SPE патронов: 2 шт (с загрузкой по 250 мл.)

*Скорость потока через концентрирующий картридж на всех стадиях 1 мл/мин.*

Последовательно активировать 4 мл метанола, 4 мл деионизированной воды

Уравновешивание: 4 мл фосфатного буфера (pH 6,0). Сушка при полном вакууме или давлении

Загрузка образца.

Промывка: Последовательно 4 мл деионизированной воды, 4 мл 0,1М уксусной кислоты и 4 мл метанола. Сушка при полном вакууме или давлении

Элюирование: последовательно пропустить 4 мл смесь метиленхлорида: изопропанола:25% раствора аммиака (78:20:2 по объему), далее 4 мл смеси этилацетата/ изопропанола:25% раствора аммиака (78:20:2 по объему)

*Важно: Готовить растворитель для элюирования непосредственно в день его использования. Смешать изопропанол с 25% раствора аммиака, перемешайте, затем добавьте метиленхлорид (pH 11-12)*

Объединить все элюаты, высушить до сухого остатка при температуре < 40 °С

Растворить сухой остаток в 100 мкл подвижной фазы.

*Рекомендуемый объём для пробы, подготовленной по данному протоколу инъекции 20 мкл пробы.*

2) Техники проведения экстракции ТНС-СООН методом твердофазной экстракции.

а) Протокол 1. Для концентрирующих картриджей CLEAN SCREEN® ТНС 200 мг объемом 10 мл (Chromservis, EU) и (United Chemical Technologies, США)

Проведение гидролиза глюкуронидов в пробе: К 250 мл образца добавьте 50 мл 10 М раствора гидроксида натрия. Полученную смесь перемешать и взболтать. Процесс гидролиза проводить в течение 20 минут при температуре 60°C, смесь охладить и довести pH пробы до 3,0, добавив ледяной уксусной кислоты (pH должен быть ~3,0)

Активация концентрирующего патрона: последовательно промыть 4 мл метанола (двукратно по 2 мл), 4 мл очищенной воды.

Уравновешение: 2 мл ацетатного буфера (pH3,0)

Сушка при полном вакууме или давлении

Загрузка образца со скоростью загрузки 1 мл/мин.

Промывка: последовательно промыть 4 мл деионизированной воды (двукратно по 2 мл), 4 мл смеси 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и ацетонитрила (в соотношении 95:5 об.ед). Сушка в течение 10 минут при полном вакууме или давлении

Для удаления остаточной влаги промыть картридж 200 мкл гексана. Сушка в течение при полном вакууме или давлении. Удалить оставшуюся жидкость со стенок концентрирующего картриджа безворсовым материалом. Поместите картридж в центрифужную пробирку и центрифугируйте в течение 10 минут при 1500 об/мин.

Элюирование: трехкратно смесью гексан: этилацетат (в соотношении 50:50 об.ед) со скоростью 1 мл/мин.

*Важно: Убедитесь, что пробирка для сбора элюата абсолютно сухая.*

Сухой остаток растворить в 100 мкл подвижной фазы В (либо смесью подвижных фаз), рекомендованных для используемого аналитического оборудования.

б) Протокол 2. Для концентрирующих картриджей Bond Elut Certify II 200 мг, 10 мл. *Комбинированный сорбент, который сочетает неполярные свойства сорбента С8 и сильные анионообменные свойства. Сорбент специально разработан для экстракции соединений с анионными неполярными свойствами, к которым относится и 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинолкарбоновая кислота.*

Проведение щелочного гидролиза глюкуронидов из образца: К 200 мл образца добавьте 40 мл 5 М гидроксида натрия. Полученную смесь перемешать и взболтать. Процесс гидролиза проводить в течение 20 минут при температуре 60°C, смесь охладить и довести рН пробы до 4.5-6.5, добавив концентрированную соляную кислоту. Окончательный рН доводить до 7 с помощью 0.1 М ацетата натрия (рН 7), с 5% метанола (по объему).

Активация и уравнивание концентрирующего патрона: последовательно промыть 2 мл метанола и 2 мл ацетата натрия (рН 7), с 5% метанола.

Загрузка образца: в 3 картриджа (по 60-70 мл пробы на патрон).

Затем промыть картриджи 2 мл 50% метанола.

Сушка в течение 10 минут при полном вакууме или давлении. Удалить оставшуюся жидкость со стенок концентрирующего картриджа безворсовым материалом. Поместите картридж в центрифужную пробирку и центрифугируйте в течение 10 минут при 1500 об/мин.

Элюирование: пропустить через картридж 2 мл смеси растворителей гексан: этилацетат (75:25) с 1% ледяной уксусной кислоты со скоростью 1 мл/мин.

Все собранные с каждого патрона элюаты объединить, выпарить до сухого остатка со скоростью 1 мл/мин.

Важно: Убедитесь, что пробирка для сбора элюата абсолютно сухая.

Сухой остаток растворить в 250 мкл 50% метанола.

### 11.3 Проведение аналитического исследования анализируемых проб

Каждая проба анализируется скрининговым и подтверждающим (оптимизированным или селективным) методами.

Объём пробы для инъекции 10-20 мкл.

Анализируемую пробу профильтровать через мембранный фильтр ПТФЭ (0,22 мкм) и перенести в микровиалу (вставку для виал) для дальнейшего аналитического исследования. *При необходимости (при получении мутной жидкости на этапе растворения сухого остатка) полученную жидкость поместить на 30 секунд в ультразвуковую ванну, затем центрифугировать в течение 10 минут при 10000 об/мин до получения прозрачной надосадочной части жидкости.*

а) Предварительно провести исследование тестовых проб, рекомендованных для используемых аналитических систем.

б) Хроматографическое разделение в условиях градиентного режима подвижной фазы.

в) Принцип фрагментации и сканирования ионов зависят от типа используемого аналитического оборудования.

Образцы должны быть проанализированы как в положительном, так и в отрицательном режиме регистрации ионов. POSITIV-положительная ионизация, NEGATIV-отрицательная ионизация в режиме множественных реакций мониторинга (MRM). Максимальная чувствительность может быть достигнута путем уточнения энергии соударений для каждого перехода.

*Показатели потенциала декластеринга  $DP(V)$  и энергии столкновения  $SE(eV)$ , для достижения наилучшей чувствительности, должны быть оптимизированы, которые определяются при постановке метода, путем её последовательного увеличения (с шагом в 5 В) от 5 до 50 В. Данные ионных пар для некоторых целевых соединений и внутренних стандартов, напряжение на декластер, энергия столкновения, для анализа в режиме MRM приведены в источнике (2).*

Другие параметры, влияющие на чувствительность анализа: столкновительный газ (CAD), завесный газ (CUR), распыляющий газ (GS1), вспомогательный газ (GS2). Перед использованием необходимо оптимизировать расход каждого газа для достижения требуемой чувствительности масс спектрометра. *Могут быть использованы параметры настройки масс-спектрометра, рекомендуемые производителем аналитического оборудования.*

#### 11.4

1) Условия проведения аналитического исследования с использованием систем amazon speed (IT MS) тип ионная ловушка описаны в методике экспертного исследования источник (1) п.11.1.2.1. и п.11.2.1.1. Детектирование в режиме MS1, MS2, MS3 (Full SCAN) 70-800 а.е.м. при одновременной регистрации положительных и отрицательных ионов в окнах поиска целевых веществ.

2) Некоторые параметры условий проведения аналитического исследования, рекомендуемые для других типов соответствующего оборудования. *Условия могут быть скорректированы в зависимости от фактической ситуации для конкретной аналитической системы.*

а) Для аналитического оборудования с трехкврупольным масс-спектрометрическим детектором: – поток через распылитель (Nebulizing Gas Flow) 3 л/мин.; – поток осушающего газа (Drying Gas Flow) 10 л/мин.; – поток нагреваемого газа (Heating Gas Flow) 10 л/мин.; – температура осушающего газа (DL Temp) 250°C.; – температура интерфейса 400°C.

Для скринингового метода: длительность регистрации селективного перехода – 2 мс, длительность задержки – 1 мс, скорость сканирования – 30

000 сканирований в секунду. Для подтверждающего метода: длительность регистрации селективного перехода – 10 мс, скорость сканирования – 5000 сканирований в секунду.

3) Для аналитического оборудования с масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения типа квадруполь-орбитальная ловушка.

Тип ионизации: ионизация в нагреваемом электроспрее (HESI); режим ионизации - положительная/отрицательная; температура ион-проводящего капилляра 350 °С; напряжение капилляра 3,0 кВ; диапазон сканирования 100 – 750 m/z; разрешение 35 000; время записи спектра 13.5 мин; точность детектирования m/z: 5 ppm.

Параметры масс-спектрометрического детектирования для направленной идентификации ТНС-СООН, для повышения чувствительности инструментального метода применять режим масс-спектрометрического детектирования t-SIM. Параметры масс-спектрометрического детектирования: – режим сканирования t-SIM (targeted single ion monitoring); – тип ионизации HESI; – режим ионизации: отрицательная; – температура ион-проводящего капилляра: 350 °С; – напряжение капилляра: 3,0 кВ; – диапазон сканирования: 1,0 m/z ( $\pm 0,5$  m/z); – разрешение: 35 000; – время записи спектра: 8,0 – 11,0 мин; – точность детектирования m/z: 5 ppm.

4) Для аналитических систем квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения (Quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QToF-MS))

Условия масс-спектрального исследования: – поток через распылитель (Nebulizing Gas Flow) 30 psi/g.; – поток осушающего газа (Drying Gas Flow) 13 л/мин.; – поток нагреваемого газа (Heating Gas Flow) 12 л/мин.; – температура осушающего газа (DL Temp) 250°С.; – температура интерфейса 400°С.

Режим (Ion Source Type) – Dual AJS ESI. Mass Range Mode - Both. Диапазон масс от 100 до 1000 m/z. Метод «AutoMSMS» в режиме положительных ионов и метод «AutoMSMS negative» в режиме отрицательных ионов.

Диапазон масс MS Min Range (m/z) 100 MS Max Range (m/z) 1000 m/z. MS Scan Rate (spectra/sec) 8.0; MS/MS Min Range (m/z) 50; MS/MS Max Range (m/z) 700 MS/MS Scan Rate (spectra/sec) 4.0

При условии доступности соответствующих масс-спектров для целевых соединений и внутренних стандартов используйте фиксированную энергию столкновения (Use Fixed Collision Energies) 10.00, 20.00, 40.00 (eV). *При этом в целях достижения наилучшей чувствительности данные показатели должны быть оптимизированы для каждого целевого соединения индивидуально.*

## 12. Оценка результатов

Идентификация достигается с помощью сведений о фрагментарных ионах в рекомендуемых производителем оборудования библиотекам спектров,

которые должны содержать не менее трёх идентификационных показателей для целевых соединений. Полученные данные оцениваются по двум критериям: процент совпадения масс-спектров с соответствующим библиотечным масс-спектром и качество формы хроматографических профилей (степень размывания хроматографического пика, характеристика симметричности пика (пик симметричен, если фактор асимметрии равен 1), разрешение между пиками двух веществ смеси (оптимальным считается диапазон разрешения от 1,2 до 1,5)

12.1 При использовании систем amazon speed (IT MS) тип ионная ловушка результат считается положительным при соответствии критериям, указанным в п.11.1.5. описанным в методике экспертного исследования (*Источник 1*)

1) Для других аналитических систем, при условии доступности соответствующих масс-спектров для целевых соединений и внутренних стандартов идентификация достигается с помощью сведений о фрагментах из соответствующей библиотеки.

Характеристические ионные пары масс-спектра и соотношение их интенсивностей полученных в режиме множественных реакций мониторинга (MRM) служат основанием для качественного анализа, при условии доступности данных, оптимальным является использование в качестве критерия идентификации и показателя времени удерживания. Сбор данных по точно измеренным массам с высоким разрешением осуществляется при разных условиях. В одних случаях при низком значении энергии соударений, в других – при нескольких высоких значениях энергии. Низкоэнергетические спектры преимущественно отображают только молекулярные ионы (или ионы-предшественники) соединений, тогда как высокоэнергетические – ионы-предшественники и их фрагментные ионы. *Некоторые качественные ионные пары для целевых соединений и внутренних стандартов, а также время удерживания приведены в источнике 2.*

2) При использовании фиксированных показателей энергии столкновения (Use Fixed Collision Energies) 10.00, 20.00, 40.00 (eV), полученные данные оцениваются по двум критериям: процент совпадения масс-спектров с соответствующим библиотечным масс-спектром и качество формы хроматографических профилей. Идентификация веществ выполняется программами в автоматическом режиме. При этом необходимо провести визуальное сравнение масс-спектра обнаруженного соединения с библиотечным масс-спектром. Основным параметром идентификации спектров является значение «Purity», которое должно быть не менее 75% при совпадении показателя времени удерживания.

*Важно: Окончательная оценка результатов исследования даётся экспертом, при этом в синтезирующей части «Заключения эксперта (специалиста)» приводится соответствующее обоснование.*

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:**

1. Методика экспертного исследования «Токсико-аналитический скрининг биологических образцов на наличие психоактивных веществ с использованием хромато-масс-спектрометрии amazon speed (IT MS) тип ионная ловушка». Утвержден протоколом НМС и Ученого Совета ЦСЭ МЮ РК от 28 ноября 2024 года.
2. Technical specifications for domestic wastewater sampling and common illicit drugs determination (Технические характеристики отбора проб бытовых сточных вод и определения распространенных наркотических веществ). Документ утвержден Шанхайской ассоциацией судебно-медицинской экспертизы.
3. Методическое руководство «Обнаружение психоактивных веществ в сточных водах», группа авторов, 2025 © Издательство: АО «Издательский дом «Новости Югры». УДК 628.31; ББК 38.761.2в6; О-201; ISBN 978-5-6048008-9-8
4. Каталоги производителей сорбентов для концентрирующих картриджей, используемых для подготовки анализируемых проб.