**МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИК-КАЗАХСТАН**

**ЦЕНТР СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Стандартные операционные процедуры

«Методика экспертного исследования по определения

опиатов при химико-токсикологическим исследования

трупного материал»

СОСТАВИТЕЛЬ: Жуматаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

судебно-медицинский эксперт высшей категории

Астана, 2016 год

Паспорт методики

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Наименование методики | Методика экспертного исследования по определению опиатов при химико-токсикологическим исследовании трупного материала  |
| 2. Шифр специальности методики | 27.1 |
| 3. Информация об авторе(ах), (составителе (ях)) методики | Составитель: Жуматаева ГС. |
| 4. Сущность методики | Сущность метода: Методика определения морфина основана на оптимальном способе гидролизе глюкуронидов морфина |
| 4.1 Экспертные задачи, решаемые методикой | Установление наличия алкалоидов опия в трупном материале |
| 4.2 Объекты исследования | Биологические жидкости и ткани |
| 4.3 Методы исследования | Химические методы (цветные, осадительные, микрокристаллические реакции), хроматографические, спектральные методы анализа.  |
| 4.4 Краткое поэтапное описание методики | 1. Методики изолирования алкалоидов группы опия2. Идентификация.- Спектрофотометрические исследование- ТСХ исследование  |
| 5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСМ МЮ РК | Протокол № 1 от 07 «ноября» 2016г. |
| 6. Информация о лице составившем паспорт методики | Составитель: Жумабаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК» судебно-медицинский эксперт высшей категории |

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. Введение 4
2. Область применения 4

3. Термины и обозначения 5

1. Основная часть 5
2. Заключение 15
3. Список использованных источников 15

**1. Введение**

Опиаты — наркотические алкалоиды опиума. Существуют и опиоиды - группа препаратов, оказывающих на организм человека эффект, похожий на действие опия, тоже являющиеся агонистами опиатных рецепторов. *Опиатами* называют алкалоиды мака и его п рои з водны е.

*Опиоидами* — их синтетические и полусинтетические производные и аналоги.

К опиатам относятся как естественные алкалоиды опиума (морфин, кодеин, тебаин, наркотин), так и их полусинтетические производные (такие как героин (диацетилморфин), дигидрокодеин, дезоморфин).

Морфин, как в свободном, так и связанном виде (М-6-Г, М-3-Г), является основным метаболитом героина. Обнаружение 6-МАМ в биообъектах является доказательством употребления героина. Наибольшие концентрации свободного морфина отмечены в крови, головном мозге, селезенке, мышечной ткани сердца, почках, В печени, легких и моче морфин находится в коньюгированном виде.

Выбор объектов исследования во многом зависит от способа и дозы введения наркотика, а также времени от момента приема до наступления отравления.

Морфин быстро метаболизируется печенью и выводится с мочой в виде глюкуроиидов. При острых отравлениях основная масса морфина к органах трупа находится в виде глюкуроиидов. Поэтому для выделения морфина из органов, мочи и желчи предварительно необходимо проводить гидролиз глюкуроиидов соляной кислотой при повышенном давлении.

Иммунохроматографический экспресс - тест мочи на опиаты. Чувствительность метода (минимально определяемая концентрация)-300 нг/мл морфина и/или его метаболитов.

Методика выделения опиатов основана на оптимальном способе гидролиза глюкуроиидов морфина.

**2. Область применения**

Для проведения химико-токсикологического (судебно-химического) исследования с целью обнаружения и установления количества опиатов в случае легальною исхода - биожидкости и биоткани трупа.

Наряду с этим на химическое исследование доставляются объекты небиологического происхождения, так называемые вещественные доказательства.

Химико-токсикологическое (судебно-химическое) исследование представляет собой многостадийный процесс, включающий операции по выделению токсического вещества из исследуемого объекта, очистки полученного извлечения, идентификации и количественного определения выделенного ксенобиотика.

**3. Термины и обозначения**

ТСХ- тонкослойная хроматография;

рК- равновесное отношение концентрации элемента в одной фазе к его концентрации в другой фазе, например в системе из двух несмешивающихся жидкостей Р.к. может быть больше или меньше единицы;

СФ- спектрофотометрия;

ГХ- газовая хроматография;

ГЖХ - газожидкостиая хроматография;

ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография;

МС-масс-спектромстрня;

ТФЭ-твердофазная экстракция;

УФ-ультрафиолетовый спектр

hRf- значение Rf умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель Rf. один из основных показателей в ТСХ

- параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров, Определение значения Rf проводят как отношение расстояния прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя Rf = L/L0. Значение Rf — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

**4.1 Выделение опиатов из биологических объектов.**

*Внимание. При проведении анализа следует строго соблюдать рекомендованные соотношения объёмов мочи, желчи, навесок органов и концентрированной соляной кислоты. Повышение концентрации соляной кислоты в пробе более 5% ведёт к разрушению морфина и образованию апоморфииа.*

**4.1.1 Изолирование опиатов из мочи (трупный материал)**

Изолирование. Не менее 20 мл мочи подкисляют 6 М НCl до pH 2 и гидролизуют на водяной бане в течение 20 минут. Гидролизат охлаждают, добавляют 10 %-ныи раствор аммиака до pH 9,0-9Д Экстрагируют 2 раза в течение 5 минут двойным количеством смеси хлороформ: н-бутанол (9го) или хлороформ-изопропанол (9:1). Органический слой отделяют, фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия и концентрируют и исследуют на присутствие опиатов.

1. Изолирование опиатов из крови (трупный материал)

100-150 мл крови помещают в колбу и смешивают с 200- мл дистиллированной воды и прибавляют 50-75 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу соединяет с обратным холодильником и помещают, на кипящую водяную баню. Содержимое колбы нагревают в течение 30 мим. Охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют. Над осадочную жидкость отфильтровывают в делительную воронку, и экстрагируют диэтиловым эфиром три раза по 15мл. Эфирные извлечения (можно отбрасывать и далее не исследовать). Водное извлечение нейтрализовывают раствором аммиака до pH 6-7 по универсальной индикаторной оумаге. Подщелачивают насыщенным раствором карбоната натрия до рН~8-9 и экстрагируют смесью хлороформ - этанол (2:1) три раза по 15 мл. Органические экстракты объединяют, пропускают через фильтр с безводным сульфатом натрия и выпаривают досуха в токе теплого воздуха. Сукой остаток растворяют в 0,5 мл - этанола для дальнейшего исследование.

**4.1.3 Изолирование опиатов из желчи**

Доступное для анализа количество желчи предварительно разбавляется вол ой до объёма 25мл и помешают в круглодонную колбу, прибавляют 25м 10% раствора хлористоводородной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 часа. Смесь центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Центрифугах трижды экстрагируют эфиром порциями по 15мл. Эфирные извлечения не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до рН=7 и доводят до pH=9 насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. Далее проводят трижды экстракцию смесью хлороформ: н-бутанол (95:5) или хлороформ-изопропанол (9:1), Органический слой отделяют, фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия и концентрируют и исследуют на присутствие опиатов.

**4.1.4 Изолирование опиатов из тканей внутренних органов.**

25 г мелко измельчённой ткани помещают в колбу со шлифом вместимостью 400 мл, добавляют 10 мл воды и 2.5 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу герметично закрывают и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 часа. Гидролизат фильтруют через бумажный фильтр, остаток органов промывают дважды 3% раствором соляной кислоты, снова фильтруют. *Для фильтрования можно использовать стеклянные фильтры №3 или №2 укреплённые в колбу Бунзена, с использованием водоструйного насоса.* Смесь охлаждают, переносят в делительную воронку и промывают дважды порциями по 100 мл петролейного эфира (t кип. 30-600С) для освобождения от липидов и жиров. Эфирные извлечения не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до рН=7 и доводят до рН=9 насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. Далее проводят трижды экстракцию смесью хлороформ; н-бутанол (95:5) или хлороформ-изопропанол (9:1). Органический слой отделяют, фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия и концентрируют и исследуют на присутствие опиатов.

**4.1.5 Изолирование опиатов из тканей кожи (места инъекции).**

Лоскут кожи измельчают, помещают в пробирку на 5 мл, приливают 1,3мл 10% раствора хлористоводородной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 часа. После добавляют 1,3мд дистиллированной воды, смесь переносят в центрифужный стакан и центрифугируют 15 минут при 3000об/мин. Центрифугат трижды экстрагируют эфиром порциями 10, 5, 5 мл. Эфирные экстракты не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до рН=7 и доводит до pН=9 насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. Далее проводят трижды экстракцию смесью хлороформ: н-бутанол (95:5) или хлороформ-изопропанол (9:1) Органический слой отделяют, фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия и концентрируют и исследуют на присутствие опиатов.

**4.1.6. Изолирование опиатов из образцов волос.**

Навеску волос 20-30 мг и длиной 1-2 см измельчают ножницами, промывают трижды по 2 мл этанолом и высушивают досуха. Все операции проводят в ступке. Засыпают 1-2 стекла средней зернистости и измельчают вращательными движениями пестика до порошкообразного состояния и образования гомогенной массы. Гомогенат переносят в пробирку со шлифом и добавляют 2 мл 6н. соляной кислоты, оставляют на кипящей водяной бане на 45 минут. По истечении времени гомогенату дают остыть, доливают 2 мл дистиллированной воды и нейтрализуют 25% водным раствором аммиака до рН=10. В пробирке со шлифом гомогенат экстрагируют в течение *5* минут с 2 мл смеси хлороформ-изопропанол (9:1) и разделяют центрифугированием в течение 15 минутпри 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в делительную воронку на 50 мл и разделяют. Водную фазу еще трижды экстрагируют 2 мл смеси хлороформ-изопропанол (9:1).Объединенные органические извлечения объединяют и пропускают через слой безводного сульфата натрия. Извлечение упаривают досуха для дальнейшею ГХ/МС, ВЭЖХ/МС анализа

**4.1.7. *Твердофазная экстракция (ТФЭ)*** *проводятся процедуры рекомендованные производителем используемого картриджа для веществ данной группы.*

**4.2.Хроматографическая очистка и обнаружение в тонком слое сорбента.**

Рекомендуемая подвижная фаза для хроматографирования: этил ацетат — этанол (метанол) - аммиак (17:2: 1).

В качестве метчиков наносят раствор морфина, кодеина, наркотина, папаверина. Длина пробега - 10 см.

Реагенты, используемые для проявления пластинки,

1. Реактив Марки.

2. Реакти в Фреде

Реактивы наносят капельно от старта до финиша сначала в зону метчиков, а затем в исследуемые зоны. Значения Rf. и цветовые результаты См. Таблицу 1. Приложения 1.

**4.2.1 Подтверждающее ТСХ исследование.** Аликвоту хроматографируют в системах растворителей, различающихся по своей полярности:

1- толуол-ацеюн-этапол-25% аммиак, (45:45:7:3);

2- этилацетат-абсолютный этанол-2 5% аммиак, (18:6:2);

3 - ацетонитрил-хлороформ-этил ацетат-2 5% аммиак, (40:30:25:5);

4 - этанол - ледяная уксусная кислота - вода, (60:30:10).

5 - ацетон - хлороформ - 25% аммиак, (24:12:1).

Длина пробега фронта растворителя 8-10 см. Пластинку сушат в потоке холодного воздуха и проявляют 0,5 % раствором феррицианида калия, содержащего несколько капель 10% раствора хлорида окисного железа. В зоне, соответствующей морфину, наблюдается синее окрашивание. Проявление следует осуществлять после использования именно 4-й системы растворителей. При хроматографировании в щелочных и нейтральных системах морфин даёт слабо-фиолетовое окрашивание, исчезающее при стоянии. Нижний предел обнаружения 2-3 мкг морфина.

Исследование соответствующей аликвоты указанным количествам мочи или органов исключает возможность проявления экстрактивных веществ.

При исследовании в данных условиях аликвот, соответствующих 4-5 мл мочи или 4-5 г органа, проявляются экстрактивные вещества с Rf =0,75 и Rf =0,45. Rf морфина - 0,1-0,15 (в 4-й системе).

Аликвоту, соответствующую 4 мл мочи или желчи (или 4 г органа), хроматографируют и системах 1-3 на пластинках «Силуфол», «Сорбфил». Длина пробега фронта растворителя 8-10 см. После хроматографирования пластинку сушат в потоке холодного воздуха и проявляют.

Реактивы проявления:

1. Реактив Драгендорфа в модификации Мунье: раствор 1: 17 г азотнокислого висмута и 200,0 г винной кислоты растворяют в 800 мл воды; раствор 2: 160 г КI растворяют 400 мл воды. Растворы смешивают (полученный «крепкий» раствор является устойчивым несколько месяцев). Перед опрыскиванием хроматограммы к 1 мл «крепкого» раствора добавляют 9 мл 20% раствора винной кислоты,

2. Раствор 10% хлорида окисного железа: 10г хлорида окисного железа (FeCl3) растворяют в достаточном количестве воды и доводят водой до 100 мл (реакция на фенольный гидроксил). Хроматограмму опрыскивают полученным раствором и наблюдают реакцию в течение не менее 30 минут (при приграничных концентрациях).

3. Раствор ферри-ферроцианида калия]: 57,7мг K3Fe(CN)6 и 4,9 мг K4Fe(CN)6 растворяют в 100 мл воды (раствор хранят в холодильнике не более 1 мес. Для опрыскивания хроматограммы к 5мл основного раствора добавляют 3 мл 6% раствора гидроксида аммония и 2 мл этанола. Полученным раствором хроматограмму опрыскивают до увлажнения пластинки, нагревают при 120°С 2 мин., затем исследуют в УФ-свете (254-З66нм). В случае морфина, а также 6-МАМ наблюдают лимонно-желтую (254нм) и ярко-голубую (366мм) флюоресценцию (образование псевдоморфина). Образование комплекса (при приграничных концентрациях) наблюдают не ранее чем через 30-40 минут. Морфин проявляется но сине-голубой, при стоянии - салатовой флуоресценции. Данная реакция достаточно специфична: не дают флуоресцирующих пятен морфинон, кодеин и его производные, дигидроморфинон, диацетилморфин, апоморфин, меперидин, метадон, апиперидин. Флуоресцирующие пятна образуют нор-морфин, п-аллил-нор-морфин, дигидроморфин. 6-ацетилморфин, наркотин, но разделяются при хроматографировании. Экстрактивные вещества, при исследовании указанной аликвоты, в зоне морфина по данной реакции флуоресцирующих пятен не образуют. Нижний предел обнаружения морфина 50-К0 мкг. В случае слабой флуоресценции необходимо ещё несколько раз опрыснуть пластинку реактивом. Флуоресценция усиливается, пятна, соответствующие морфину, после проявления приобретают через сутки желтоватую окраску, заметную при дневном освещении и сохраняют свою флуоресценцию,

4. Пробу с реактивом Скотта (тиоцианат кобальта) проводят в модификации на пластинке ТСХ. Приготовление: 6,0г нитрата кобальта и 18,0г роданида калия (тиоцианата калия) растворить в 100 мл воды, голубое окрашивание дают многие алкалоиды и синететические основания (кроме никотина, анальгина, амидопирина, кофеина, бензофенонов)

5. Пробы Марки-Манделина и Марки: примерно 25 мл формальдегида в чашке помещали в стеклянную камеру (время насыщения не менее 30 минут). В камеру опускают хроматограмму, экспонируя ее в парах формальдегида в течение 5 минут, вынимают ее и сушат в течение 30 сек при 50оС. Затем опрыскивают (пол тягой) или обрабатывают методом погружения концентрированной серной кислотой или концентрированной серной кислотой, содержащей ванадат аммония (проба Марки-Манделина). Наблюдают окраску пятен, отмечают их карандашом, затем погружают пластинку в воду и быстро удаляют ее. При этом окраска пятен бледнеет. Для приготовления реактива Манделина, 200 мг ванадата аммония растворяют в 350 мл 95-97% серной кислоты.

6. Реактив Мекке (раствор селенистой кислоты или селенита натрия в концентрированной серной кислоте), как и реактив Марки очень чувствителен в отношении алкалоидов опия, однако обладает более высокой избирательностью в отношении опиатов, позволяя определять их в присутствие экстрактивных веществ. Приготовление: 0,25 г селенистой кислоты (0,34т селенита натрия) растворить в 25 мл концентрированной серной кислоты.

Величины Rf опиатов, некоторых наркотических и некоторых лекарственных веществ при разделении их методом ТСХ на пластинках Сорбфил ПТСХ-ПА «Силуфол», См. Таблицу 2, Приложения 1.

Реакции обнаружения опиатов, некоторых наркотических и лекарственных веществ и наблюдаемые окраски при ТСХ-анализе на пластинках Сорбфил ПТСХ-ПА в системах растворителей 1 - 5. См. Таблицу 3, Приложения 1.

**4.3 Микрокристаллосконические реакции.**

Сухой остаток на предметом стекле растворяют в капле 0,1 М раствора кислоты соляной и добавляют каплю реагента.

Морфин:

Реакция с калия йодидом, Кl, 15%-ный раствор: Наблюдается образование белого осадка, состоящего из бесцветных игл, собранных в пучки. Предел обнаружения: 2,5 мкг морфина.

Реакция с ртути хлоридом, HgCl2, 5%-ный раствор: Наблюдаются характерные пучки из игл.

Реакция с солью Рейнеке: Образуется сиреневый осадок, содержащий кристаллы в виде сростков из пучков тонких игл. Предел обнаружения: 2 мкг морфина.

Кодейн:

Реакция с раствором кислота пикриновой: При соединении капель исследуемого раствора и насыщенного раствора пикриновои кислоты образуется желтый аморфный осадок, который при стоянии становится кристаллическим. Наблюдаются кристаллы двух видов: желтые сфероиды пучки из бледно-желтых пластинок. Предел обнаружения: 1 мкг кодеина.

Реакция с хлоридом ртути, HgCl2, 5%-ный раствор: При потирании предметного стекла в области капель стеклянной палочкой выделяется кристаллический осадок из иглообразных и пластинчатых кристаллов. Предел обнаружения: 13 мкг кодеина.

**4.4 Спектрофотометрическое исследование**

В УФ-области спектра на спектрофотометре в диапазоне длин волн 230-330 нм исследуют 3 мл солянокислого реэкстракта 0,1 Н раствора соляной кислоты. Морфин в солянокислом растворе имеет максимум поглощения при длине волны 284-287 им. К солянокислому раствору в контрольной кювете и кювете с исследуемым образцом добавляют по 4 капли 30% раствора гидроксида натрия, перемешивают и исследуют спектр поглощения. В присутствии морфина максимум поглощения смещается к\* длине волны 296-298 нм и появляется второй максимум при длине волны около 250 нм. Такое смещение характерно для натриевых солей фенолов. Предел обнаружения морфина по характерному спектру поглощения солянокислого реэкстракта составляет около 40-50 мкг/ мл морфина.

**4.5 Количественное определение**.

Методика. В колбу вместимостью 25 мл вносят 2,5 мл раствора кремнекислого калия, содержащего в 1 мл 0,4 мг кремния, 6,5 мл воды, 2 мл 0,5 н раствора соляной кислоты, 2,0 мл 5% раствора молибдата аммония, взбалтывают и через 3 мин добавляют 5 мл солянокислого реэкстракта и перемешивают, добавляют 5 мл 6% раствора гидроксида аммония и оставляют на 10 мин, доводят водой до объёма 25 мл и фотометрируют па спектрофотометре в кювете с 1= 1 см при длине волны 737 нм против контроля реактивов. Количество морфина рассчитывают по калибровочному графику основания морфина на 25 мл фотометрируемого раствора. В случае превышения оптической плотности в анализируемом растворе величины 0,5-0,55 следует повторить количественное определение, используя для проведения реакции меньшее количество солянокислого реэкстракта, разбавив его 0,1 н раствором соляной кислоты до 5 мл.

**4.6 Хроматомасс-спектрометрия (ГЖХ/МС).**

Хроматомасс-спекгрометрический метод является высокочувствительным методом, позволяющим с высокой степенью вероятности идентифицировать компоненты анализируемой смеси по временам удерживании и масс-спектрам.

С целью повышения чувствительности метола необходимо перевести опиаты в соединения, обладающие большей летучестью. Такими свойствами обладают триметилсилильные, трифторсилильные, и другие производные опиатов. Ниже приводится методика получения триметилсилильного производного морфина. Аликвота извлечения (10-100 мкл) испаряется досуха. Остаток растворяют в метаноле, который количественно переносится в герметическую емкость. После испарения метанола в токе теплого азота (50°С) в емкость добавляют 50мкл БСA (N,О-бис - (триметилсилил) - ацетамид). Смесь тщательно встряхивается и через 5 минут 1 мкл раствора вводится в хроматограф.

Условия хроматографирования.

Газовый хроматограф HP 5890 с масс-селективным детектором HP 5971. Кварцевая капиллярная колонка 25м х 0,2мм с 5% фенилметилсиликоновой фазой (0,33мкл). Скорость газа- носителя - гелия 0,5 мл/мин. Начальная температура термостата колонок 70°С конечная - 280°С. Скорость подъема температуры 20°С\мин. Температура термостата испарителя, детектора и инжектора 280°С.

**4.7 Обнаружение наркотина**

Исследование на наличие наркотина производят в тех случаях, если в вытяжках из биологического материала обнаружен морфин и а связи с этим возникает вопрос о возможности отравления опием.

Наркотин (гноскапин, носкапин) является одним из алкалоидов опия, в котором содержится 0,75—9 % этого вещества. Наркотин легко рацемизируетея. При кипячении уксуснокислых растворов наркотина образуется его рацемат (гноскапин). Природным наркотин является левовращающим.

Наркотин экстрагируется органическими растворителями как из кислых, так и из щелочных водных растворов. Максимум экстракции наркотина органическими растворителями достигается при pH — 5...7.

Метаболизм. После введения наркотина в организм он быстро исчезает из крови и переходит в ткани. В течение первых шести часов после поступления наркотина в организм он выделяется с мочой в неизмененном виде, а после указанного времени наркотин выделяется из организма в виде конъюгатов.

Ввиду того что наркотин и морфин с некоторыми реактивами-дают подобные продукты реакций, перед идентификацией наркотина его отделяют от морфина. Способ разделения этих алкалоидов основан на том, что морфин, содержащий фенольную группу, растворяется в щелочах и после этого не экстрагируется органическими растворителями из щелочных растворов. Наркотин в этих условиях экстрагируется органическими растворителями.

Для разделения наркотина и морфина берут хлороформную вытяжку и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 — 2 мл разбавленной соляной кислоты, прибавляют 2-3 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и взбалтывают с двумя порциями хлороформа (по 5 мл). Хлороформные вытяжки соединяют и выпаривают досуха. В сухом остатке определяют наличие наркотина.

Обнаружение наркотина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор основания наркотина в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 291 и 310 нм. Водный раствор гидрохлорида наркотина имеет максимум поглощения при 313 нм и минимум — при 268 нм; основание наркотина (диск с бромидом калия) в ИК- области спектра имеет основные пики при 1745, 1276 и 1038 см -1.

4.8 Исследование объектов биологического происхождения на наличие меконовой кислоты.

Исследование объектов биологического происхождения на наличие меконовой кислоты производится тогда, когда в биологическом материале обнаружены морфии, кодеин и другие алкалоиды опия. Наличие в биологическом материале морфина, кодеина, наркотина, меконовой кислоты, а в ряде случаев и меконина указывает на отравление опием.

Меконовая кислота содержится и опии в связанном виде с алкалоидами.

Из биологического материала меконовую кислоту изолируют подкисленным спиртом. Для подкисления биологического материала лучше применять соляную кислоту, а не слабые органические кислоты.

Исследуемый биологический материал настаивают с этиловым спиртом, подкисленным соляной кислотой. Вытяжку сливают с твердых частиц биологического материала и фильтруют, а затем фильтрат на водяной бане выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в воде и фильтруют. Полученный фильтрат нагревают до кипения и взбалтывают с избьпком оксида магния. Раствор, содержащий меконат магния, еще горячим фильтруют и упаривают до небольшого объема, а затем подкисляют разбавленной соляной кислотой. В этом растворе определяют наличие меконовой кислоты.

Обнаружение меконовой кислоты

Реакция с хлоридом железа (III). К 1—2 мл указанного выше раствора прибавляют 2—3 капли 1 %-го раствора хлорида железа (III). Появление кроваво-красной окраски указывает на наличие меконовой кислоты в растворе. Эта окраска не должна исчезать при нагревании.

Обнаружение меконовой кислоты по УФ-спектрам. Меконовая кислота в водном растворе имеет максимумы поглощения при 210, 284 и 303 нм. Описанные выше способы выделения меконовой кислоты из биологического материала и обнаружения ее в вытяжках также пригодны для исследования остатков пищи, мочи, рвотных масс и других объектов на наличие указанной кислоты,

**4.9 Обнаружение меконина.**

Meконин не имеет токсикологического значения, но обнаружение его в трупном материале указывает на отравление опием.

Меконин содержится в опии, получаемом из снотворного мака и в желтокорне канадском.

Меконин экстрагируется органическими растворителями из кислых растворов. Выделение меконина из биологического материала. Измельченный биологический материал настаивают с этиловым спиртом, подкисленным серной кислотой. Полученную вытяжку сливают с твердых частиц объекта, фильтруют и упаривают до небольшого объема. Затем эту жидкость взбалтывают с бензолом. Бензольную вытяжку выпаривают досуха. Сухой остаток исследуют на наличие меконина.

Обнаружение меконина. От прибавления нескольких капель концентрированной серной кислоты к полученному выше сухому остатку появляется зеленая окраска, которая в течение двух суток переходит в красную. При слабом нагревании раствора, имеющего зеленую окраску, появляется изумрудно-зеленая окраска, переходящая в фиолетовую, а затем в красную.

**4.10 Исследование объектов не биологического происхождения на наличие опиатов**

Для обнаружения опиатов в шприцах, инъекционных иглах, на ложках, алюминиевой фольге, бумаге, целлофановой пленке и др. необходимо выделить из объекта исследования, применяя различные метода, выбор которых зависит от характера и количества вещественного доказательства.

- Шприцы, инъекционные иглы, ложки, бумага, фольга.

Для смыва остатков опиатов, которые могут находиться на поверхностях указанных объектов н следовых концентрациях, применяются этанол, метанол, ацетонитрил, как н чистом виде, так и в смеси с водой в соотношении 95:5.

При этом объем растворителя или смеси растворителей не должен превышать 0,5-1,0 мл. Смывы концентрируют при комнатной температуре до объема 100 мкл, аликвотная часть которых исследуется с применением цветных тестов, тонкослойной хроматографии, хроматомасс-спектромстрии, высокоэффективном жидкостной хроматографии, газожидкостной хроматографии.

При наличии в шприце остатков жидкости, часть ее испаряется досуха при комнатной температуре. Остаток растворяется в одном их указанных выше растворителей, и полученный раствор исследуется хроматографическими методами.

Реакции окрашивания опиатов с реактивом Марки См, Таблицу 4, приложения 1.

**5.Заключение.** По результатам количественного определения морфина в этих жидкостях производят судебно-медицинскую оценку. Если концентрация морфина в желчи больше, чем в моче, то это указывает на острое отравление морфином. Если содержание морфина в моче больше, чем в желчи, то смерть наступила в результате хронического отравления. Если для анализа недоступны моча и желчь, то могут быть исследованы печень и почки. Заключение об обнаружении морфина в печени и почках следует давать по результатам наиболее чувствительных реакций и методов его обнаружения вследствие его меньшей концентрации в этих органах.

**6. Список использованных источников.**

1. Е.С. Бушуев, Р.В. Бабанян, В.Н. Куклин Современные проблемы химико­-токсикологического анализа токсических веществ. Санкт-Петербург, 2002

2. CLARKE’S ISOLATlON AND IDENTIFICATION OF DRUGS London THE PHARMACEUTICAL. PRESS 1986,

3. Крамаренко В, О. Химико-токсикологический анализ.— К: Вища шк. Головное изд-во, 1982 г.

4. Актуальные вопросы судебной медицины и права, Казань 2011, Вып. 2.

Приложение 1

к методике экспертного исследования по определению опиатов

при химико-токсикологическом исследовании

трупного материала

Протокол №1 от 07 ноября 2016года

Таблица 1. Окраска алкалоидов группы опия

|  |  |
| --- | --- |
| Соединение | Окрашивание |
| Реактив Марки | Реактив Фреде |
| Морфин | красно-фиолетовое | фиолетовое |
| Кодеин | фиолетовое | фиолетово-зеленое |
| Наркотин | фиолетовое | сине-зеленое |
| Папаверин | фиолетовое | сине-зеленое |
| Омнопон | красно-фиол етовое | фиолетовое |
| Героин | красно-фиолетовое | фиолетовое |

Таблица 2

Величины Rf опиатов, некоторых наркотических и некоторых лекарственных веществ при разделении их методом ТСХ на пластинках Сорбфил ПТСХ-11А

«Силуфол»

|  |  |
| --- | --- |
| Разделяемые соединения | Хроматографические системы |
| Героин | 0,53 | 0,73 | 0,41 |  |
| 6-МАМ | 0,48 | 0,72 | 0,30 |  |
| Кодеин | 0,36 | 0,60 | 0,22 | 0,32-0,38 |
| Морфин | 0,23 | 0,34 | 0,08 | 0,10-0,15 |
| Наркотин | 0,70 | 0,86 | 0,73 | 0,45-0,50 |
| Папаверин | 0,59 | 0,81 | 0,64 |  |
| Тебаин | 0,50 | 0,69 | 0,41 |  |
| Ацетилкодеин | 0,55 | 0,75 | 0,44 |  |
| Гидрокодон | 0,40 | 0,65 | 0,23 |  |
| Промедол | 0,58 | 0,81 | 0,55 |  |
| Анальгин | 0,49 | 0,75 | 0,48 |  |
| Антипирин | 0,47 | 0,74 | 0,45 |  |
| Делагил | 0,44 | 0,75 | 0,43 |  |
| Димедрол | 0,60 | 0,85 | 0,60 |  |
| Кокаин | 0,73 | 0,81 | 0,70 |  |
| Кофеин | 0,49 | 0,57 | 0,48 |  |
| Никотин | 0,52 | 0,80 | 0,45 |  |
| Норкотинин | 0,18 | 0,46 | 0,23 |  |
| Котинин | 0,32 | 0,71 | 0,45 |  |
| Трамадол | 0,77 | 0,85 | 0,61 |  |
| Эфедрин | 0,20 | 0,46 | 0,12 |  |

Таблица 3.

Реакции обнаружения опиатов, некоторых наркотических и лекарственных веществ и наблюдаемые окраски при ТСХ-анализе на пластинках Сорбфил ПТСХ-ПА в системах растворителей 1-5.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Вещество | Реактив Драгендорфа | Реакив Марки-Манделина | K3Fe(CN)6+K4Fe(CN)6-УФ-свет 254-366нм | Раствор тиоцианата кобальта (р-в Скотта) | Реактив Мекке | 10% раствор FeCl3 |
| Героин | оранжево-коричневое (0,2) | темно-фиолетовое (0,2) | - | голубое (0,3) | зелено-голубое (0,2) | - |
| 6-МАМ | оранжево-коричневое (0,2) | синее (0,3) | желто-серое свечение (0,4) | То же | - | голубое (3-5мкг) |
| Кодеин | То же | темно-синее (0,3) | - | ” ”  | зелено-синее | - |
| Морфин | ” ” | фиолетовое (0,25-0,3) | голубая флюоресценция (0,2) | ” ” | зеленое (0,2) | синее (1,0) |
| Наркотин | ” ” | темно-фиолетовое | слабая голубоватая флюоресценция (100) | ” ” | сине-зеленое | - |
| Папаверин | ” ” | пурпурно-фиолетовое | - | ” ” | синее | - |
| Промедол | ” ” | малиновое | - | ” ” | - | - |
| Димедрол | коричневое | лимонно-желтое | - | голубое | желтое | - |
| Кокаин | темно-коричневое | - | - | - | - | - |
| Кофеин | темно-фиолетовое | - | - | - | - | - |
| НикотинНаркотинКотинин | коричневое для всех 3-х соединений | - | - | - | - | - |
| - | яркая флюор-я | - | - | - |
| - | - | - | - | - |
| Трамадол | коричневое | коричневое, переходящ. в бирюзовое  | - | голубое | серо-голубое |  |
| Эфедрин | Светло-коричневое | - | - | сиреневое | - | - |
| Экстрактивные вещества | коричневое | Темнокоричнево-бурое | Голубая флюоресценция | Темно-зеленое | коричневое | Буро-коричневое |

*Примечание: Прочерк - отсутствие окрашивания; в скобках указаны пределы детектирования вещества (в мкг);* \* - *желто-зеленая флюоресценция кодеина проявляется после обработки реактивом Марки, промывания и высушивания пластинки.*

Пределы обнаружения опиатов в моче и внутренних органах методом ТСХ по данной методике анализа при использовании всего комплекса хромогенных реакций (при максимальной аликвоте, эквивалентной 0,5мл исследуемой мочи или 1,0 г ткани органов) составляют: для морфина - 1-5мкг/мл мочи {1-5 мкг/г ткани органов): для кодеина и героина - 1-2 мкг/мл мочи (1-2мкг/г ткани органа).

Пределы обнаружения опиатов в моче отдельными реагентами составляют, для морфина, кодеина, и героина при использовании реактива Драгендорфа - 0,5 мкг в пробе, при применении пробы Марки или Марки-Манделина - 1мкг в пробе; для морфина при обнаружении реакцией образования псевдоморфина - 1 мкг в пробе, при детектировании с хлоридом окисного железа - 2,5 мкг в пробе.

Диаграмма 1.

**дифференциальный спектр морфина, 35м кг/мл**



Таблица 4

Реакции окрашивания опиатов с реактивом Марки

|  |  |
| --- | --- |
| Наркотическое средство | Окрашивание |
| Морфин | Красно-фиолетовое |
| Геронн | Красно-фиолетовое |
| Опий | Красно-фиолетовое  |
| Бензилморфин | Красно-фиолетовое  |
| Дигидроморфин | Красно-фиолетовое |
| Тебаин | Красно-оранжевое |
| Кодеин | Фиолетовое |
| Диаморфин | Фиолетовое |
| Бупренорфин | Фиолетовое |
| Дигидрокодеин | Фиолетовое |
| Морфилонг | Фиолетовое |
| 6-Моноацетилморфин | Фиолетовое |
| Норморфин | Фиолетовое |
| Фолькодин | Фиолетовое |
| Неоцин | Сине-фиолетовое |
| Ацеторфин | Сине-зеленое желто-коричневое |
| Эторфин | Сине-зеленое желто-коричневое |
| Гидрокодон | Желтое коричневое фиолетовое |
| Этилморфин | Желтое фиолетовое |
| Норкодеин | Желтое фиолетовое |
| Гидроморфон | Желтое фиолетовое |
| Оксикодон | Желтое коричневое фиолетовое |
| Бупрнофин | Серо-фиолетовое |
| Оксиморфон | Серо-фиолетовое |