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

"Қазақстан Республикасы Әділет Министірлігінің
Сот сараптамалары орталығы"
БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 1
«7» қараша 2016 ж. хаттамасы
реттік нөмері № 27.1(4)

# МЕТОДИКА

# ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ОПИАТОВ ПРИ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИИ ТРУПНОГО МАТЕРИАЛА

**(шифр специальности – 27.1)**

**Астана, 2016 г.**

# ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

| | |
|---|---|
| 1. Наименование методики | Методика экспертного исследования по определению опиатов при химико-токсикологическим исследовании трупного материала |
| 2. Шифр специальности методики | 27.1(4) |
| 3. Информация о разработчике методики | Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК» |
| 4. Сущность методики | Методика определения морфина основана на оптимальном способе гидролизе глюкуронидов морфина |
| 4.1. Объекты исследования | Биологические жидкости и ткани |
| 4.2. Методы исследования | Химические методы (цветные, осадительные, микрокристаллические реакции), хроматографические, спектральные методы анализа |
| 4.3. Краткое поэтапное описание методики | 1. Методики изолирования алкалоидов группы опия<br>2. Идентификация.<br>- Спектрофотометрические исследование<br>- ТСХ исследование |
| 5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК | Протокол № 1 от 07.11.2016г. |
| 6. Информация о составителях паспорта методики | Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК» |

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение 4
2. Область применения 4
3. Термины и обозначения 4
4. Основная часть 5
5. Заключение 13
6. Список использованных источников 13

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 производные.

*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 конъюгированном 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 глюкуронидов. При острых отравлениях основная масса морфина в органах трупа находится в виде глюкуронидов. Поэтому для выделения морфина из органов, мочи и желчи предварительно необходимо проводить гидролиз глюкуронидов 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 глюкуронидов морфина.

2. Область применения

Для проведения химико-токсикологического (судебно-химического) исследования с целью обнаружения и установления количества опиатов в случае летального 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-газожидкостная хроматография;
ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография;
МС-масс-спектрометрия
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 апоморфина.*

4.1.1.Изолирование опиатов из мочи (трупный материал)

Изолирование. Не менее 20 мл мочи подкисляют 6 М HCl до pH 2 и гидролизуют на водяной бане в течение 20 минут. Гидролизат охлаждают, добавляют 10 %-ный раствор аммиака до pH 9,0-9,5. Экстрагируют 2 раза в течение 5 минут двойным количеством смеси 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.

4.1.2.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 соединяют с обратным холодильником и помещают, на кипящую водяную баню. Содержимое колбы нагревают в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют. Надосадочную 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 бумаге. Подщелачивают насыщенным раствором карбоната натрия до pH=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. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл этанола для дальнейшего исследование.

4.1.3.Изолирование опиатов из желчи

Доступное для анализа количество желчи предварительно разбавляется водой до объёма 25мл и помещают в круглодонную колбу, прибавляют 25мл 10% раствора хлористоводородной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 часа. Смесь центрифугируют 15 минут при 3000об/мин. Центрифугат трижды экстрагируют эфиром порциями по 15мл. Эфирные извлечения не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до pH=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. 30-60$^0$C) для освобождения от липидов и жиров. Эфирные извлечения не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до pH=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.

4.1.5.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 1,3мл дистиллированной воды, смесь переносят в центрифужный стакан и центрифугируют 15 минут при 3000об/мин. Центрифугат трижды экстрагируют эфиром порциями по 10, 5, 5 мл. Эфирные экстракты не исследуют. Водное извлечение нейтрализуют 25% раствором гидроксида аммония до pH=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.

4.1.6.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 г 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 pH=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 минут при 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 дальнейшего 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: этилацетат – 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. Реактив 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-ацетон-этанол-25% аммиак, (45:45:7:3);
2 - этилацетат-абсолютный этанол-25% аммиак, (18:6:2);
3 - ацетонитрил-хлороформ-этилацетат-25% 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 в 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 KI 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 ($FeCl_3$) 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 $K_3Fe(CN)_6$ и 4,9 мг $K_4Fe(CN)_6$ 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 $120^0$С 2 мин., затем исследуют в УФ-свете (254-366нм). В случае морфина, а также 6-МАМ наблюдают лимонно-желтую (254нм) и ярко-голубую (366нм) флюоресценцию (образование псевдоморфина). Образование комплекса (при приграничных концентрациях) наблюдают не ранее чем через 30-40 минут. Морфин проявляется по 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 50-80 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 синтетические 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 30сек при $50^0$ С. Затем опрыскивают (под 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 (0,34г 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.Микрокристаллоскопические реакции.
Сухой остаток на предметном стекле растворяют в капле 0,1 М раствора кислоты соляной и добавляют каплю реагента.
Морфин:
Реакция с калия иодидом, KI, 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.

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

Реакция с хлоридом ртути, $HgCl_2$, 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 нм. 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 на спектрофотометре в кювете с L=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-спектрометрический метод является высокочувствительным методом, позволяющим с высокой степенью вероятности идентифицировать компоненты анализируемой смеси по временам удерживании и масс-спектрам.
С целью повышения чувствительности метода 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 испаренеия метанола в токе теплого азота (50°С) в емкость добавляют 50

мкл БСА (N,O-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 25 м х 0,2 мм 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 в 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 рацемизируется. При кипячении уксусно-кислых растворов наркотина образуется его рацемат (гноскапин). Природный 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 морфин, 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 в 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 избытком 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.

Меконин 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 в следовых концентрациях, применяются этанол, метанол, ацетонитрил, как в 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-спектрометрии, высокоэффективной 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 ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS London THE PHARMACEUTICAL PRESS 1986,
3. Крамаренко В. Ф. Химико-токсикологический анализ.— К: Вища шк. Головное изд-во, 1982 г.
4.Актуальные вопросы судебной медицины и права, Казань 2011, Вып. 2.

Приложение1
*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-фиолетовое | 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 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 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-11А в системах растворителей 1 - 5.**

| Вещество | Реактивы и результаты реакций (окраска пятен) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Реактив Драгендорфа | Реактив Марки-Манделина | $K_3Fe(CN)_6$+ $K_4Fe(CN)_6$ –УФ-свет 254-366 нм | Раствор тиоцианата кобальта (р-в Скотта) | Реактив Мекке | 10% раствор $FeCl_3$ |
| 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 (3-5 мкг) |
| Кодеин | То же | Темно-синее (0,3) | - * | „ „ | зелено-синее | - |
| Морфин | „ „ | фиолетовое (0,25-0,3) | голубая флюоресцен-ция (0,2) | „ „ | зеленое (0,2) | синее (1,0) |
| Наркотин | „ „ | темно-фиолетовое | Слабая голубоватая флюоресцен – ция (100) | „ „ | сине-зеленое | - |
| Папаверин | „ „ | пурпурно-фиолетовое | - | „ „ | синее | - |
| Промедол | „ „ | малиновое | - | „ „ | - | - |
| Димедрол | коричневое | лимонно-желтое | - | голубое | желтое | - |
| Кокаин | темно-коричневое | - | - | „ „ | - | - |
| Кофеин | темно-фиолетовое | - | - | - | - | - |
| Никотин норкотинин котинин | 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-коричневатое |

*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.

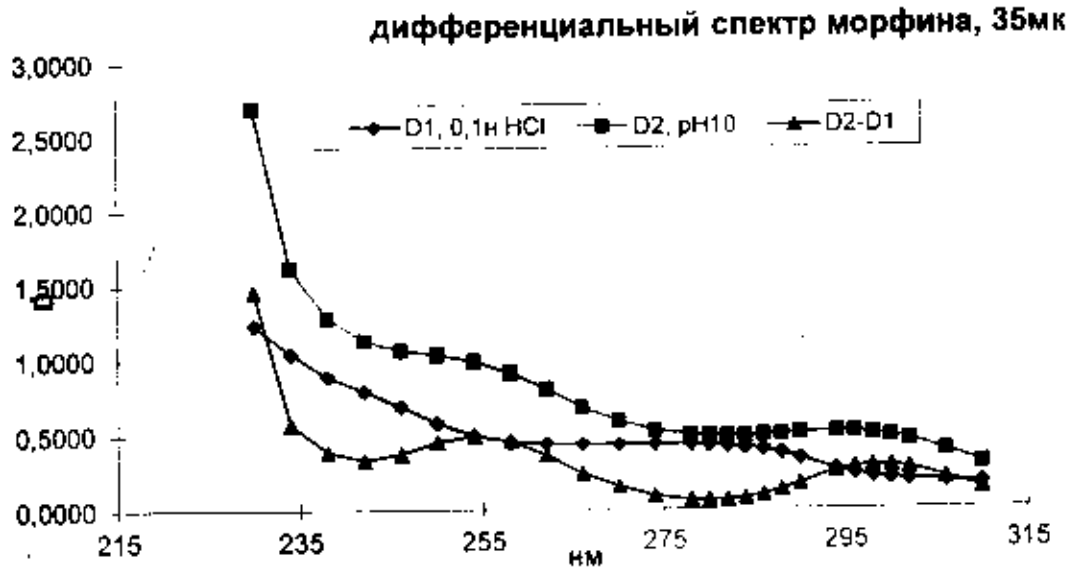


Таблица 4

Реакции окрашивания опиатов с реактивом Марки

| Наркотическое средство | Окрашивание |
|---|---|
| Морфин | Красно-фиолетовое |
| Героин | Красно-фиолетовое |
| Опий | Красно-фиолетовое |
| Бензилморфин | Красно-фиолетовое |
| Дигидроморфин | Красно-фиолетовое |

| | |
|---|---|
| Тебаин | Красное→оранжевое |
| Кодеин | Фиолетовое |
| Диаморфин | Фиолетовое |
| Бупренорфин | Фиолетовое |
| Дигидрокодеин | Фиолетовое |
| Морфилонг | Фиолетовое |
| 6-Моноацетилморфин | Фиолетовое |
| Норморфин | Фиолетовое |
| Фолькодин | Фиолетовое |
| Неопин | Сине-фиолетовое |
| Ацеторфин | Сине-зеленое→ желто-коричневое |
| Эторфин | Сине-зеленое→желто-коричневое |
| Гидрокодон | Желтое →коричневое→фиолетовое |
| Этилморфин | Желтое→ фиолетовое |
| Норкодеин | Желтое→ фиолетовое |
| Гидроморфон | Желтое→ красное→ фиолетовое |
| Оксикодон | Желтое→ коричневое→фиолетовое |
| Бупренорфин | Серо-фиолетовое |
| Оксиморфон | Серо-фиолетовое |