

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



МЕТОДИКА

**ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ МОРФИНА
И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ОБЪЕКТАХ ОТ ЖИВОГО ЛИЦА**

(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования по обнаружению морфина и его метаболитов в объектах от живого лица
2. Шифр специальности методики	27.1(5)
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
4.2. Методы исследования	Химические методы (цветные, осадительные, микрокристаллические реакции), хроматографические, спектральные методы анализа
4.3. Краткое поэтапное описание методики	1. Изолирование наркотических веществ из мочи 2. Изолирование наркотических веществ из крови 3. Идентификация 4. Подтверждающие исследования
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	14
7. Приложение	15

1. Введение.

Морфин является основным алкалоидом опиума и сильным наркотическим анальгетиком. Диаморфин (героин, 3,6-О-диацетилморфин) в 2—3 раза сильнее морфина, его получают обработкой морфина (или опиума — в случае нелегального изготовления наркотических препаратов) уксусным ангидридом. Диаморфин быстро гидролизуетс^я *in vivo* с образованием 6-ацетилморфина и затем морфина. Морфин, кроме того, является метаболитом кодеина. Приблизительно 5 % дозы морфина метаболизируется с образованием норморфина, но основной метаболический путь представляет собой конъюгацию с глюкуроновой кислотой. Основным продуктом является морфин-3-глюкуронид, но образуется также и морфин-6-глюкуронид. Свободный морфин в моче составляет примерно 10 % принятой дозы, тогда как на долю морфин-3-глюкуронида приходится 75 %. По оценкам, минимальная летальная доза морфина или диаморфина для взрослых, не принимающих эти соединения, составляет 100—200 мг.

Из водных растворов морфин лучше всего экстрагируется изоамиловым спиртом, примерно 73-76% при pH 8,5- 9,5; хлороформом при pH 8,6-10,2 экстрагируется ~28-30% морфина.

Поскольку значительная часть дозы диаморфина или морфина выводится в виде глюкуронидов, предварительный гидролиз мочи может повысить чувствительность метода.

2. Область применения.

Для установления факта употребления (введения) наркотических веществ группы опия. От живого лица направляются - моча, кровь, рвотные массы, промывные воды, волосы, слюна. При этом необходимо иметь в виду, что героин в слюне сохраняется дольше, чем в крови, и он может быть обнаружен в течение одного часа после курения и внутривенного введения.

Трудности доказательства морфина в крови и моче химическими методами обусловлены необходимостью применения не только специфичной, но и высокочувствительной методики определения.

Для доказательства наличия морфина в крови необходимо применять только высокочувствительной методики определения (ГХ/МС и ВЭЖХ/МС).

3. Термины и обозначения.

Экстракция — процесс извлечения растворителями соответствующих веществ из различных объектов. Объекты, из которых извлекают соответствующие соединения, могут быть твердыми веществами или жидкостями. Поэтому процессы изолирования подразделяют на экстракцию в системе твердое тело — жидкость (твердожидкостная экстракция) и на экстракцию в системе жидкость — жидкость (жидкостная экстракция).

Экстрагент — органический растворитель, в индивидуальном состоянии или содержащий какие-либо реагенты, извлекающий (экстрагирующий) данное вещество из водной фазы.

Экстракт — отделенная жидкая органическая фаза, содержащая экстрагированное из водной фазы вещество.

Реэкстракция – процесс обратного извлечения вещества из экстракта в водную фазу.

Реэкстрагент – раствор реагента, используемый для извлечения вещества из экстракта.

Реэкстракт – отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

ХТА – химико-токсикологический анализ.

«Метод добавок» – процедура состоит в том, что в анализируемую пробу делается добавка раствора, содержащего тот же анализируемый ион.

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 $Rf = L/L_0$. Значение Rf — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

3-МAM – 3-моноацетилморфин – продукт неполного ацетилирования морфина.

6-МAM – 6-моноацетилморфин — моноацетильное производное морфина, химическое вещество с брутто-формулой $C_{19}H_{21}NO_4$, один из метаболитов героина в организме человека. 6-моноацетилморфин является маркером употребления героина. Героин, в отличие от других опиатов, образует 6-МAM в результате метаболизма.

ВЭТСХ пластины – пластины для высокоэффективной ТСХ.

4. Методы исследования.

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

4.2. Изолирование опиатов

4.2.1. Изолирование опиатов из мочи проводят в 2 этапа:

Методика выделения опиатов основанная на оптимальном способе гидролиза глюкуронидов морфина не позволяет получить информацию о присутствии диаморфина, поскольку это соединение, а также 3-О-ацетилморфин и 6-О-ацетилморфин, как и морфин-глюкурониды, гидролизуются с образованием морфина.

Если моча концентрированная (темного цвета с осадком), необходимо провести ее очистку однократной экстракцией диэтиловым эфиром в соотношении на 25 мл мочи 10 мл эфира при подкислении соляной кислотой до pH 2

а) Выделение свободных морфина, кодеина, героина и 6-МAM путем прямой экстракции 10 мл мочи при pH 9,0 с помощью 50 мл смеси хлороформ-н-бутанол; (также для объектов: рвотные массы, промывные воды).

б) Выделение общего морфина и общего кодеина (высвобождение из конъюгатов с глюкуроновой кислотой) после предварительного кислотного гидролиза 10 мл мочи с 2 мл конц. HCl на кипящей водяной бане 30 мин, с последующей экстракцией смесью хлороформ-н-бутанол.

в) Очистка и концентрирование. Очистку алиquot полученных экстрактов проводят реэкстракцией в 0,5 М HCl, затем после отделения водной фазы и доведения ее до pH 9,0 (карбонатный буфер) экстрагируют ее смесью хлороформ-н-бутанол по 10 мл 2 раза.

Л. М. Власенко для улучшения результатов ХТА на морфин применила хроматографический метод выделения его на колонке катионита СДВ-3 в Н-форме. Через колонку пропускают водное извлечение из биоматериала, подкисленное щавелевой кислотой до pH 5-6. Десорбция производится 5% аммиаком. Чувствительность обнаружения увеличивается в 7,5-12,5 раз при использовании смолы СДВ-3.

4.2.2. Изолирование наркотических веществ из сыворотки или плазмы крови живых лиц.

5 мл сыворотки или плазмы, полученных путем центрифугирования крови при 3000 об/мин в течение 15 минут, осаждают белки 40% раствором трихлоруксусной кислоты и снова центрифугируют. Центрифугат подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 8-9, извлекают трехкратно этилацетатом по 10 мл. Этилацетатные извлечения объединяют и центрифугируют. Верхний прозрачный слой отбирают шприцем, обезвоживают высушенным безводным сульфатом натрия, испаряют и исследуют высокочувствительными методами исследования.

4.2.3. Эдстраукционный метод изолирования морфина из крови и мочи:

5 мл крови или мочи смешивают с 8 мл 40% раствора бисульфита натрия, добавляют 15% раствор (для крови) или концентрированную соляную кислоту (для мочи) до 10% содержания. Смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, а затем охлаждают до комнатной температуры. К жидкости добавляют 50% раствор трихлоруксусной кислоты до 7% концентрации. После осаждения белковых веществ через 5—10 мин надосадочную жидкость отфильтровывают в делительную воронку, нейтрализуют раствором аммиака до

pH 6,0—7,0, по универсальному индикатору. Жидкость насыщают кристаллическим бикарбонатом натрия (0,5 г на 30 мл жидкости) и экстрагируют смесью бутанол—хлороформ 1:9 (3×20 мл×5 мин). Бутанольно-хлороформные извлечения фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия. Фильтрат концентрируют при температуре не выше 40°.

Данный метод изолирования позволяет извлекать 83% морфина из крови и 71,3% из мочи. Граница обнаружения морфина составляет 15 мкг в 5 мл крови и 10 мкг в 5 мл мочи.

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

4.2.4.1. Методика подготовки проб мочи твердофазной экстракцией на картриджах «Oasis» HLB 3cc.

К пробам мочи объемом 1 мл прибавляется по 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта (например: этилморфина гидрохлорида 0,02 мг/мл) и проводят подготовку проб одним из двух способов:

- а) без гидролиза — к пробе мочи прибавляется 100 мг гидрокарбоната натрия;
- б) кислотный гидролиз — К пробам мочи объемом 5 мл прибавляют по 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон герметично закрывают и раствор нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляется 1,2 мл 30% раствора гидроксида натрия и 500 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора последнего.

После проведения предварительных процедур образцы мочи центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин и надосадочную жидкость загружают в предварительно кондиционированный (2 мл этанола + 1 мл дистиллированной воды) картридж. Пропускают образец через картридж со скоростью 1 мл/мин и промывают 1 мл 10 % раствора этанола. Патрон сушат под вакуумом не менее 10 мин и элюируют 3 мл этанола. Элюат испаряют в потоке воздуха при 40-50°C.

4.2.4.2. Методика подготовки проб мочи твердофазной экстракцией на картриджах AccuBond EVIDEX (200 мг/3мл). К пробам мочи объемом 5 мл прибавляют по 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон герметично закрывают и раствор нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляют 1,2 мл 30% раствора гидроксида натрия и 500 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора последнего. Пробу центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин и надосадочную жидкость загружают в предварительно кондиционированный (3 мл этанола + 2 мл дистиллированной воды) картридж. Пропускают образец через картридж со скоростью 1 мл/мин и промывают 2 мл 10 % раствора этанола. Патрон сушат под вакуумом не менее 20 мин и элюируют 5 мл этанола. Элюат испаряют в потоке воздуха при 40-50°C до объема около 100 мкл и переносят в вials.

Для дальнейшего исследования методом ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии элюаты восстанавливают в соответствующих подвижных фазах.

Идентификацию проводят методами ИК-, УФ- спектроскопии, ТСХ, ГЖ, ВЭЖХ, методом хромато-масс-спектрометрии.

4.2.4.3. При использовании патронов Диапак для большинства веществ проводят следующие операции.

1. Активация – приведение патрона в рабочее состояние путем промывки этиловым или метиловым спиртом (2-10 мл). Скорость пропускания 2,5 мл/мин.
2. Кондиционирование – пропускание буферного раствора (ацетатного или аммиачного) в зависимости от исследуемых веществ. Объем буферного раствора – 10 мл. Скорость пропускания 2,5 мл/мин.
3. Сорбция – пропускание исследуемого раствора через патрон. Объем пробы обычно 100 мл. Скорость пропускания 2,5 мл/мин.
4. Десорбция – удаление исследуемого вещества с сорбента с помощью воздуха шприцем или вакуумным насосом.
5. Элюирование образца осуществляется реагентом, который применялся на стадии активации. Объем элюента – 50-100 мл.

Высокая эффективность патронов позволяет использовать их для пробоподготовки широкого круга объектов – от лекарственных препаратов сложного состава до “уличных наркотиков” и биологических жидкостей (моча, кровь, сыворотка и т.д.), а также экстрактов биологических жидкостей.

4.2.5. Изолирование морфина 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 6N. 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 либо ВЭЖХ/МС анализа.

Может использоваться изолирование ацетонитрилом или ацетоном.

4.3. Методы исследования

4.3.1. Экстракты из крови исследуют высокочувствительными методами исследования.

4.3.1.1. Исследование методом газовой хромато-масс-спектрометрии.

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 испарения метанола в токе теплого азота (50°C) в емкость добавляют 50 мкл БСА (N,O-бис-(триметилсилил)-ацетамид). Смесь тщательно встряхивается и через 5 минут 1 мкл раствора вводится в хроматограф. Исследование проводят в следующих условиях:

- ионизация электронным ударом (энергия 70 эВ);
- колонка кварцевая капиллярная длиной 12 - 30 м и диаметром 0,2 - 0,32 мм, с метилсиликоновой стационарной фазой (типа HP-1) либо с метилсиликоновой фазой, содержащей 5% фенильных групп (типа HP-5);
- температура испарителя - 280 °C;
- температура интерфейса детектора - 280 °C;
- температура колонки меняется от 50 до 280 °C со скоростью 10 - 15 °C/мин.;
- время выдержки при конечной температуре - 10 мин.;
- газ-носитель - гелий;
- ввод пробы осуществляют с делением потока.

Идентификация выявленных компонентов производится по индексам удерживания и масс-спектрам при сопоставлении с библиотечными спектрами.

4.3.1.2. Поисковый метод идентификации наиболее распространенных психоактивных средств методом жидкостной масс-спектрометрии. Хромато-масс-спектральный анализ с использованием системы LC/MS/MS Q TRAP 3200 и ВЭЖХ «UltiMate 3000». Система включает: тройной квадрупольный масс-спектрометр с линейной ионной ловушкой, источник ионов Turbo VTM, компьютерную программу Analyst 1.5. Объем вводимой пробы 15 мкл. Подвижная фаза смесь фазы А и фазы В соотношением 90:10. Фаза А: 996 мл воды, 2 мл 1М раствор ацетата аммония и 2 мл муравьиной кислоты; фаза В - 996 мл ацетонитрила, 2 мл 1М раствор ацетата аммония и 2 мл муравьиной кислоты. В градиентном режиме: от 0-4 мин 10% фазы В, 90% фазы А; от 4 до 7 мин 10% фазы А 90% фазы В (скорость 0,5 мл/мин); от 7 до 7,5 мин 10% фазы В, 90% фазы А (скорость 0,5 мл/мин); от 7,5 до 10 мин 10% фазы В, 90% фазы А. Сканирование проводится в режиме «Positive» MRM (мультиреактивный мониторинг) - ион фрагментируется для образования иона продукта с определенной массой при СЕ (энергии столкновения) 35. CAD (параметр давления инертного газа в столкновительной камере) -4; DP (параметр фрагментации кластера) -20, EP (потенциал входа) -10, CXP (потенциал выхода из столкновительной камеры) -2,5; температура турбо газа пробоввода 400°C, Gas 1- 50,0 и Gas 2- 55,0. В режиме EPI (эффективное сканирование ионов-продуктов) - ионы продукты получают в столкновительной камере Q2 в результате столкновения родительских ионов при СЕ (энергии столкновения) 35 поступающих из Q1. Затем ионы продукты передаются и накапливаются в Q3 где они сканируются, образуя улучшенный спектр ионов-продуктов.

Хроматографическая колонка: X Terra® MS C8, 3,3µm. Скорость ввода пробы 0,35 мкл/мин. Режим сканирования от 50 до 700 Дальтон.

Подтверждающие исследования проводятся с учетом свойств искомого вещества с предварительной оптимизацией необходимых условий анализа. Определение количественного содержания вещества проводится с использованием внутреннего стандарта, «методом добавок» и серии стандартных растворов соответствующего вещества в диапазоне искомых концентраций.

4.3.1.3. ВЭЖХ исследование: колонка размером 2x75 мм, с обращенной фазой «Prontosil 120-5-C18»), зернением 5 мкм. Детектирование при 200, 220, 250, 300 нм. Подвижная фаза: элюент «А» – раствор кислоты трифторуксусной (ТФУ) 0,1%, элюент «Б» – ацетонитрил 100%. Градиент от 5 до 50% при скорости потока 150 мкл/мин и температуре колонки 35 °С. Идентификацию ведут по времени удерживания и характерного для данного вещества спектра.

Количественное определение проводится методом ВЭЖХ по калибровочным графикам с использованием не менее трех спиртовых растворов веществ в диапазоне искомых концентраций.

4.3.1.4. Метод газовой хроматографии

Метод газовой хроматографии применяется для качественного выявления ацетилкодеина, 6-моноацетилморфина, 3-моноацетилморфина в объектах не биологического происхождения, в жидкостях из шприцев, смывах, промывных водах и рвотных массах.

Газохроматографический анализ проводят в следующих условиях:

- колонка кварцевая капиллярная длиной 12 - 30 м и диаметром 0,2 - 0,32 мм, с метилсиликоновой стационарной фазой (типа HP-1) либо с метилсиликоновой фазой, содержащей 5% фенильных групп (типа HP-5);

- температура испарителя - 280 °С;

- температура детектора - 290 °С;

- температура колонки меняется от 200 до 280 °С со скоростью 10 °С/мин.;

- время выдержки при конечной температуре - 10 мин.;

- газ-носитель - гелий (азот), детектор пламенно-ионизационный;

- ввод пробы осуществляется с делением потока.

В ходе исследования к 2 - 20 мг образца добавляют 1 мл хлороформа, 1 - 3 капли триэтиламина (либо дифениламина). Экстракт, приготовленный после встряхивания и отстаивания полученной смеси, исследуют в указанных условиях.

Количественное определение героина, ацетилкодеина и 6-моноацетилморфина проводят с применением метода внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта используют метилстеарат либо подходящий насыщенный неразветвленный углеводород (например, докозан). Перед началом анализа производят калибровку хроматографа с использованием образцов внутреннего стандарта и соответствующего вещества

либо веществ с известным количественным составом.

К пробам исследуемых объектов по 1 мл раствора метилстearата (или докозана) в хлороформе с концентрацией 1 мг/мл и по капле триэтиламина (либо дифениламина). Полученную смесь осторожно встряхивают, выдерживают при комнатной температуре 0,5 - 1,5 ч, после чего полученный экстракт исследуют методом газовой хроматографии.

4.3.2. Методика ТСХ-анализа опиатов в моче.

При ТСХ-скрининге опиатов в объекте моча обязательно добавление щелочных агентов (диэтиламин, аммиак) для устранения взаимодействия ионнообменного взаимодействия.

Лучшей является система растворителей, содержащая этилацетат—метанол—аммиак 17:2:1, так как позволяет отделить морфин от балластных и экстрактивных веществ, которые извлекаются из мочи вместе с морфином. Они увлекаются фронтом растворителя и не мешают идентификации морфина.

Для хроматографирования используют пластины с не модифицированным слоем силикагеля, такие как Silufol, Sorbfil, Merck и др.

ТСХ-скрининг опиатов в объекте кровь, плазма, сухие образцы крови может быть проведен данным методом при условии использования, не модифицированных силикагелевых ВЭТСХ пластин. Основные характеристики хроматографических пластинок см. Приложение 1.

На стартовую линию ТСХ-пластинок наносят в виде точек аликвоты хроматографически очищенных экстрактов из гидролизованной и негидролизованной мочи, эквивалентные 0,5 и 0,1 мл мочи. Для перенесения остатков экстрактов на ТСХ-пластинки используют смесь абсолютного этанола с хлороформом или метанол-хлороформ. Необходимо провести анализ экстракта гидролизуемого стандарта и стандарта для тонкослойной хроматографии, так как соединения, экстрагированные из гидролизованной мочи, как правило, мигрируют в процессе тонкослойной хроматографии более медленно вследствие влияния одновременно экстрагируемых веществ, и это следует принять к сведению при интерпретации результатов анализа.

На стартовую линию той же пластинки наносят метчики - р-ры морфина, кодеина, 3-МAM, 6-МAM в этаноле, пятно каждого анализа отдельно. Хроматографируют в предварительно насыщенных в течение 40-50 мин растворителями хроматографических камерах с бумажными вкладышами. Фронт растворителя 7,5-10 см.

Обнаружение опиатов на хроматограммах проводить при последовательном применении 2 разных реакций на одной и той же пластинке. При этом порядок проведения реакций обнаружения следующий:

1-ю хроматограмму опрыскивают сначала FeCl₃, затем (не менее чем через 30 мин) - реактивом Драгендорфа по Мунье;

на 2-й пластинке сначала проводят реакцию образования псевдоморфина, затем, через 40-50 мин, - пробу Марки-Манделина или Марки.

Псевдоморфин-продукт окисления морфина.

Раствор ферри-ферроцианида калия]: 57,7 мг $K_3Fe(CN)_6$ 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 5 мл основного раствора добавляют 3 мл 6% раствора гидроксида аммония и 2 мл этанола. Полученным раствором хроматограмму опрыскивают до увлажнения пластинки, нагревают при $120^\circ C$ 2 мин., затем исследуют в УФ-свете (254-366 нм). В случае морфина, а также 6-МAM наблюдают лимонно-желтую (254 нм) и ярко-голубую (366 нм) флуоресценцию (образование псевдоморфина). Образование комплексы (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, дицидроморфинон, диацилморфин, апоморфин, меперидин, метадон, апиперидин. Флуоресцирующие пятна образуют нор-морфин, п-аллил-нор-морфин, дицидроморфин, 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 опрыскать пластинку реактивом. Флуоресценция усиливается, пятна, соответствующие морфину, после проявления приобретают через сутки желтоватую окраску, заметную при дневном освещении и сохраняют свою флуоресценцию.

Реакцией Марки чувствительность реакции по Clarke составляет 0,05 мкг морфина, а по исследованиям Л.М. Власенко (1962) обнаруживается 0,3 мкг и реакцией Фреде 0,1 мкг морфина.

Заключение об обнаружении опиатов методом ТСХ дается на основании выявления на хроматограммах зон, совпадающих по значению R_f и характеру окрашивания с хромогенными реактивами с зонами стандартных р-ров метчиков морфина, кодеина, героина.

4.3.3. Методы определения количественного содержания.

- Методы ГЖХ/МС и ВЭЖХ/МС. Преимуществом метода ВЭЖХ для анализа опиатов (особенно в моче) является возможность определения основных метаболитов - глюкуронидов.
- Иммунологические методы.
- Поляризационный иммунофлуоресцентный анализ.

Для расчета количественного содержания применяют "метод добавок", по внутреннему стандарту известной концентрации и градуировочным графикам.

Для количественного определения героина, 6-моноацетилморфина, морфина, ацетилкодеина и кодеина в исследуемых образцах применяют метод абсолютной градуировки. С этой целью детектор хроматографа калибруют с использованием градуировочных растворов определяемых веществ с точно известными значениями их концентраций.

Расчет концентраций определяемых веществ в экстракте исследуемого образца проводят по соответствующим градуировочным графикам.

Расчет массовой доли ($X, \%$) определяемого вещества в масс. составе исследуемого образца проводят по формуле:

$$X = C \times V / m \times 100,$$

где:

C - концентрация определяемого компонента в экстракте навески исследуемого образца, найденная по соответствующему градуировочному графику, мг/мл;

V - объем растворителя в мл;

m - масса навески исследуемого образца, подвергнутая экстракции, мг.

4.4. Исследование образцов слюны.

Опиаты и героин очень быстро метаболизируются в морфин и выводятся со слюной в виде морфина и его глюконизированных метаболитов. Выведение морфина из организма занимает 48 часов. Присутствие морфина и его метаболитов в слюне может быть обусловлено приемом героина, морфина, кодеина или семян снотворного мака.

Сбор и подготовка образцов к анализу

10 мл слюны должны быть собраны в чистый, сухой, пластиковый или стеклянный контейнер, не содержащий консервантов. При невозможности проведения анализа в день взятия образцов, образцы слюны можно хранить в холодильнике при температуре 2-8°C до 7-ми дней, а затем при необходимости образцы могут быть заморожены при температуре -20°C и ниже до момента тестирования. Охлажденные или замороженные образцы перед тестированием должны быть доведены до комнатной температуры и тщательно перемешаны. Образцы слюны, содержащие видимый осадок или помутнение перед тестированием должны быть отцентрифугированы.

К химико-токсикологическим методам анализа на наркотики по слюне относятся:

- 1) поляризационно-флюоресцентный иммуноанализ (ПФИА)
- 2) иммуноферментный анализ (ИФА)
- 3) анализ наркотиков методом хромато-масс-спектрометрии.

5. Заключение.

Схема проведения исследования включает следующие стадии:

- 1) Представительные пробы;
- 2) проведение исследования теми методами, которые требуются для решения поставленного вопроса, в зависимости от оборудования, имеющегося в распоряжении эксперта;
- 3) в случае необходимости проведение исследования по определению количества наркотического средства;
- 4) формулирование выводов.

Интерпретация результатов ХТА по влиянию на организм человека проводится специалистами (экспертами) наркологами.

При определении в моче 6-МAM, морфина и кодеина однозначно имел место прием героина.

В случае обнаружения в моче только морфина и кодеина может быть связано:

- 1. приемом героина, морфина, кодеина и др. с целью злоупотребления;*
- 2. применением морфина или кодеина в медицинских целях;*
- 3. употреблением семян мака в пищевых продуктах.*

6.Список использованных источников.

- 1.Определение морфина в крови и моче/ Рубцов А.Ф. Саломатин Е.М. // Судебно-медицинская экспертиза. — 1974. — №2. — С. 45-48.
2. Материалы издания Всемирной организации здравоохранения «Basic analytical toxicology» Женева 1997 год.,
3. CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS London THE PHARMACEUTICAL PRESS 1986, 4. Clarke's isolation and identification of drugs // The Pharmaceutical Press. London, 1986.
4. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. Наркотики. М.: Триада-Х, 2000.
6. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. М.: Мир, 1965.

Основные характеристики хроматографических пластинок

	ВЭТСХ	Классическая ТСХ
Размер зерна сорбента	5–6 мкм	10–12 мкм
Гранулометрический состав	4–8 мкм	5–20 мкм
Толщина пластин	200 мкм (100 мкм)	250 мкм (200 мкм)
Типичная высота слоя	12 мкм	30 мкм
Среднее расстояние для разделения	3–6 см	10–15 см
Типичное время разделения	3–20 мин.	20–200 мин.
Максимальное количество исследуемых образцов на 1 пластине	<36 (72)	<10
Объем образца	0,1–0,5 мкл	1–5 мкл
Предел обнаружения абсорбции	100–500 пг	1–5 нг
Предел обнаружения флуоресценции	5–10 пг	50–100 пг
Рекомендуемые объемы образца	ТСХ: 4 мкл;	ВЭТСХ: 0,3 мкл

ВЭТСХ силикагелевые пластины производятся на стеклянной и алюминиевой подложке, что делает возможным более широкое их применение. Как и классических пластинах, здесь используются два флуоресцентных индикатора: флуоресцирующий зеленым — F254 и флуоресцирующий голубым, — кислотостойкий F254s. Оба индикатора флуоресцируют в УФ — свете при длине волны 254 нм.