

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



МЕТОДИКА

ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ  
КАННАБИНОИДОВ В СМЫВАХ СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА,  
ЛИЦА, РУК, В КРОВИ, В МОЧЕ, В ТКАНЯХ ВНУТРЕННИХ  
ОРГАНОВ

(шифр специальности – 27.1)

## ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования по определению каннабиноидов в смывах слизистой полости рта, лица, рук, в крови, в моче, в тканях внутренних органов
2. Шифр специальности методики	27.1(6)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»
4. Сущность методики	Выделение искомого вещества из биологического материала, его обнаружение, основанное на методике тонкослойной хроматографии с использованием специфичного реагента
4.1. Объекты исследования	Биологические жидкости и ткани, смывы слизистой полости рта, лица, рук
4.2. Методы исследования	Тонкослойная хроматография
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<ul style="list-style-type: none"><li>- Экстракция.</li><li>- Предварительное исследование</li><li>- Оценка результата</li><li>- Обнаружение методом тонкослойной хроматографии</li><li>- Оценка результата</li></ul>
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	11
6. Список использованных источников	11
7. Приложение	12

## 1. Введение.

Дельта-9-Тетрагидроканнабинол - **психотропное вещество**, содержащееся в конопле посевной (*Cannabis sativa*).

Из легких дельта-9-тетрагидроканнабинол быстро всасывается в кровь, откуда вскоре переходит в ткани. Он метаболизируется преимущественно в печени, где превращается в 11-гидрокситетрагидроканнабинол (психотропное соединение) и более чем в 20 других соединений.

Основные пути метаболизма ТГК ведут к образованию полярных гидроксильных производных, основным из которых является 9-карбокси-11-нор-D9-тетрагидроканнабинол (ТГК-кислота), причем большая часть метаболитов (60-80%) выводится с мочой и калом в форме конъюгатов [1]. Однако, сам ТГК с мочой выводится лишь в следовых количествах [2], в то время как концентрация ТГК-кислоты в моче со временем растет и зависит от дозы ТГК. Так, пик концентрации ТГК-кислоты наблюдается через  $7,7 \pm 0,8$  ( $89,8 \pm 31,9$  нг/мл) и  $13,9 \pm 3,5$  ( $153,4 \pm 49,2$  нг/мл) часов после разового курения дозы, приблизительно 15,8 мг и 33,8 мг ТГК, и обнаруживается до  $33,7 \pm 9,2$  и  $88,6 \pm 9,5$  часов соответственно [3]. Таким образом, наличие ТГК-кислоты является важным показателем для установления факта употребления продуктов конопли. В ходе химико-токсикологического исследования на наличие в организме человека основных действующих веществ конопли каннабиноидов проводится поиск: 9-карбокси-11-нор-9-тетрагидроканнабинола, дельта-8-тетрагидроканнабиноловой кислоты, а также D9-тетрагидроканнабинола (ТГК), 11-гидрокситетрагидроканнабинола. В смыках дополнительно каннабинол (КНБ), каннабидиол (КНД).

Для уменьшения естественных потерь ТГК-кислоты в образцах мочи, отбираемых для исследования на каннабиноиды, их следует хранить в замороженном виде.

Результаты зависимости сохранности ТГК-кислоты в моче от условий хранения, по литературным данным см. Приложение 1.

## 2. Область применения.

Химико-токсикологические исследования на наличие в организме человека основных действующих веществ конопли каннабиноидов - дельта-9-тетрагидроканнабинола (ТГК), каннабинола (КНБ), каннабидиола (КНД), а также их метаболитов.

## 3. Термины и обозначения.

ТГК - D9-тетрагидроканнабинол;

КНБ - каннабинол;

КНД - каннабидиол.

ТГК-кислота - 9-карбокси-11-нор-D9-тетрагидроканнабинол

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.

*Реэкстракт* — отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

**ХТА** — химико-токсикологический анализ.

*Дериватизация* — это получение производных анализируемого вещества, обладающих иными (лучшими с точки зрения используемого аналитического метода) аналитическими свойствами. *Дериватизация* является одним из самых надежных способов хроматографической идентификации различных химических соединений. Сочетание селективности химических реакций получения производных со специфическим детектированием позволяет в большинстве случаев получать практически однозначные результаты при идентификации целевых компонентов в сложных смесях (также иным УФ-спектром, флуоресценцией, термической стабильностью, летучестью и пр.).

TCX-тонкослойная хроматография;

ГХ-газовая хроматография;

ГЖХ-газожидкостная хроматография;

ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография;

МС-масс-спектрометрия

ТФЭ-твердофазная экстракция

hRf- значение  $R_f$  умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель  $R_f$  один из основных показателей в TCX — параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения  $R_f$  проводят как отношение расстояния прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя  $R_f = L/L_0$ . Значение  $R_f$  — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

ВЭТСХ пластины — пластины для высокоеффективной TCX.

#### 4. Процедура проведения исследования.

##### 4.1. Пробоподготовка объекта мочи.

4.1.1. К 10 мл мочи прибавляли 0,5 мл 50% гидроксида натрия и выдерживают на водяной бане при температуре 60°C 20 минут. Добавляют концентрированную соляную кислоту до pH=2 по УИБ и экстрагируют дважды смесью гексана и этилацетата в соотношении 7:1, порциями по 10 мл. Органические фракции объединяют, высушивают безводным натрием сульфатом, экстракт упаривают в токе воздуха до объема около 100 мкл.

4.1.2. Во флакон помещают 1 мл метанола, прибавляют 2 мл исследуемой мочи, 150 мкл 50% раствора NaOH и перемешивают. Флакон плотно

укупоривают и нагревают 10 минут при 60°C. После охлаждения, флакон вскрывают, прибавляют 6 н. раствор соляной кислоты до pH 2-3 и дважды экстрагируют смесь н-гексан-этилацетат (7:1) порциями по 5 мл. Верхний слой отделяют, выпаривают досуха в токе теплого воздуха (40°C).

4.1.3. Пробоподготовка образца мочи с дополнительной дериватизацией.

4.1.3.1. Целочной гидролиз. К 10 мл мочи прибавляют 0,5 мл 50% раствора гидроксида натрия, выдерживают при 60°C в течение 20 минут. К пробе мочи после гидролиза, добавляют концентрированную соляную кислоту до pH 2 (около 1 мл). Экстракцию проводят дважды по 10 мл смеси гексан-этилацетат (7:1). Органическую фазу отделяют, экстракты объединяют и упаривают досуха.

Дериватизация:

К сухому остатку прибавляют 100 мкл безводного ацетона, 2-5 мг карбоната калия и 100 мкл метилиодида. Пробу плотно укупоривают и нагревают при 60°C в течение 40 минут. После охлаждения, флакон вскрывают, растворитель упаривают. Сухой остаток двукратно экстрагируют по 2 мл гексана. Гексановые извлечения объединяют, выпаривают досуха. Пробу реконструируют 100 мкл этанола и 1 мкл исследуют.

4.1.3.2. Пробоподготовка образца мочи для обнаружения 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты (ТГК кислоты) методом ГХ/МС.

Во флакон помещают 1 мл метанола, 1 мл мочи, прибавляют 50 мкл раствора внутреннего стандарта (спиртовой раствор 1 мкг/мл дельта-8-ТГК кислоты), 100 мкл 50% раствора гидроксида натрия и перемешивают. Флакон плотно укупоривают и помещают в термоблок на 10 минут при 60°C. После охлаждения, флакон вскрывают, прибавляют 6 н. раствор соляной кислоты до pH 2-3 и дважды экстрагируют смесь н-гексан-этилацетат (7:1) до сухого остатка в токе теплого воздуха (40°C).

Дериватизация:

К сухому остатку прибавляют 180 мкл безводного диметилсульфоксида и 20 мкл 25% метанольного раствора тетраметиламмония гидроксида, перемешивают (замывая стенки флакона), через 2 минуты прибавляют 30 мкл иодистого метила и флакон выдерживают 20 минут при комнатной температуре. Далее к дериватизационной смеси прибавляют 4 мл гексана и экстрагируют 5 минут (при интенсивном перемешивании). Гексановый экстракт отделяют и упаривают до сухого остатка в токе теплого воздуха (40°C).

*Обратить внимание: Используемые для дериватизации реагенты: ацетон и метилиодид, если они приобретены градации х.ч. можно не перегонять, но ацетон обязательно сузить над безводным карбонатом калия. И ацетон, и карбонат калия следует обновлять (менять осушитель и сузить, соответственно) не реже раза в месяц. О дериватизации: ацетона*

можно брать больше 0,2-0,5 мл, а метилиодида меньше 30-50 мкл, при этом после охлаждения, ацетоновый раствор можно декантировать в чистую посуду и реконструировать не этанолом, а этилацетатом (это не так сильно ударяет по колонке).

#### 4.2. Пробоподготовка объекта смывы с рук и лица.

Отбор проб осуществляется протиранием рук и лица подозреваемого в курении гашиша ватным или марлевым тампоном, смоченным 70% этиловым спиртом.

4.2.1. Экстрагируют каннабиноиды из тампонов два раза диэтиловым эфиром (этилацетатом или этиловым спиртом), порциями по 10 мл в течение 1 минуты. Экстракцию этиловым спиртом проводят при нагревании. Экстракт упаривают до конечного объема 0,1 мл и используют для качественного определения.

#### 4.2. Пробоподготовка объекта слюна.

У лиц, подозреваемых в курении гашиша, в склянку с притертой пробкой вместимостью 100 мл отбирается примерно 10 мл слюны, после чего промывается полость рта 50 мл 70% раствора этилового спирта, который насыщен хлористым натрием (для предупреждения глотания спирта). Слюну и смыв объединяют, склянку закрывают, опечатывают и направляют на исследование в лабораторию.

Слюну смешивают с 50 мл насыщенного раствора натрия хлорида, экстрагируют в делительной воронке этилацетатом трижды, порциями по 10 мл. Органические фазы объединяли, высушивали безводным натрия сульфатом и испаряли в токе воздуха до объема около 100 мкл.

#### 4.3. Выделение каннабиноидов из плазмы крови.

4.3.1. Экстракция. 5 мл крови экстрагируют четырехкратно по 5 мл смеси петролейного эфира (Т кип. 40-60°), содержащего 1,5% пентанола по объему. Объединенный органический экстракт упаривают до объема.

#### 4.3.2. Методика подготовки биологических матриц твердофазной экстракцией на картриджах «High Flow Bond Elut Certify II».

Пробу крови объемом 2 мл помещают в чистую пробирку и добавляют 4 мл ацетонитрила. После центрифугирования при 2500 об/мин в течение 5 минут надосадочную жидкость отбирают, выпаривают до объема приблизительно 3 мл с помощью азота температурой 35-40 °С и добавляют 7 мл 0,1 М раствора ацетата натрия (рН 6,0).

Колонки для ТФЭ конденсируют с помощью сначала 2 мл метанола, а затем 2 мл 0,1 М буферного раствора ацетата натрия, рН 6,0 с 5% метанола. При этом не допускают высыхания патронов до введения пробы. Пробу прокачивают через колонку медленно, со скоростью от 1 до 2 мл/мин. Затем

колонку промывают с помощью 2 мл буферного раствора ацетата натрия, pH 6,0, высушивают при максимальном вакууме в течение приблизительно 5 минут, после чего промывают с помощью 1 мл гексана. ТГК элюируют в нейтральных условиях с помощью 2 мл смеси гексан:этилацетат в соотношении 95:5. После этого проводят промывку с помощью 5 мл смеси метанол: деионизированная вода в соотношении 1:1. Колонку повторно высушивают при максимальном вакууме в течение 5 минут, а затем снова промывают с помощью 1 мл гексана. Элюирование 11-ОН-ТГК и ТГКК выполняют с помощью 2 мл 1% уксусной кислоты в смеси гексан:этилацетат в соотношении 75:25.

*Картриджи «Bond Elut Certify» обеспечивают быструю и эффективную экстракцию соединений, имеющих как неполярную, так и анионную природу, из мочи и других биологических матриц [1]. Сорбент смешанного типа (неполярная фаза C8 и сильная анионнообменная фаза) сочетает в себе преимущества неполярных, полярных и ионообменных свойств, обеспечивая быструю, воспроизводимую, простую и не осложненную загрязнениями экстракцию наркотиков многих классов. Эти колонки позволяют быстро и с высоким выходом извлекать ТГК, 11-ОН-ТГК и ТГКК из цельной крови.*

#### 4.3.3. 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:

- без гидролиза — к пробе мочи прибавляется 100 мг гидрокарбоната натрия;
- кислотный гидролиз — К пробам мочи объемом 5 мл прибавляют по 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флякон 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 10мин и элюируют 3 мл этанола. Элюат испаряют в потоке воздуха при 40-50°C. Для дальнейшего исследования методом хромато-масс-спектрометрии элюаты восстанавливают в соответствующих подвижных фазах.

#### 4.3.4. 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. Пробы 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 виалы.

Для дальнейшего, исследования высокочувствительными инструментальными методами проводят химическую модификацию фракции ТГК и метаболитов. Для чего их объединяют и высушивают. Растворитель выпаривают в атмосфере азота при температуре не выше 40 °C, затем остаток растворяют в 60 мкл толуола и 40 мкл BSTFA с 1% TMCS для химической модификации.

Перед вводом в tandemную квадрупольную систему ГХ-МС пробирки с пробами закупоривают и нагревают в течение 20 минут при 70 °C.

#### 4.4. Выделение из тканей внутренних органов.

##### 4.4.1. Изолированием водой, подкисленной щавелевой кислотой.

Объекты: средние навески измельченных тканей желудка, легкого или почки.

Количество объектов: 70-100г; в исключительных случаях при недостаточном количестве биоматериала – 50г.

Объемы извлечений: 50мл кислого эфирного извлечения при pH=2.

Реактивы для создания pH среды: pH=2 – 10% раствор щавелевой кислоты.

##### 4.4.2. С предварительным гидролизом.

К 70-100граммам измельченных тканей органов, в исключительных случаях при недостаточном количестве биоматериала 50г, прибавляют 50 % раствора гидроксида натрия до реакции среды 10-11, выдерживают при 60°C в течение 60 минут. К пробе после гидролиза, добавляют концентрированную соляную кислоту до pH 2. Экстракцию проводят дважды по 10 мл смеси гексан-этилацетат (7:1). Органическую фазу отделяют, экстракты объединяют и упаривают досуха.

#### 4.4. Исследования методом тонкослойной хроматографии.

4.4.1. Сухой остаток растворяют в 100 мкл хлороформа, замывали стенки флакона и количественно наносят в зону 1 хроматографической пластиинки, предварительно активированной при 80°C в течение 30 мин. В зону 2 наносят спиртовые растворы стандартных образцов. Система: гексан-изо-бутанол-ледянная уксусная кислота (90:9:1), время насыщения 25-30 минут, пробег растворителя 8 см. После подсушивания пластиинки на воздухе, проявляют

последовательной обработкой реагентами А и после подсушивания реагентом Б.

Реагент А: 0,1 % раствор прочного синего ББ в 70% этиловом спирте.

Реагент Б: 10 % водный раствор NaOH.

Результаты исследования:

Положительный результат о наличие каннабиноидов дают при наличии розово-красного или красно-фиолетового пятна с  $hRf$   $36 \pm 4$  (D8-тетрагидроканнабиноловой кислоты), на уровне аналогично окрашенного пятна стандарта.

*Примечание. При проведении медицинского освидетельствования для установления факта употребления наркотических средств необходимо учитывать, что наличие следов гашения на поверхности человеческого тела или на слизистой оболочки ротовой полости может быть обусловлено различными причинами и не всегда может являться доказательством употребления гашения. Окончательное заключение об употреблении гашения должно выноситься на основании данных комплексного обследования специалистами соответствующего профиля.*

4.4.2. Сухой остаток растворяют в 100 мкл хлороформа и количественно наносят в зону 1 хроматографической пластинки, предварительно активированной при  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. В качестве метчиков в зону 2 наносят спиртовые растворы по 10-20 мкг каннабиноидов. Хроматографическую пластинку высушивают в токе теплого воздуха в течение 1 минуты и хроматографируют восходящим способом в ненасыщенной камере. Подвижная фаза – гептан: ацетон: ледяная уксусная кислота (50:50:1). Пластинку высушивают в токе теплого воздуха до исчезновения запаха уксусной кислоты, после чего однократно опускают в раствор прочного синего Б. Пластинку вынимают и высушивают на воздухе в течение 60 секунд, после чего помещают в камеру, насыщенную парами дизтиламина на 10 секунд. Пластинку вынимают и помещают в камеру, насыщенную парами кислоты хлористоводородной. При наличии искомых веществ цвет пятен в контрольных и исследуемой зонах изменяется на пурпурный.

4.4.3. Подвижная фаза: I - петролейный эфир ( $40-70^{\circ}$ ) – диэтиловый эфир 4:1 двукратно.

II – бензол (толуол) без насыщения

Реактив для визуализации: 0,5% раствор прочного синего Б в 10% водном растворе карбоната натрия (или гидроксида натрия).

*Внимание. ТСХ-скрининг в объекте кровь, плазма, сухие образцы крови проводится данным методом при условии использования, не модифицированных силикагелевых ВЭТСХ пластин.*

Для доказательства наличия основных действующих веществ конопли в крови необходимо применять только высокочувствительной методики определения (ГХ/МС и ВЭЖХ/МС).

### 5. Заключение.

В данной методике приведены способы выделения и обнаружения ТГК и его метаболитов в моче, смывах, слюне, тканей внутренних органов. Описанная процедура является сводом методик используемых в химико-токсикологическом исследовании на ТГК и его метаболитов в биологических объектах.

Для образцов крови (плазмы) приведены методики выделения и рекомендованы способы обнаружения высокочувствительными методами.

Приведены методики подготовки биологических матриц методом твердофазной экстракции.

### 6. Список использованных источников.

1. R.M Sears, Solid Phase Extraction of THC, THC-COOH and 11-OH-THC from Whole Blood, Agilent Technologies Application Note 00315. (Твердофазная экстракция ТНС, ТНС-СООН и 11-ОН-ТНС из цельной крови, Agilent Technologies, методическая информация 00315).
2. Катаев Сергей Сергеевич/ Обнаружение 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновой кислоты (ТГК кислоты) в моче методом ГХ/МС//СМЭ, 2005, №2, с.35-38.
3. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. - М.: "Мысль", 1993.
4. Baselt R.C., Cravey R.H. Disposition of Toxic Drug and Chemicals in Man.- 4-d Ed.- Chemical Toxicology Institute Forest City.- California. - 1995.
5. Huestis M.A., Mitchell J.M., Cone E.J. // J. Anal. Toxicol. - 1996.- Vol.20, №6.- P.441-452.
6. «Быстрое и надежное обнаружение тетрагидроканнабинола и его метаболитов в крови». Стивен Бауман, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA 95051, USA (США)//www.agilent.com/chem

## Сохранение ТГК-кислоты в моче в зависимости от условий хранения.

Время хранения	Условия хранения	Снижение концентрации в %
10 дней	при комнатной температуре	более 22,4
4 недели	в холодильнике	8,1
40 дней	замороженные	8,0± 1,6
1 год	замороженные	15,8± 4,2
3 года	замороженные	19,6±6,7

Fraga S.G., Estevez J.F., Romero C.D. // Ann. Clin. Lab. Sci.- 1998.- Vol.28, №3.- P.160-162.