

НАРКОЛОГИЯ

УДК 615.212.7:340.67]:616.15:57.08 (045)

Оригинальная статья

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ТРУПНОЙ МОЧЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В КРОВИ ПРИ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА НАРКОТИКИ

Е. Н. Бычков — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, доцент кафедры психиатрии и наркологии, кандидат медицинских наук; **С. А. Серкова** — ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» министерства здравоохранения Саратовской области, врач-эксперт; **Л. А. Арсентьева** — ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» министерства здравоохранения Саратовской области, главный специалист; **Т. С. Французова** — ГУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» министерства здравоохранения Саратовской области, врач химического отделения; **Г. А. Блувштейн** — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, заведующий кафедрой факультетской хирургии, профессор, доктор медицинских наук; **В. Б. Бородулин** — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, заведующий кафедрой биохимии, профессор, доктор медицинских наук.

GENERAL METHODS OF IDENTIFICATION OF NARCOTIC SUBSTANCES IN CADAVERIC URINE AND BIOCHEMICAL INDICES IN BLOOD AT POSITIVE IDENTIFICATION OF DRUG SUBSTANCES

E. N. Bychkov — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Psychiatry and Narcology, Assistant Professor, Candidate of Medical Science; **S. A. Serkova** — Saratov Bureau of Forensic Medical Examination, Expert; **L. A. Arsentieva** — Saratov Bureau of Forensic Medical Examination, Main Expert; **T. S. Frantsuzova** — Saratov Bureau of Forensic Medical Examination, Chemical Department; **G. A. Bluvshstein** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Faculty Surgery, Professor, Doctor of Medical Science; **V. B. Borodulin** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Head of Department of Biochemistry, Professor, Doctor of Medical Science.

Дата поступления — 19.01.2011 г.

Дата принятия в печать — 07.09.2011 г.

Бычков Е. Н., Серкова С. А., Арсентьева Л. А., Французова Т. С., Блувштейн Г. А., Бородулин В. Б. Основные методы идентификации наркотических веществ в трупной моче и определение биохимических показателей в крови при положительных исследованиях на наркотики // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т. 7, № 3. С. 642–646.

Представлены методы идентификации наркотических веществ, описаны хроматографические и спектральные характеристики наркотических веществ. Изучены взаимосвязи между биохимическими показателями при положительных исследованиях на наркотические вещества. Обнаружено увеличение концентрации мочевины в трупной крови наркоманов по сравнению с контрольными образцами.

Ключевые слова: наркотические вещества, хроматография, спектроскопия, моча, креатинин.

Bychkov E. N., Serkova S. A., Arsentieva L. A., Frantsuzova T. S., Bluvshstein G. A., Borodulin V. B. General methods of identification of narcotic substances in cadaveric urine and biochemical indices in blood at positive identification of drug substances // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2011. Vol. 7, № 3. P. 642–646.

The goal of the present paper was to find effective biochemical markers of chronic narcotization. *Materials and methods.* The results of biochemical research of biological liquids in human organism and chromatographic methods of drug substances identification in cadaveric urine were analyzed. Research of 197 samples of different biologic liquids of 10 persons was carried out. Control was fulfilled on the basis of 135 samples of biological liquids took of 12 persons. Methods of identification of drug substances are presented, chromatographic and spectral characteristics of drug substances are described. Interrelations of biochemical indices at positive study of drug substances identification were conducted. The increased urea metabolic concentration in cadaveric blood of drug addicts was revealed in comparison with control specimens. *Results.* (Numeral results are given in Table 3). Correct correlation of biochemical markers was not established. *Conclusion.* The present results suppose continued study of informative reliable biochemical markers of chronic drug intoxication.

Key words: narcotic substances, chromatography, spectroscopy, urea, creatinine.

Введение. Злоупотребление наркотиками и другими веществами, вызывающими зависимость, весьма распространено, несмотря на меры, принимаемые мировым сообществом. В последнее время отмечается распространение полинаркомании, связанной с употреблением «лекарственных коктейлей» для усиления наркотического действия. Основным критерием диагностики отравлений наркотическими веществами является положительный результат судебно-химического исследования тканей и биологических сред трупа. Судебно-медицинская экспертиза трупов с исследованием биологического материала на наличие наркотических средств включает в себя

хроматографические методы анализа, такие, как тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, газовая хроматография и другие. Для определения наркотических веществ чаще всего используется моча, как наиболее информативный биообъект исследования.

Методы. Среди методов обнаружения наркотических веществ использовали тонкослойную хроматографию и спектрофотометрию [1, 2]. Хроматография как физико-химический процесс основана на различных скоростях движения и размытия концентрации зон компонентов, которые движутся в потоке подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы. При этом следует иметь в виду, что исследуемые вещества находятся в обеих фазах. После разделения анализируемой смеси на отдельные

Ответственный автор — Бычков Евгений Николаевич.
Адрес: 410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112.
Тел.: 89172007474.
E-mail: bychkov-2005@yandex.ru

компоненты хроматографирование прекращают и в хроматографических зонах проводят качественное и количественное определение (детектирование). Для обнаружения бесцветных соединений чаще всего используют облучение УФ-светом, опрыскивание химическими реагентами, смачивание проявляющим раствором, капельное нанесение реагента, экстрагирование зоны вещества с сорбента для последующего исследования полученных соединений физическими и химическими методами. Идентификация компонентов проводится по свидетелям (метчикам) — известным эталонным веществам сравнения, хроматографируемым одновременно, на одной и той же пластинке, с анализируемой пробой.

Основными системами для двумерной хроматографии наркотических веществ являются: 1) для опиатов: хлороформ — диоксан — ацетон — 25%-ный раствор аммиака (45:47.5:5:2.5), этилацетат — этанол — аммиак (9:1:0.5); 2) для амфетаминов: хлороформ — ацетон — этанол — 25%-ный раствор аммиака (20:20:3:1), толуол — этанол — триэтиламин (9:1:1) [3]. Основной качественной характеристикой тонкослойной хроматографии является величина R_f , которая представляет собой отношение расстояний, которые пройдены исследуемым веществом и подвижной фазой [4]. Для определения R_f очень важно точно установить положение фронта растворителя. При полном совпадении полученного значения с R_f известного соединения можно говорить только о возможной идентичности вещества, которую дополнительно подтверждали спектрофотометрией [5].

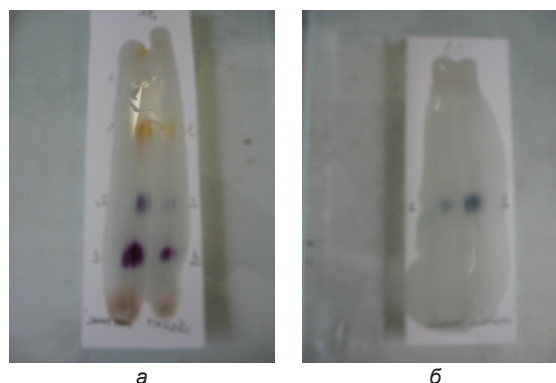


Рис. 1. Система: этилацетат — этанол — 25%-ный аммиак (9:1:0,5). Реагент — реактив Марки. Объект — моча (а)
Система: хлороформ — ацетон — этанол — 25%-ный аммиак (20:20:3:1). Реагент — реактив Марки. Объект — моча (б)

В скрининге наркотических веществ используются следующие реагенты для обнаружения: 1) реактив нингидрина, 2) реактив Драгендорфа, 3) реактив Манделина, 4) реактив Марки, 5) реактив Фреде; 6) 1%-ный раствор Черного прочного К (ФВК). Помимо производных амфетамина ФВК дает различные окрашивания (красного, синего, оранжевого, фиолетового цвета) с некоторыми другими веществами (табл. 1, рис. 1–3).

На рисунках 1–3 представлены пластинки «Сорбфил» с нанесенными на них объектами и метчиками

Таблица 1

Сравнительные значения R_f наркотических веществ на пластинках «Сорбфил»

Вещества (нарк.)	Вид систем							
	основная система	R_f	основная система	R_f	основная система	R_f	основная система	R_f
Морфин	Этилацетат — этанол — 25% аммиак (9:1:0.5)	0.2	Хлороформ — диоксан — ацетон — 25% аммиака (45:47.5:5:2.5)	0.17	-	-	-	-
Кодеин	Этилацетат — этанол — 25% аммиак (9:1:0.5)	0.34	Хлороформ — диоксан — ацетон — 25% аммиака (45:47.5:5:2.5)	0.41	-	-	-	-
Промедол	Этилацетат — этанол — 25% аммиак (9:1:0.5)	0.69	Хлороформ — диоксан — ацетон — 25% аммиака (45:47.5:5:2.5)	0.72	-	-	-	-
Героин	Этилацетат — этанол — 25% аммиак (9:1:0.5)	0.60	Хлороформ — диоксан — ацетон — 25% аммиака (45:47.5:5:2.5)	0.48	-	-	-	-
МДА	Хлороформ — ацетон — этанол — 25% водный раствор аммиака (20: 20:3:1)	0.66	Толуол — этанол — триэтиламин (9:1:1)	0.46	Метанол — конц. аммиак (100:1.5)	0.41	Этилацетат — метанол — конц. аммиак (85:10:5)	0.62
МДМА		0.23		0.46		0.31		0.62
МДЕА		0.46		0.64		0.35		0.63
ДОМ/STP		0.46		0.43		0.41		0.62
ПМА		0.64		0.36		0.37		0.65
ДМА		0.54		0.42				
ТМА		0.43		0.30				
ДОБ		0.41		0.40				
ДОХ		0.60		0.43				
МБДБ		0.41		0.62				
БДБ		0.74		0.59				
ДОЭТ		0.52		0.40		0.36		0.61
Мескалин		0.5		0.12		0.44		0.66
Метамфетамин		0.38		0.46		0.33		0.63

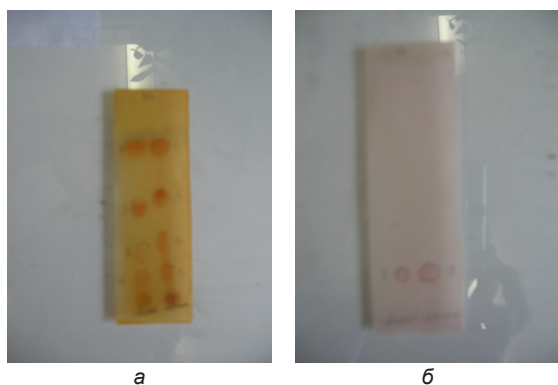


Рис. 2. Система: хлороформ – диоксан – ацетон – 25%-ный аммиак (45:47,5: 5:2,5).
Реагент – реактив Драгендорф. Объект – моча (а)
Система: метанол – конц. аммиак (100:1,5)
Реагент – 1%-ный раствор Черного прочного, 1М раствор едкого натра. Объект – моча (б)



Рис. 3. Система: этилацетат – метанол – конц. аммиак (85:10:5). Реагент – 1%-ный раствор Черного прочного, 1М раствор едкого натра. Объект – моча

после прогонки в основных камерах и опрыскивания реагентами

В основе количественных определений спектральными методами лежит закон Бугера — Ламберта — Бера, устанавливающий зависимость между оптической плотностью и концентрацией анализируемого раствора (табл. 2).

В работе использовались биохимические методики.

Определение ацетилхолинэстеразы (АХЭ) по методу Хестрина.

В пробирку помещали 1,5 мл фосфатного буфера с pH 7,6 по УИБ, 0,5 мл дистиллированной воды, 1 мл исследуемой крови в разведении 1:8 и 1 мл 0,4%-ного раствора ацетилхолинхлорида. Смесь термостатировали при периодическом встряхивании в течение 30 мин. Затем в пробирку добавляли 1 мл 25%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, через 10 мин. содержимое пробирки отфильтровывали. К 1 мл безбелкового фильтрата добавляли 2 мл смеси растворов из 3,5н едкого натра и 2н солянокислого гидроксилламина в соотношении 1:1, 1 мл соляной кислоты в разведении 1:2, 1 мл 0,37м раствора хлорного железа в 0,1н растворе соляной кислоты. Раствор колориметрировали на КФК-3 при длине волны 510 нм, в кювете толщиной слоя 5,05 мм. В качестве раствора сравнения использовали контроль на реактивы. Концентрация неразрушенного ацетилхолинхлорида в растворе имеет линейную обратно пропорциональную зависимость от активности ацетилхолинэстеразы. Кроме того, проводили определение концентрации гемоглобина. В пробирку отмеряли 2 мл трансформирующего раствора из набора «Диахим-Гемциан», добавляли 0,2 мл разведенной крови 1:8, инкубировали при температуре 20°С 15 мин. Центрифугировали 10 мин. при 15 тыс. об/мин. Затем снимали оптическую плотность на КФК-3 при длине волны 540 нм в кювете толщиной слоя 5,05 мм. В качестве раствора сравнения использовали контроль на реактивы.

Таблица 2

Спектральные характеристики наркотических веществ

Вещество	Растворитель	λ макс, нм
Морфин	н HCl	285
	0.1 н NaOH	205,298
Кодеин	Этанол	286
	н HCl	211,285
	0.1 н NaOH	284
Кодеина фосфат	Вода	284
Тебаин	0.1 н HCl	284
	0.1 н NaOH	284
Героин	0.1 н HCl	278
	0.1 н H2SO4	279
	Этанол	281
	0.1 н NaOH	278
Амфетамины: МДА	Водный раствор	286
МДМА		286
МДЕА		286
ДОЭТ		289
МБДБ		286
ПМА		275
ДОБ		295
Мескалина сульфат		268

Активность холинэстеразы прямо пропорциональна концентрации гемоглобина.

Расчет проводили по формулам:

$$Q_{on} = \frac{8 \cdot 8 \left(100 - \frac{E_{оп}}{E_{см}} \cdot 100 \right)}{100} \quad (1),$$

где 8 — постоянная;
8 — разведение крови;

$$100 - \frac{E_{оп}}{E_{см}} \cdot 100 \text{ — \% разрушенного ацетилхолинхлорида;}$$

$E_{оп}$ — оптическая плотность опытного образца;
 $E_{см}$ — оптическая плотность стандартного раствора;
 E_{Hb} — оптическая плотность гемоглобина.

После математических преобразований формула (1) принимает вид линейной зависимости:

$$Q_{on} = 64 - E_{оп} \cdot F,$$

где $F = 64 / E_{Hb}$.

Определяем оптические плотности $E_{оп}$ и $E_{см}$.

$$C_{Hb} = F_2 \cdot E_{Hb}, \quad (2),$$

где $F_2 = 64,74$,

Определяем оптическую плотность E_{Hb} ,

$$Q = \frac{Q_{on}}{Chb + 10,7} \cdot 331 \quad (3),$$

$$\% \text{ отклонения} = 100 - \frac{Q \cdot 100}{282(382)} \quad (4).$$

Определение мочевины в крови основано на измерении скорости образования окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом в сильнокислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа.

0,5 мл крови с 4,5 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. К 0,02 мл полученной надосадочной жидкости добавляли 2 мл реактива, полученного путем смешивания равных количеств 0,9 н серной кислоты и реактива на мочевины (диатилмонооксим 5 ммоль/л, тиосемикарбазид 0,08 ммоль/л и трехвалентное железо 25 ммоль/л). В качестве контроля раствор мочевины с концентрацией 16,65 ммоль/л. Растворы ставили на кипящую водяную баню на 10 мин. Реакционная смесь дает с мочевиной розовое окрашивание. Концентрация мочевины прямо пропорциональна его оптической плотности и рассчитывается по формуле: $C = F \cdot E_{оп}$, $F = 16,65 / E_{см}$. Раствор колориметрировали на КФК-3, кювета 5,05 мм, длина волны 500 нм, определяли оптическую плотность и концентрацию мочевины.

Определение креатинина крови основано на измерении скорости образования окрашенного комплекса креатинина с пикриновой кислотой в щелочной среде.

0,5 мл крови добавляли 0,5 мл трихлоруксусной кислоты с концентрацией 1,22 ммоль/л, 1 мл дистиллированной воды, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. К 1 мл надосадочной жидкости добавляли 0,5 мл пикриновой кислоты с концентрацией 0,04 ммоль/л и 0,5 мл едкого натра с концентрацией 0,75 ммоль/л, перемешивали и оставляли на 20 мин при комнатной температуре. В качестве контроля использовали раствор, со-

стоящий из смеси креатинина 445,2 мкмоль/л и альбумина 20 г/л. Раствор сравнения — водный раствор пикриновой кислоты. Реакционная смесь дает с креатинином желто-оранжевое окрашивание. Концентрация креатинина прямо пропорциональна его оптической плотности и рассчитывается по формуле: $C = F \cdot E_{оп}$, $F = 0,177 / E_{см}$. Раствор колориметрировался на КФК-3, кювета 5,05 мм, при длине волны 500 нм, измеряли оптическую плотность и концентрацию креатинина.

Результаты. Проведенный анализ десяти исследований трупной крови при положительных реакциях на наркотические вещества выявил следующее: 1) показатели ацетилхолинэстеразы в пяти случаях были в пределах нормы (292–334 ЕхНб), в трех случаях были понижены на 2, 5 и 28% и в двух случаях повышены на 5 и 17%; 2) показатели мочевины в трех случаях укладывались в границы нормы (3,0–5,0 ммоль/л), в двух случаях были ниже нормы, а в пяти случаях повышены; 3) показатели креатинина в двух случаях были в пределах нормы (0,12–0,26 ммоль/л), в трех случаях понижены, а в пяти случаях повышены (табл. 3).

Таблица 3

Соотношения биохимических показателей в трупной крови при положительных исследованиях на наркотические вещества и в контроле

Биохимический показатель	Контроль	Исследуемая группа	
	(M±m)	(M±m)	P
АХЭ	312±22	338±24	P>0,05
Креатинин	0,19±0,07	0,22±0,08	P>0,05
Мочевина	4±0,87	7,5±0,8	P<0,05

В качестве контроля брали трупную кровь при отрицательных результатах исследования на наркотические вещества. Из табл. 3 видно, что биохимические показатели ацетилхолинэстеразы и креатинин не являются достоверными величинами и находятся в интервале P>0,05. В то же время концентрация мочевины в трупной крови потребителей наркотиков была выше по сравнению с контролем (P<0,05).

Обсуждение. Проведенное исследование позволяет говорить о несовпадении результатов биохимических исследований крови при наличии наркотических веществ и их дериватов в моче наркотизирующихся, несовершенстве имеющихся на сегодняшний день методов биохимического подтверждения потребления наркотических препаратов. Полученные результаты стимулируют поиск информативных биохимических маркеров при положительных исследованиях трупной крови на наркотические вещества.

Выводы:

1. Какой-либо зависимости между показателями ацетилхолинэстеразы и креатинина в трупной крови при положительных исследованиях на наркотические вещества не выявлено. Обнаружено увеличение концентрации мочевины в трупной крови потребителей наркотиков.

2. Целесообразно продолжить поиск информативных биохимических маркеров при положительных исследованиях трупной крови на наркотические вещества.

Библиографический список

1. Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических средств: метод. рук-во для врачей. М.: Медицина, 1993. С. 9–11.
2. Значение биохимических исследований в комплексной диагностике острых отравлений опиатами/Г. В. Михайлова, О. Г. Асташкина, Е. Ю. Павленко [и др.] // Альманах судебной медицины. 2003. Вып. VI. С. 88–91.
3. Экспертное исследование производных амфетамина/И. Г. Алексеев, А. В. Беляев, М. А. Дроздов [и др.]. М.: Медицина, 1998. 25 с.
4. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия. Киев, 1989 С. 184–190.
5. Калетина Н. И. Токсикологическая химия: Метаболизм и анализ токсикантов. М.: ГЭОТАР-Медиа2008. С. 440–450.

References

1. Eremin S. K., Izotov B. N., Veselovskaja N. V. Analiz nar-koticheskikh sredstv: metod. ruk-vo dlja vrachej. M.: Medicina, 1993. S. 9–11.
2. Znachenie biohimicheskikh issledovanij v kompleksnoj diag-nostike ostryh otravlenij opiatami/G. V. Mihajlova, O. G. Astash-kina, E. Ju. Pavlenko [i dr.] // Al'manah sudebnoj mediciny. 2003. Vyp. VI. S. 88–91.
3. Jekspertnoe issledovanie proizvodnyh amfetami-na/I. G. Alekseev, A. V. Beljaev, M. A. Drozdov [i dr.]. M.: Medici-na, 1998. 25 s.
4. Kramarenko V. F. Toksikologicheskaja himija. Kiev, 1989 S. 184–190.
5. Kaletina N. I. Toksikologicheskaja himija: Metabolizm i analiz toksikantov. M.: GJeOTAR-Media2008. S. 440–450.