

УДК 543.6

Ю.В. БОХАН, Ф.О. ЧМИЛЕНКО, О.В. ТЕРЕЩЕНКО

СПРОЩЕНЕ ДЕНСИТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕТРАГІДРОКАННАБІНОЛУ В СУДОВО-ХІМІЧНІЙ ЕКСПЕРТИЗІ

Науково-дослідний експертно-криміналістичний центр при УМВС України в Кіровоградській області,
м. Кіровоград

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
Кіровоградський державний педагогічний університет ім. Володимира Винниченка

Наведена методика оцифровки зображення ТШХ – пластинки, що дозволяє створити принципово новий підхід до ідентифікації та кількісного визначення каннабіноїдів в аналітах судово-медичної та криміналістичної експертизи та дає можливість використати математичний апарат для виконання кількісних розрахунків, сприяючи підвищенню точності та відтворюваності результатів. Показано, що загальний кількісний вміст тетрагідроканнабінолу (%) за методикою оцифровки зображення хроматографічної пластинки може бути критерієм, що дозволяє зв'язати кількість наркотично активного компонента з видом об'єкта.

Вступ

Результати експертного дослідження наркотичних засобів — одне з джерел доказів при розслідуванні і судовому розгляді справ про зберіган-

ня, виготовлення та збут наркотичних засобів, незаконний посів і вирощування наркотиковмісних рослин, а також в інших випадках, коли вживання наркотичних засобів сприяє скоєнню злочинів.

На першому етапі таких досліджень вирішується питання про віднесення досліджуваного об'єкта до наркотичного засобу або наркотиковмісних рослин. Другим етапом проведення експертизи такого роду є кількісне визначення наркотичного компонента у аналіті, представленому на дослідження. Аналіз судово-слідчої та експертної практики свідчить про те, що при розгляді справ про незаконні дії з наркотиками на Кіровоградщині найбільш поширеними об'єктами є наркотичні засоби рослинного походження (одержувані переважно з конопель і маку). Це обумовлено їх доступністю та простотою виготовлення. Конопля - наркотиковмісна каннабіоїдна рослина, що виростає на території України. З конопелі отримують такі наркотичні засоби як каннабіс, смола каннабісу, екстракт та настойки каннабісу. Будь-які інші наркотики, отримані на основі конопель можуть бути віднесені до одного з цих видів.

Реальні результати в хімії каннабіоїдів були досягнуті лише в 30-і роки нашого століття, саме тоді були описані способи виділення трьох індивідуальних сполук (каннабіолу (КБА), каннабідіолу (КБД) і тетрагідроканнабінолу (ТГК)) і вперше наведено їх правильні сумарні формули [1]. Усі каннабіоїди мають спільну хімічну будову і з повною підставою можуть бути об'єднані в одну групу природних фенолів. У рослинному матеріалі конопель зазвичай переважають три речовини КБА, ТГК та КБД та деякі їх кислотні похідні. Решта каннабіоїдів міститься в міnorних чи слідових кількостях. Наркотично активною речовиною в коноплях є тетрагідроканнабінол. Наявність даної речовини обумовлює наркотичний ефект і дає підставу для віднесення досліджуваного об'єкта до наркотичних засобів. Відомо, що оцінювання виду наркотичних засобів, виготовлених з конопель проводять за вмістом тетрагідроканнабінолу. Приблизний вміст тетрагідроканнабінолу (мас.ч., %) у наркотичному засобі дозволяє зорієнтувати експерта на вид наркотичного засобу: каннабіс (0,1–1,5% ТГК); смола каннабісу (2–4% ТГК); екстракт і настойки каннабісу (20–30% ТГК) [2]. Сформована в експертно-криміналістичних підрозділах органів внутрішніх справ практика використання методик якісного тонкошарового хроматографічного визначення каннабіоїдів не дозволяє встановити взаємозв'язок між вмістом наркотично активного компонента (ТГК) та видом наркотичного засобу.

Простими і ефективними методами визначення вмісту каннабіоїдів є хроматографічні методи, найпоширенішим серед яких є метод тонкошарової хроматографії [3,4]. Жодний з фізико-хімічних методів не може конкурувати з хроматографією за універсальністю використання та ефективністю розділення складних багатокомпонентних сумішей. Окрім того, це дуже чутливий метод дослідження речових доказів у «слідових» кількостях, що

відрізняється доброю відтворюваністю результатів експертного дослідження, експресністю та доступністю апаратурної бази. За допомогою даного методу можливо якісно визначити наявність головних каннабіоїдів, і зокрема тетрагідроканнабінолу, що дає підставу віднести експерту представлений об'єкт до наркотичних засобів, виготовлених з конопель. Однак, основною проблемою ТШХ — аналізу наркотичних засобів з візуальною реєстрацією аналітичного сигналу є неможливість збереження результатів хроматографування протягом тривалого часу та як наслідок неможливість виконання повторних вимірювань величини R_f і оцінювання кількісного параметра — площини плями. Крім того, фонові складові хроматограми виступає як значущий фактор, що сприяє підвищенню величини межі виявлення, тобто зниженню чутливості аналізу.

Треба зазначити, що при досить розвинених методах підготовки та нанесення проб, проявлення речовин, при використанні сучасних сорбційних матеріалів методи розшифровування та оцінювання результатів аналізу, що були одержані методом тонкошарової хроматографії не дозволяють використовувати цей метод для виконання точного кількісного аналізу. В основному пропонуються традиційні способи кількісного трактування результатів хроматографування у тонкому шарі сорбенту:

- геометричний метод вимірювання площини плями;
- денситометрія з використанням спеціального досить високовартісного обладнання.

В роботі пропонується використати величину загального кількісного вмісту тетрагідроканнабінолу (мас.ч., %), отриману за допомогою аналізу результатів тонкошарової хроматографії програмними методами, заснованими на використанні залежності «функція від площі хроматографічного плями ~ функція від кількості речовини» та методом кольориметрії з оцифрованою зображення хроматографічної пластинки за допомогою цифрової техніки та графічних редакторів, у виявлених об'єктах, як критерій, що дозволяє зв'язати кількість наркотично активного компонента з видом наркотичного засобу, що дає підставу для кваліфікації злочину.

Матеріали та методика дослідження

Кількісний метод визначення каннабіоїдних сполук (ТГК) виконувався методом тонкошарової хроматографії на готових хроматографічних пластинках типу Silufol UV-254 на полімерних та алюмінієвих підложках в системі розчинників: петролейний ефір — діетиловий ефір (80:20) з реактивом міцним синім Б за стандартною методикою. Хроматографування здійснювали висхідним методом в попередньо насичених камерах. Для детектування каннабіоїдів на хроматограмі використовували 0,1%-ний розчин міцного синього Б в 70% етанолі. Сушили хроматограму в потоці теп-

Градуювальні характеристики кількісного визначення ТГК з використанням оцифровки зображення хроматографічної пластини

Джерело електронного образу	Поліноміальна регресія	Лінійна регресія
Сканер	$Y=7,9 \cdot 10^{-2} X^2 + 78,09X + 345,54$	$Y=98,22X - 567,56$
Цифровий фотоапарат	$Y=8,0 \cdot 10^{-3} X^2 + 18,45X - 63,54$	$Y=9,57X + 33,45$

лого повітря та обробляли 10%-ним розчином гідроксиду натрію. Основний компонент — ТГК виявлявся червоно-фіолетовою плямою з hR_f 36 ± 4 , паралельно аналогічно забарвленій плямі стандарту (hR_f 37). При дослідженні наркотичних засобів, виготовлених з конопель в якості екстрагенту використовували етилацетат. Співвідношення між пробою (г) та кількістю екстрагенту (мл) зберігали 1:10. Одержаний екстракт залишали для збільшення повноти екстракції на 60 хв за кімнатної температури. Екстракт наносили на лінію старту хроматографічної пластини у вигляді плями діаметром не більше 0,3 см. Одночасно наносили в якості стандарту розчин ТГК у концентраціях від 1 до 30%.

Після проявлення та висушування пластини оцифровували. Реалізацію можливостей методу денситометрування [5,6] здійснювали за допомогою сучасної цифрової та оргтехніки. Розподільча здатність використаного сканеру «Hewlett Packard Scanjet 3500 Series» складає 600 dpi (42 мкм). Така точність для виконання напівкількісного ТПХ-аналізу є достатньою. Похибка сканування зображення при лінійних розмірах плями 1 см буде складати менше ніж 0,5%. Для збільшення точності аналізу рекомендовано використати професійні сканери з вищою розподільчою здатністю.

Пластинку після хроматографування, проявлення та висушування сканували або фотографували за допомогою цифрового фотоапарата. Сканування тонкошарових хроматограм виконували з використанням сканера Hewlett Packard Scanjet 3500 Series, який з'єднаний з комп'ютером на базі процесора Intel Celeron (256 Mb, операційна система Windows XP). Хроматограму поміщували в сканер і сканували в режимі RGB з розширенням 600 dpi (42 мкм). За допомогою сканера отримували цифрове зображення хроматограми та зберігали його у вигляді рисунка (формат BMP). Таким чином, сама хроматографічна пластинка втрачала значення носія аналітичної інформації та її заміщував електронний образ. Визначення параметрів кольору хроматограми виконували у Adobe Photoshop CS32 Version 9.0; математичну обробку одержаних результатів виконували у MS Office Excel 2003. Значення площини хроматографічної зони визначали палітрою "Histogram", після виділення останніх інструментом "Magnetic Lasso" (Photoshop) або за допомогою стандартного програмного забезпечення (програми — ДенсітоАналіз і ТСХ-менеджер версія 3.1.0 2005 тощо [7–10]). Цифрове зображення хроматограми являє собою біто-

ву матрицю. За допомогою програм визначали точки початку та кінця хроматографування, а також фіксували необхідні плями каннабіноїдів. Програми встановлюють колір фону, що відповідає максимальній інтенсивності. Середня точка плями ТГК встановлюється як середнє арифметичне координат точок, що належать плямі, тобто відрізняються від кольору фону хроматограми.

Результати дослідження та їх обговорення

Площину плями ТГК розраховували методом Монте-Карло з врахуванням співвідношення:

$$S_{\text{п}}/S_{\text{пр}} \approx k/n,$$

де $S_{\text{пр}}$ — площа прямокутника $P1 \cdot P2$, що виділяє пляму ТГК на зображенні; n — достатньо велика кількість випадкових точок у прямокутнику, що прийняті за рівномірним законом розподілу; k — кількість точок n , що потрапили у забарвлену зону плями.

За одержаними розрахунковими даними будували графічну залежність площини плями $S_{\text{п}}$ від концентрації ТГК та розраховували вміст його у екстракті.

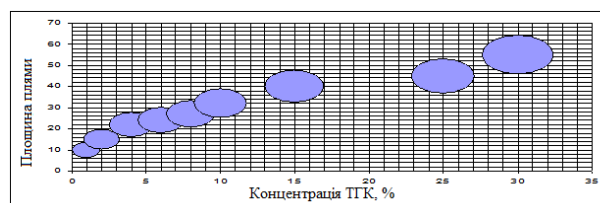


Рис. 1. Залежність концентрації тетрагідроканнабінолу, % від площини плями на хроматограмі (аналіз хроматограми програмними методами: ДенсітоАналіз та ТСХ-менеджер версія 3.1.0 2005)

Растрові маніпуляції з електронним образом хроматограми — зміна різкості та інтенсивності зображення, зміна параметрів яскравості та контрастності, можливість перегляду хроматограми у негативі сприяють зменшенню межі виявлення. Вказані маніпуляції дозволяють зробити практично непомітну для людського ока «пляму» аналізованої речовини чітко детектованою. Градуювальна залежність площини плями ($S_{\text{п}}$) — концентрація ТГК (%), побудована в діапазоні концентрацій 1,0–30,0% та описується рівнянням поліноміальної регресії другого ступеня. Для встановлення даної залежності необхідно використовувати більш

ніж три стандартних розчини ТГК (калібратори), що в умовах повсякденної експертної практики веде до зниження продуктивності аналізу. Для спрощення було запропоновано використання лінійної регресії для зменшення кількості калібраторів до двох. Подібні залежності були встановлені для варіанту аналізу з використанням планшетного сканера та цифрового фотоапарата для отримання електронного образу хроматограм (табл. 1).

Результати контролю правильності методики визначення ТГК з використанням модельних розчинів речовин, що містять ТГК надані у табл. 2.

Таблиця 2

Результати контролю правильності кількісного визначення ТГК з використанням оцифровки зображення хроматографічної пластинки

Стандартні розчини ТГК, %	Введено, %	Δ, %	
		Цифровий фотоапарат	Сканер
10,0; 25,0	5,0	9,2	8,5
15,0; 30,0	10,0	7,1	6,4
5,0; 20,0	30,0	6,1	5,3

Відносна похибка середнього значення вмісту ТГК у модельних розчинах в діапазоні концентрацій 5,0–30,0% не перевищує 9,2% при використанні для одержання електронного образу хроматограми цифрового фотоапарата та 8,5% у випадку сканування зображень хроматографічних пластинок, тому перевагу варто віддавати саме такому способу одержання електронного образу хроматограм. Найменша величина похибки спостерігається при концентрації ТГК – 30,0%.

Таким чином, загальний кількісний вміст тетрагідроканнабінолу (%), отриманий за допомогою аналізу результатів тонкошарової хроматографії методом оцифровки зображення хроматографічної пластинки може бути критерієм, що дозволяє зв'язати кількість наркотично активного компонента з видом наркотичного засобу. Так, у реальних досліджуваних зразках наркотичних сумішей, виявлена концентрація ТГК після аналізу хроматограми запропонованим методом не перевищувала 4%, що підтверджує належність даного наркотичного засобу на основі конопель до певного виду (смола каннабісу).

Площа хроматографічної плями при фіксованій кількості стандарту залежить від наступних факторів: типу адсорбційного матеріалу пластинки, розчинника, температури, часу розгонки тощо. При виконанні дослідження із використанням стандартних розчинів ТГК пляма добре візуалізується та має чітку правильну форму з добре окресленими краями, тому аналіз такого зображення спрощено і дає задовільний результат при використанні запропонованої методики. Але при виконанні аналізу реальних об'єктів криміналістичної експертизи хро-

матографічне зображення більш складне — наявність фону пластинки, дефектів, «шлейфу» погіршує умови визначення контурів плями. Відомо, що кількості речовини на пластинці відповідає не тільки площа плями, а й інтенсивність забарвлення плями. Тобто, аналітичним сигналом, що пов'язаний з концентрацією визначуваного компонента можуть бути кольориметричні характеристики аналізованого зразка (координати кольору в різних системах, яскравість та насиченість кольору, кольоровий тон та інше). У більшості випадків кольориметричні характеристики розраховують на основі спектрів поглинання та дифузного відбиття з використанням програм комп'ютерної обробки спектральних даних [5,11]. Враховуючи сучасний стан розвитку цифрової фотографії, комп'ютерної техніки і технологій, запропоновано швидкий, об'єктивний та автоматизований спосіб трансформації кольорових зображень тонкошарової хроматограми для оцінювання характеристик аналізованих зразків. Цей спосіб є доброю альтернативою візуальному способу, який дуже розповсюджений у методах тонкошарової хроматографії. Отриманий в результаті цифрового сканування файл зображення, наданий на екрані монітора, може бути автоматично з використанням стандартних програм, які прилягають до сканера, проаналізований як за характеристиками кольоровості, так і за відбивною здатністю або світлості. Оцифровка зображення тонкошарової хроматограми дозволяє виконувати математичний аналіз розподілу оптичної густини (характеристик кольоровості) в плямі. Кольоровідділення зображень плям хроматограми і визначення яскравості R, G, B каналів виконували в графічному редакторі Adobe Photoshop CS. Для цього в графічному редакторі виділяли область на відсканованому зображенні хроматограми, що відповідає плямі ТГК, для отримання середнього значення яскравості, та виконували команду «Image Histogram» і вираховували середнє значення яскравості із трьох каналів. На краях хроматографічної плями середнє значення яскравості змінюється за певним законом від максимального до мінімального значення. На рис.2 показано розподіл оптичної густини (характеристик кольоровості) в хроматографічній плямі та лінійна апроксимація отриманих даних методом «найменших квадратів». Високе значення коефіцієнта кореляції між апроксимацією та даними для найменш яскравого кольорового каналу G та для усередненого значення координат яскравості R, G, B каналів вказує на можливість використання цих даних для кількісного визначення аналіту у досліджуваних аналітах.

Зі збільшенням концентрації ТГК, що супроводжується збільшенням інтенсивності кольору плями на хроматограмі, спостерігається зменшення яскравості кольорового зображення R, G, B каналів, яке викликане зменшенням частки білого в кольорі зразка. Для кожного з вивчених кольо-

рових каналів можна виділити як найменш так і найбільш яскраві координати, які змінюються зі зміною забарвлення самої плями. Градувальні залежності в координатах яскравість одного пікселя цифрового зображення — концентрація досліджуваного компонента будують для найменш яскравих кольорових каналів, оскільки на цих каналах зміна концентрації досліджуваного компонента призводить до більш сильної зміни аналітичного сигналу. Градувальні залежності в координатах яскравість одного із вибраних каналів (R, G, B) — концентрація досліджуваного компонента описуються спадаючою експонентою 1-го порядку (рис. 2).

Градувальна залежність при визначенні ТГК побудована для найменш яскравого кольорового каналу G, оскільки саме на цьому каналі спостерігається зміна концентрації ТГК, що призводить до більш помітної зміни аналітичного сигналу. Градувальна залежність описується спадаючою експонентою 1-го порядку та має величину достовірної апроксимації $R^2 = 0,918$ (рис. 2), що свідчить про доцільність такого припущення.

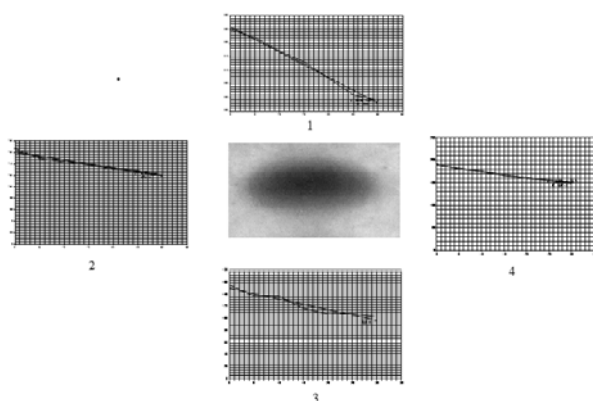


Рис. 2. Лінійна апроксимація розподілу оптичної густини (характеристик кольоровості) в хроматографічній плямі
1 — координата R; $Y = -9,29 \cdot 10^{-1} X + 255,93$; $R^2 = 0,989$;
2 — координата B; $Y = -1,38 X + 160,82$; $R^2 = 0,944$;
3 — координата G; $Y = -1,76 X + 149,75$; $R^2 = 0,918$;
4 — середнє значення координат R, G, B — $Y = -1,34 X + 188,71$; $R^2 = 0,971$

Еталоном контрольного методу використовували денситометрію за допомогою програми Sorbfil TLC Videodensitometer 1.8.0.227. Результати розрахунків наведені у табл. 3.

Доведені результати свідчать, що метрологічні характеристики запропонованих спрощених методик денситометричного аналізу ТГК практично співпадають, підвищуючи чи зберігаючи відтворюваність результатів визначень у порівнянні зі стандартними прийомами денситометрії, але вони характеризуються правильністю та достатньою точністю для проведення експертних досліджень в галузі судово-медичної експертизи та не потребують наявності складного кошового обладнання.

Таблиця 3

Розрахунки вмісту ТГК у модельних пробах при використанні різних алгоритмів розрахунків (вміст ТГК 10%, $n=5$, $R=0,95$)

Метод	Введено, %	Знайдено, %	Δ , %	S_r , %
Графічний редактор (Adobe Photoshop CS)	10,0	10,20	5,3	5,6
Метод розрахунку площини плями		10,12	4,2	4,4
Sorbfil TLC Videodensitometer		9,98	5,5	4,2

Висновки

Методика оцифровки зображення ТШХ-пластинки дозволяє створити принципово нові підходи до ідентифікації та кількісного визначення каннабіноїдів в аналізах судово-медичної та криміналістичної експертизи та дає можливість використати математичний апарат для виконання кількісних розрахунків в ТШХ, сприяючи підвищенню точності та відтворюваності результатів вимірювань. Використання фото- та офісної оргтехніки відкриває можливості спрощених прийомів денситометрування в ТШХ та перетворює його в практичний та об'єктивний метод аналізу криміналістичних об'єктів. Для експерта використання доступних і простих методик оцифровки зображення ТШХ-пластинки та методик кількісних розрахунків на основі запропонованих технологій дозволить побудувати систему аналізу на каннабіноїди з використанням в якості попередніх досліджень кількісного визначення ТГК в об'єктах судово-медичної та криміналістичної експертизи, обмежуючи тим самим коло аналітів для наступного інструментального аналізу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рекомендуемые методы идентификации и анализа каннабиса и продуктов каннабиса / Рук-во для национальных лабораторий экспертизы наркотиков. — Нью-Йорк: Организация объединенных наций, 2010. — С.51.
2. Определение вида наркотических средств, получаемых из конопли и мака: Методические рекомендации / Ред. Э.А. Бабаяна. М.: ЭКЦ МВД России, РФЦСЭ МЮ России, 1995. — 24 с.
3. Аналитическая хроматография / Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.Ф., Зельвенский В.Ю., Ганкина Э.С., Шатц В.Д. — М.: Химия, 1993. — 464 с.
4. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. — М.: Мир, 1980. — Т.1. — 296 с.
5. Применение сканера и компьютерных программ цифровой обработки для количественного определения сорбированных веществ / Шишкин Л.Ю., Дмитриенко С.Г., Медведева О.М., Бадакова С.А., Пяткова Л.Н. // Журн.

аналит. химии. — 2004. — Т.59. — № 2. — С.119-124.

6. Чмиленко Ф.А., Курганов Д.В., Терещенко О.В. Количественная оценка ТСХ-хроматограмм с использованием цифровой фототехники и компьютерных программ обработки изображений // Журн. вопр. химии и хим. технологии. — 2011. — № 1. — С.94–97.

7. Система денситометрии «Сорбфил». — [Цит. 5.09.2008]. — Доступно с: < <http://www.sorbfil.com/> >

8. Система денситометрии «Денскан». — [Цит. 5.09.2008]. — Доступно с: < <http://www.lenchrom.spb.ru/> >

9. Система денситометрии «ТСХ-менеджер. Версия

3.1.2005». — [Цит. 5.09.2008]. — Доступно с: < http://www.garyc.chat.ru/tlc_chrom.html/ >

10. on-line Сервис количественных расчетов в ТСХ; сервис усреднения графики и др. — [Цит. 5.09.2008]. — Доступно с: < <http://www.photometry-online.net.ua/> >

11. Комп'ютерна реєстрація та аналіз результатів тонкошарової хроматографії Шандренко С.Г., Головін А.С., Дмитренко М.П., Юрченко А.І., Бабишева О.Ф. — [Цит. 11.08.2009]. — Доступно с: < <http://medved.kiev.ua/> >

Надійшла до редакції 31.07.2012