



IN MARI VIA ETIA
UNIwersytet Gdański
Wydział Chemii
Zakład Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 1

**Zastosowanie barwnych reakcji chemicznych oraz
technik chromatograficznych do wykrywania
 Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC) w preparatach
roślinnych**

Gdańsk, 2017

I Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest:

- poznanie metod (skriningowych oraz chromatograficznych) wykrywania kannabinoidów w materiale roślinnym i biologicznym,
- wykrycie Δ^9 -THC w próbkach suszu roślinnego za pomocą barwnych reakcji oraz przy użyciu technik chromatograficznych (TLC, GC)

II Zasady postępowania w laboratorium kryminalistycznym

Zgodnie z wymogami Ustawy o Przeciwdziałaniu Narkomanii z 29 lipca 2005 roku oraz nowelizacjami wprowadzonymi w 2006 r., właściwe postępowanie administracyjno-karne oraz orzekanie o przestępczej działalności wymaga odpowiednich badań fizykochemicznych zabezpieczonego materiału dowodowego. Orzekanie dotyczy właściwej kwalifikacji i rozróżnienia surowca pochodzącego z krajowego ziele konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.), tzw. odmiany włóknistej (zawierającej Δ^9 -THC i 9-karboksy-THC łącznie do 0,2% w przeliczeniu na suchą masę) od odmiany ziele konopi innych niż włókniste (zawierającej powyżej 0,2% sumy Δ^9 -THC i 9-karboksy-THC). Według polskiego ustawodawstwa za produkt narkotykowy uznawane jest ziele *Cannabis* zawierające powyżej 0,2% Δ^9 -THC i THCA łącznie oraz żywica i inne produkty konopi niezależnie od zawartości Δ^9 -THC i THCA.

Właściwa interpretacja wyników analizy toksykologicznej umożliwia ustalenie dawki, źródła pochodzenia wykazanego środka, szacowanie rozmiarów produkcji i uprawy. Wartość dowodowa wyniku analizy toksykologicznej zależy od stosowanej metody i od rodzaju materiału dostarczonego do badań. Niezależnie od stosowanych metod i technik analitycznych wartość dowodowa zależy również od właściwego pobierania próbek, transportu i przechowywania do momentu zakończenia badań (tzw. „łańcucha kontroli”) i ścisłego przestrzegania wszystkich zaleceń dotyczących postępowania z pobranym materiałem. Jest to niezwykle istotne, gdyż wyniki analiz mogą mieć poważne konsekwencje prawne dla osób badanych. Zaleca się stosowanie dwuetapowej procedury obejmującej wstępne wykrywanie (**skrining**), metodami immunologicznymi lub za pomocą barwnych reakcji (zwanych kropłowymi) oraz potwierdzenie wyników dodatnich metodami konfirmacyjnymi, które powinny być równie czułe jak skriningowe ale bardziej specyficzne. Wymogi te spełniają techniki chromatograficzne (gazowa lub cieczowa), najlepiej sprzężone ze spektrometrią mas (GC/MS lub LC/MS). Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) może być stosowana w

metodzie skringowej i konfirmacyjnej, ale wynik badania nie może być dowodem w postępowaniu sądowym. W oparciu o wyniki analizy skringowej odpowiednie służby mogą zatrzymać podejrzanych, zlecić badania w laboratorium toksykologicznym oraz otrzymać pozwolenie na rewizję. Wyniki analiz skringowych mogą być też dowodem we wstępnych przesłuchaniach. Laboratorium toksykologiczne wykonuje analizy na podstawie zlecenia zawierającego dane identyfikacyjne dawcy, osoby nadzorującej pobranie i kuriera, numer próbki, datę i godzinę pobrania oraz cechy próbki w chwili pobrania. Formularz może też zawierać dodatkowe informacje o próbce, rodzaju narkotyku i powinien być podpisany przez osobę upoważnioną i opatrzony oficjalną pieczęcią.

Właściwe oznakowanie badanego materiału biologicznego musi zawierać następujące informacje:

- nazwisko i imię
- numer identyfikacyjny
- data i czas pobrania
- miejsce pobrania
- nazwisko osoby nadzorującej pobranie
- narkotyk poddawany badaniu
- numer próbki.

Pojemniki powinny być starannie zamknięte i opieczetowane. Oznakowanie musi być na pojemniku a nie na zamknięciu, aby zapobiec przypadkowej lub umyślnej zamianie próbek lub/i oznakowań. Dawca lub osoba zainteresowana musi być świadkiem stosowania środków zabezpieczających próbę ale nie może w nim uczestniczyć. Wyniki analiz mają charakter poufny. Wszelkie informacje dotyczące dawcy i wyników muszą być przechowywane w zamkniętym miejscu, a raporty mogą być udostępniane tylko upoważnionym osobom. Badany podejrzany materiał może być silnie działający lub zawierający truciznę, dlatego należy szczególną uwagę zwrócić na bezpieczeństwo w czasie wykonywania analiz. Oprócz przestrzegania ogólnych zasad pracy w laboratorium należy bezwzględnie:

- unikać próbowania lub wąchania materiału;
- nie dotykać rękami twarzy, szczególnie ust i nosa, podczas wykonywania próby;

- zachować szczególną czystość;
- zapisywać pobieranie materiału do badań oraz wyniki analiz do specjalnych formularzy.

Zasady ogólne wykrywania kannabinoidów w produktach roślinnych

Materiał do badań może mieć różne stężenie substancji aktywnej, próbka może być rozcieńczona nieaktywnymi substancjami, substancje rozcieńczające mogą maskować przebieg reakcji charakterystycznej, wreszcie materiał do badań może być mieszaniną kilku narkotyków –wszystko to może być przyczyną niejednoznacznych wyników testów.

Aby zwiększyć niezawodność testów należy przestrzegać następujących zasad:

- jeśli ilość materiału do badań jest mała, zbyt mała aby wykonać badanie w warunkach polowych, **całą próbkę** należy wysłać do laboratorium;
- badania sproszkowanego materiału rozpoczyna się od możliwie najmniejszej ilości, po czym, jeśli to konieczne, zwiększa się ilość analizowanej substancji;
- z próbek stałych lub żywicznych materiałów pobiera się odrobinę, rozdrabnia do postaci proszku i proszek poddaje badaniu;
- w przypadku kapsułek przeprowadza się badanie substancji z jednej kapsułki;
- materiał roślinny przed badaniem rozdrabnia się w młynku;
- w przypadku badania papierosów pobiera się materiał tylko z jednego papierosa;
- gdy badanie materiału roślinnego za pomocą odpowiedniego testu dało wynik ujemny, a istnieje podejrzenie, że może on zawierać inne substancje, to cała dostępna ilość materiału powinna być przesłana do laboratorium celem wykonania dokładnej analizy. Barwne testy na obecność narkotyków mogą być wykonywane w probówkach, na bibule ale najczęściej w specjalnej płytce porcelanowej z wgłębieniami. Po wykonaniu badania, próbka lub płytka musi być starannie umyta wodą i rozpuszczalnikiem organicznym (aceton, metanol). Dla zwiększenia specyficzności oznaczenia najczęściej wykonuje się dla każdej substancji lub grupy substancji (przynajmniej 2 testy). Różne związki należące do jednej grupy chemicznej mogą dawać identyczny lub podobny wynik. Przy interpretacji wyników należy pamiętać o tym, że:
- jedynie barwa podana w opisie testu może być uznana za wynik dodatni, który oznacza możliwą obecność poszukiwanej substancji;

- we wszystkich przypadkach, kiedy otrzymuje się wynik dodatni lub wątpliwy należy przesłać materiał do dalszej analizy w laboratorium;
- w przypadku ujemnego lub wątpliwego wyniku należy wykonać drugie badanie przy użyciu innego testu i dopiero wynik ujemny uznać za brak poszukiwanej substancji.

Jeśli jednak istnieją jakiekolwiek wątpliwości należy materiał wysłać do laboratorium.

III WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Pobieranie próbek suszu roślinnego od prowadzącego ćwiczenie

Materiał dowodowy, jakim są badane próbki, podlega ścisłemu zarachowaniu. Badane w czasie ćwiczenia laboratoryjnego próbki suszu roślinnego, mimo iż nie są zieleń konopi ani żywicą konopi tylko przystosowanym do potrzeb dydaktycznych zieleń nawłoci, również podlegają ścisłej kontroli. Pobieranie próbek do analizy od prowadzącego ćwiczenie musi się odbywać wg procedury ujętej w karcie badania konopi, przedstawionej w Tab. 1. Ilość pobieranego suszu do analiz podaje prowadzący ćwiczenie. Próbki suszu przed analizą należy rozdrobnić w moździerz.

2. Ekstrakcja próbek suszu roślinnego

Należy odważyć dwa razy po 25 mg suszu roślinnego (jedna część do ekstrakcji a druga do testów screeningowych). Naważkę suszu (25 mg) umieścić w zamykanej ampułce o pojemności 8-10 ml. Do ampułki dodać 5 ml n-heksanu. Zamkniętą ampułkę wstawić do łaźni ultradźwiękowej (w zlewce z wodą, zabezpieczając przed przewróceniem) i ekstrahować przez 15 min w temperaturze 40°C. Zawartość ampułki pozostawić w temperaturze pokojowej przez 10 min. Ekstrakt przesączyć przez twardy sączek do 4 ml naczynka chromatograficznego. Do analizy GC ekstrakt zatężyć (ok. 10-krotnie) w strumieniu azotu.

3. Wykonanie barwnych testów

Wykonać test barwny wg procedury opisanej poniżej i wpisać wyniki testu do karty badań konopi. Test z czystą substancją wzorcową (Δ^9 -THC), dla wyeliminowania błędów wynikających z subiektywnego postrzegania kolorów, wykonuje prowadzący ćwiczenie.

Test 1. Próba z Fast Blue B Salt (chlorek di-o-anizydynotetrazoliny)

- Umieścić w probówce niewielką ilość badanego materiału (na czubku łopatki dentystycznej).
- Dodać niewielką ilość (na czubku łopatki dentystycznej) Fast Blue B Salt wymieszanej z bezwodnym siarczanem sodowym.
- Dodać 1 ml chloroformu i wytrząsać przez 1 minutę.
- Dodać 1 ml 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu i wstrząsać przez 2 minuty.

Wynik: Barwa purpurowoczerwona dolnej warstwy (chloroformowej) może wskazywać na obecność kannabis.

4. Analiza TLC ekstraktów

Ekstrakty (20 μ l) i roztwór wzorca Δ^9 -THC (5 μ l) nanieść na płytkę TLC i odparować rozpuszczalnik w strumieniu powietrza. Chromatogram rozwijać w mieszaninie chloroform: metanol (19 :1,v:v), odparować rozpuszczalniki w strumieniu powietrza i wizualizować plamki przy użyciu 0,1% roztworu wodnego soli Fast Blue B. Spryskaną płytkę wstawić na chwilę do suszarki nagrzanej do 100°C. Na podstawie wyników analizy TLC wskazać ekstrakt(y) zawierające Δ^9 -THC.

5. Wykrywanie Δ^9 -THC przy użyciu techniki chromatografii gazowej (GC/FID)

Do analizy GC ekstrakty zatężyć ok. 10-krotnie w strumieniu azotu. Wykonać analizę chromatograficzną roztworu zawierającego Δ^9 -THC, a następnie zatężonych ekstraktów.

W miarę możliwości analizy chromatograficzne ekstraktów powtórzyć.

Warunki analizy chromatograficznej:

- kolumna kapilarna pokryta fazą ciekłą RTX 5 (średniopolarna), dł.30m, średnica wewnętrzna 0,25mm, grubość filmu fazy ciekłej 0,25 μ m;
- temperatura dozownika 250° C ;
- temperatura detektora FID 290° C;
- temperatura początkowa kolumny 180° C, narost temp. - 10° C/min do 280° C, 10 min izotermicznie 280° C;
- objętość nastrzyku 1-2 μ l

6. Sprawozdanie

Przedstawić w punktach procedurę wykrywania Δ^9 -THC w próbkach roślinnych.

Opisać warunki przeprowadzonych analiz chromatograficznych.

Załączyć kartę badania konopi.

Przedstawić dyskusję wyników i wnioski.

SPRZĘT I SZKŁO LABORATORYJNE

- Moździerz porcelanowy mały 3 szt,
- Ampułki zakręcane o pojemności 8 – 10 ml 3 szt,
- Pipeta miarowa , 5 ml 1 szt,
- Pipeta miarowa , 1 - 2 ml 2 szt,
- Zlewka, 200 ml 1 szt,
- Łopatka metalowa 1 szt,
- Mikrostrzykawka, 100 μ l 1 szt,
- Cylinder miarowy, 25 ml 1 szt,
- Kolba stożkowa, 25 ml 1 szt,
- Komora chromatograficzna 1 szt,
- Naczynka zakręcane, 4 ml 3 szt,
- Lejki małe 3 szt,
- Probówki 4 szt,
- Mikrostrzykawka, 10 μ l 1 szt,
- Kapilarki,
- Pinceta 1 szt,
- Sączki twarde,
- Suszarka do włosów 1 szt.
- Spryskiwacz do płytek TLC z gumową gruszką.
- Płytki TLC pokryte aktywowanym żelem krzemionkowym G lub żelem krzemionkowym zawierającym domieszkę substancji fluoryzującej w świetle UV przy 254 nm.

ODCZYNNIKI

- 2,5 g Fast Blue B Salt wymieszane ze 100 g bezwodnego siarczanu sodowego - chloroform
- 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu

- 2 g waniliny rozpuszczone w 100 ml 95% etanolu z dodatkiem 2,5 ml aldehydu octowego;
- stężony kwas solny
- n-heksan
- metanol
- 0,1% roztwór wodny soli Fast Blue B - roztwór Δ^9 -THC w n-heksanie.

V Literatura:

1. Szukalski B., Narkotyki. Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
2. Szukalski B., Metody analizy środków uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
3. Recommended Methods for Testing Cannabis. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. ST/NAR/11, United Nations, 1987.
4. Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 z uzupełnieniami w 2006 r. Dz. U. z 2005 r. Nr 179, poz. 1485; z 2006 r. Nr 66, poz. 469; z 2006 r. Nr 120, poz. 826; z 2007 r. Nr 7, poz. 47, Nr 82, poz. 558.
5. Kodeks karny, Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r.
6. *Arch Pharm*, 321, 249, 1988.

Tab. 1. Karta badania konopi.

<i>Dane próbki</i>	<i>Próbka 1</i>	<i>Próbka 2</i>	<i>Próbka 3</i>
Masa próbki brutto przed pobraniem do analizy [g]			
Masa próbki brutto po pobraniu do analizy [g]			
Masa próbki analitycznej [g]			
Opis makroskopowy próbki			
Narkotyk poddawany badaniu			
Wynik barwnego testu (kolor warstwy chloroformowej)			
Wynik analizy TLC			
Wynik analizy GC/FID			
Nazwisko i imię wykonującego analizę			
Data analizy			
Nazwisko i imię prowadzącego ćwiczenie			