

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УО «Витебский государственный медицинский университет»

А. И. ЖЕБЕНТЯЕВ

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Часть 2

Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия для студентов учреждений
высшего образования по специальности «Фармация»

Витебск 2015

УДК 340.67
ББК 52.84я7
Ж 44

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра фармацевтической технологии и химии УО
«Белорусский государственный медицинский университет»
(зав. кафедрой – кандидат фармацевтических наук, доцент
Н.Д. Яранцева);

доктор химических наук, профессор кафедры
аналитической химии УО «Белорусский государственный
университет» С. М. Лещев

Жебентяев, А.И.

Ж 44 Токсикологическая химия (в 2 частях).

Ч.2: учебное пособие/А.И.Жебентяев.-Витебск:
ВГМУ, 2015 – 415с.

ISBN 978-985-466-788-1

В пособии рассмотрены общая характеристика, токсикологическое значение, основные современные методы изолирования, обнаружения и количественного определения веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией (лекарственные и наркотические вещества, пестициды).

Пособие предназначено для студентов фармацевтических факультетов и соответствует действующей учебной программе по токсикологической химии. Пособие может быть использовано интернами по специальности «судебная химия» и слушателями факультета повышения квалификации.

УДК 340.67

ББК 52.84я7

ISBN 978-985-466-788-1

© Жебентяев А.И., 2015
УО «Витебский государственный
медицинский университет», 2015

Предисловие

Подготовка специалистов с высшим фармацевтическим образованием, имеющих право работать медицинскими судебными экспертами-химиками, требует изложения основ токсикологической химии с учетом достижений в области химико-токсикологического анализа.

На занятиях по токсикологической химии студенты фармацевтического факультета изучают основы методов изолирования и определения токсичных веществ в биологических объектах. Специальную подготовку по токсикологической химии провизоры-интерны получают на факультетах (курсах) повышения квалификации.

Во втором томе учебного пособия «Токсикологическая химия» рассмотрены токсикологическое значение, основные методы изолирования, обнаружения и количественного определения лекарственных, наркотических веществ, пестицидов и их метаболитов в биологических объектах. Особое место среди бытовых интоксикаций химической этиологии занимают отравления лекарственными и наркотическими средствами. Пестициды, успешно применяемые для борьбы с сорняками, вредителями и болезнями растений, могут в определенных условиях оказывать вредное воздействие на людей и животных. В пособии приводятся данные о физических и химических свойствах, токсичности и способах определения пестицидов в биологических объектах.

Решение задач химико-токсикологического анализа невозможно без использования современных инструментальных методов анализа. Высокая чувствительность и избирательность, достаточная точность и скорость определения – основное достоинство хроматографических методов. Основы инструментальных методов студенты изучают на занятиях по аналитической химии, а затем на старших курсах при изучении специальных дисциплин возникает потребность в восстановлении и углублении знаний теории и практики основных инструментальных методов анализа, применяемых в химико-токсикологическом анализе.

В пособии на современном научном уровне рассмотрены основы, достоинства и недостатки методов жидкостной хроматографии и молекулярной спектроскопии, широко используемых в химико-токсикологическом анализе лекарственных, наркотических средств и пестицидов. Приводятся сведения о сущности и возможностях сверхкритической флюидной хроматографии и электрофореза.

Изложены основы газохроматографического и ТСХ-скрининга лекарственных и наркотических веществ.

Высокая чувствительность и специфичность иммунохимических методов позволяет быстро определять транквилизаторы, нейролептики и нарко-

тические средства в биологических жидкостях без предварительного их выделения.

Методики определения отдельных токсикантов с применением инструментальных методов приводятся в специальных руководствах, методических рекомендациях, журнальных статьях и других литературных источниках.

Экологическая направленность преподавания основ токсикологической химии изложена при рассмотрении методов изолирования и определения пестицидов, а также анализа питьевых, сточных вод и пищевых продуктов.

Автор выражает глубокую благодарность рецензентам – профессору кафедры аналитической химии Белорусского государственного университета С. М. Лещеву и заведующему кафедрой фармацевтической технологии и химии Белорусского государственного медицинского университета доценту Н. Д. Яранцевой за ценные замечания и рекомендации при рецензировании рукописи, а также заведующему кафедрой фармацевтической химии Витебского государственного медицинского университета доценту А. К. Жерносеку и Государственному медицинскому судебному эксперту-химику доценту И. Е. Талуть за замечания и предложения, способствующие улучшению рукописи.

Список основных сокращений и условных обозначений

А – оптическая плотность
Аг – антиген
Аг-Ат – антиген- антитело
АРП – анализ равновесного пара
Ат – антитело
АХЭ – ацетилхолинэстераза
БПК – биохимическое потребление кислорода
ВАД – вольтамперометрический детектор
ВМС – высокомолекулярные соединения
ВЭКЭ – высокоэффективный капиллярный электрофорез
ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
ВЭТТ – высота эквивалентная теоретической тарелке
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ГФ – Государственная фармакопея
ГХ/МС – газовая хроматография / масс-спектрометрия
Д – диэлектрическая проницаемость
ДДВФ – дихлофос
ДДТ – дихлордифенилтрихлорметилметан
ЖАХ – жидкостная адсорбционная хроматография
ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
ЖХ – жидкостная хроматография
ИКД – инфракрасный детектор
ИФА – иммуноферментный анализ
ИХМ – иммунохимические методы
КЭ – капиллярный электрофорез
МИД – многоионное детектирование
МКБ – международная классификация болезней
МС – масс-спектрометрия
МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения
МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография
НФХ – нормально-фазовая хроматография
ОФХ – обращенно-фазовая хроматография
ПАБК – *para*-аминобензойная кислота
ПАВ – поверхностно-активные вещества
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
ПГД – полярографический детектор
ППЗ – полоса переноса заряда
ПФ – подвижная фаза
ПФИА – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ
ПХБ – полихлорбифенилы
РВ – степень связывания вещества с белками плазмы крови
РЖХ – распределительная жидкостная экстракция
РИА – радиоиммуноферментный анализ

РМД – рефрактометрический детектор
СИД – селективный ионный детектор
СФХ – сверхкритическая флюидная хроматография
СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция
СХА – судебно-химический анализ
ТЖЭ – твердожидкостная экстракция
ТКГ – тетрагидроканнабинол
ТСЭ – тонкослойный электрофорез
ТФМЭ – твердофазная микроэкстракция
ТФЭ – твердофазная экстракция
Ф – фермент
Фл – флуоресцеин
ФАА – фенилалкиламины
ФМД – флуориметрический детектор
ФОП – фосфорорганические пестициды
ФОС – фосфорорганические соединения
ХИ – химическая ионизация
ХМК – химически модифицированные кремнеземы с привитыми неполярными, полярными и ионогенными группами
ХМС – хромато-масс-спектрометрия
ХОС – хлорорганические соединения
ХПК – химическое потребление кислорода
ХТА – химико-токсикологический анализ
ХЭП – холинэстеразная проба
ЭП – электроосмотический поток
ЭХД – электрохимический детектор
 pK_a – показатель константы кислотности (показатель ионизации)
 pK_{BH^+} – показатель константы кислотности сопряженной кислоты

ГЛАВА 11

МЕТОДЫ ИЗОЛИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Отравления лекарственными веществами в настоящее время занимают ведущее место среди бытовых интоксикаций химической этиологии в большинстве стран мира. Причины отравлений связаны с использованием лекарственных средств для самолечения и с суицидальной целью.

Наибольшее число отравлений вызывают различные лекарственные средства психотропного действия (производные барбитуровой кислоты, фенотиазина, бензодиазепа и др.). Значительную часть пациентов составляют и лица, отравление которых произошло в результате приема наркотических и холинолитических веществ. В ряде случаев наблюдаются «смешанные» отравления вследствие приема сразу нескольких лекарственных средств психотропного действия. Одновременное или последовательное применение нескольких лекарственных средств (полипрагмазия) может привести к изменению эффекта лекарственных средств и усилить токсичность. Широко распространены комбинированные лекарственные средства, содержащие барбитураты и кофеин, эфедрин, кодеин, теофиллин и др.

11.1. Классификация лекарственных и наркотических веществ

Полярными растворителями изолируют органические вещества разной химической природы: кислоты и их производные, алкалоиды и синтетические лекарственные вещества основного и слабоосновного характера. Номенклатура этих веществ постоянно расширяется в связи с синтезом новых биологически активных веществ. На схеме 1 приведены основные представители изучаемой группы веществ, которые делят на две подгруппы. Эта классификация имеет практическое применение.



Схема 1. Классификация лекарственных и наркотических веществ в зависимости от их кислотно-основных свойств.

Такое деление веществ является условным, так как многие токсические вещества, изолируемые полярными растворителями, в определенной степени экстрагируются органическими растворителями как из кислой, так и из щелочной среды (производные 1,4-бензодиазепина, фенотиазина, папаверин и др.)

Известна и другая классификация веществ, изолируемых полярными растворителями:

1. Вещества кислотного характера (барбитураты и др.).
2. Вещества слабоосновного характера (производные пиразола, пурина, 1,4-бензодиазепина и др.).
3. Вещества основного характера делят на 2 подгруппы (алкалоиды и синтетические вещества основного характера).
4. Амфолиты (морфин, теобромин, теофиллин, нитразепам и др.).

Лекарственные вещества широко применяются в медицинской практике и в определенных условиях (передозировка, случайный и преднамеренный прием) могут вызвать острое или смертельное отравление. Вещества, относящиеся к этой группе, обычно твердые, белые

кристаллические вещества. Растворимость их в воде и органических растворителях зависит от их химической природы.

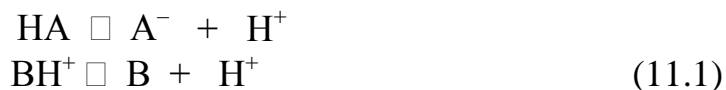
Изолирование лекарственных веществ из биологического материала проводится как общими, так и частными методами. Частные методы применяются при направленном анализе, т.е. когда требуется провести исследование на определенную группу веществ или указано конкретное вещество. Общие методы, применяемые при общем анализе, делят на 2 группы: методы изолирования подкисленным спиртом (метод Стаса – Отто) и методы изолирования подкисленной водой (методы Драгендорфа, Швайковой – Васильевой, Крамаренко и др.).

11.2. Состояние лекарственных веществ кислотного и основного характера в растворах

В зависимости от рН среды алкалоиды и другие вещества основного характера в растворах могут находиться в виде солей и оснований. В кислых растворах алкалоиды находятся в виде солей, которые хорошо растворяются в воде и не растворяются в органических растворителях. В щелочных растворах алкалоиды находятся в виде оснований, не растворяются в воде и хорошо растворяются в органических растворителях. В крови (рН 7–8) и в тканях организма алкалоиды находятся в виде комплексов с белками. При подкислении комплексы разрушаются, алкалоиды переходят в соли, которые хорошо растворяются в воде. Поэтому извлечение можно проводить как спиртом, так и водой после предварительного подкисления. Ранее считали, что необходимо подкислять органической кислотой, так как неорганические кислоты могут гидролизовать некоторые алкалоиды (кокаин, атропин). Однако оказалось, что разбавленные неорганические кислоты при комнатной температуре не разрушают сложноэфирные связи.

Состояние веществ кислотного характера также зависит от рН растворов. В щелочной среде в результате ионизации вещества кислотного характера находятся в виде ионов (анионов) и хорошо растворяются в воде. При подкислении растворов ионизация слабых кислот понижается и в растворах доминируют молекулярные формы веществ кислотного характера, которые лучше растворяются в органических растворителях.

Таким образом, в зависимости от рН раствора вещества кислотного и основного характера могут находиться в растворе в молекулярной или ионной формах:



11.3. Особенности анализа биологических объектов на наличие лекарственных веществ

Химико-токсикологический анализ состоит из следующих стадий: отбор пробы, подготовка и переводение её в форму, удобную для анализа; разделение, обнаружение и количественное определение; обработка результатов и их интерпретация; оформление и выдача заключения.

При анализе биологических объектов проводят обнаружение и определение экзогенных веществ, которые необходимо выделить (изолировать) из биоматериала.

Объекты, содержащие токсические вещества, делят на несколько групп в зависимости от их морфологических особенностей:

1. Жидкости с небольшим содержанием биологического материала: моча, промывные воды желудка, вода, вино, пиво, спирты, минеральная вода.

2. Жидкости со значительным содержанием биоматериала: кровь, желудочный сок, содержимое кишечника, чай, кофе, молоко, супы, сиропы.

3. Твердые объекты, содержащие простые смеси веществ: таблетки, капсулы, сахар, соль и т.д.

4. Твердые объекты, которые являются сложными смесями: хлеб, жиры, масла, биологические образцы (мышцы, волосы, ногти, мозг, печень, почки), растительные ткани.

При анализе биологических объектов на наличие токсических веществ используются разные аналитические схемы. Методы изолирования токсических веществ из мочи не всегда пригодны для крови. При изолировании токсических веществ из тканей необходимо удаление белков, а при анализе мочи, содержащей небольшое количество белка, этап удаления белков не обязателен.

Рассмотрим особенности анализа некоторых биологических объектов.

Моча – наиболее доступный и распространенный объект исследования на лекарственные вещества.

В суточном объеме конечной мочи, составляющем около 1,5–2,0 л, содержится примерно 60 г сухих веществ. Выделяющиеся с мочой различные вещества отражают изменение процессов в почках и других органах и тканях организма.

Обычно отбирается на анализ не менее 200 мл мочи (при исследовании на алкоголь достаточно 8–10 мл). При рН ниже 6–7 с мочой выводятся вещества основного характера, а при рН выше 6–7 – вещества кислотного характера. Со временем может изменяться значение рН в результате образования аммиака. Для замедления действия бактериаль-

ной флоры прибавляют фторид натрия, борную кислоту. В моче могут присутствовать эндогенные соединения – низкомолекулярные продукты метаболизма аминокислот и сахаров (мочевина, амины, соли карбоновых кислот и др.), небольшие количества пептидов и сахаров, стероидов. Желтый цвет мочи обусловлен наличием пигмента уробилина. Рекомендуется хранить образцы мочи при пониженной температуре, а при анализе быстро разлагающихся веществ – в замороженном виде. В большинстве случаев изолирование лекарственных веществ из мочи проводят экстракцией эфиром после подкисления 2 М HCl до pH 1–2 в течение 3–5 мин. Затем водную фазу переносят в делительную воронку и экстракцию эфиром повторяют. Органическую фазу фильтруют через безводный сульфат натрия и эфирные экстракты объединяют. Экстракт из кислого раствора анализируют на содержание веществ кислотного, нейтрального и слабоосновного характера.

Для выделения веществ основного характера водную фазу подщелачивают раствором аммиака или гидроксида натрия до pH 9–10 и проводят дважды экстракцию хлороформом лекарственных веществ основного характера. Органическую фазу фильтруют через безводный сульфат натрия. С целью концентрирования выделенных лекарственных веществ органические растворители удаляют из экстрактов в токе теплого воздуха. Полученные сухие экстракты растворяют в 1–2 мл хлороформа.

Если определяемые вещества образуют конъюгаты, то их необходимо разрушить перед изолированием.

В крови содержание лекарственных веществ и их метаболитов в крови живых объектов и трупов зависит от многих факторов (биохимические изменения, артериальная или венозная кровь, положение тела пациента при отборе крови и др.).

Кровь представляет собой непрозрачную красную жидкость, состоящую из бледно-желтой плазмы и клеток (форменных элементов крови). Плазма – надосадочная жидкость, которая получается при осаждении клеток крови в присутствии противосвертывающих веществ и взвешенных в ней клеток – красных кровяных телец (эритроцитов), белых кровяных телец (лейкоцитов) и кровяных пластинок (тромбоцитов). По объему клетки крови составляют около 45%, остальное – плазма. Плазма, лишенная фибриногена, называется сывороткой.

Основные биохимические функции крови: транспортная, осморегулирующая, буферная, обезвреживающая, защитная или иммунологическая, регуляторная или гормоноидная, гемостатическая.

Кровь осуществляет транспорт различных веществ в пределах организма. Она переносит дыхательные газы – кислород и углекислый газ, как в физически растворенном, так и в химически связанном виде. Ки-

слород переносится от легких к потребляющим его тканям, а углекислый газ – от тканей к легким. Кровь доставляет также питательные вещества от органов, где они всасываются или хранятся, к месту их потребления; образующиеся здесь метаболиты транспортируются к выделительным органам или к тем структурам, где может происходить их дальнейшее использование. Кровь осуществляет транспорт гормонов, витаминов и ферментов, образующихся в организме: эти вещества, поступая в кровь из органов, где они вырабатываются или хранятся, распределяются в сосудистом русле и поставляются к органам-мишеням. Благодаря высокой теплоемкости своей главной составной части – воды, кровь обеспечивает распределение тепла, образующегося в процессе метаболизма, и его выделение во внешнюю среду через легкие, дыхательные пути и поверхность кожи.

Состав и физические свойства циркулирующей крови постоянно контролируются определенными органами и по мере надобности корректируются с целью обеспечения постоянства внутренней среды. Относительное постоянство концентраций растворенных веществ, температуры и рН – это важнейшее условие нормальной жизнедеятельности клеток организма.

На долю крови у взрослого человека приходится примерно 6–8% общей массы тела, а у детей в связи с более высоким содержанием в организме воды – 8–9%. У взрослого это соответствует 4–6 л крови (нормоволемия). Повышение общего объема крови называют гиперволемией, а снижение – гиповолемией.

Изолирование лекарственных веществ методом экстракции может проводиться из цельной крови, плазмы или сыворотки. Для замедления энзиматической активности рекомендуется хранить кровь в холодильнике в замороженном виде. В качестве консерванта применяют 5% раствор фторида натрия.

Использование консерванта и антикоагулянтов (цитрат натрия, эдетат натрия, оксалат калия) для предотвращения свертывания крови влияет на результаты количественного определения ядов. Например, эдетат натрия и фторид натрия вызывают осмотическую дегидратацию эритроцитов и разбавляют плазму.

К эндогенным соединениям крови относятся жирные кислоты, стероидные гормоны, холестерин.

Идеальной посуды для отбора и хранения крови нет. В стеклянной посуде возможно связывание лекарственных веществ стенками посуды (наличие свободных ОН-групп). В посуде из полипропилена или тефлона имеются мономеры смолы, загрязняющие пробы крови. Основным способом изолирования лекарственных веществ из крови является жидкость-жидкостная экстракция: после 4-х кратного разбавления пробы

водой, подкисления HCl и прибавления NaCl проводят экстракцию диэтиловым эфиром. Экстракт исследуют на наличие слабокислых и нейтральных веществ. Из водного слоя после подщелачивания аммиаком экстрагируют основные вещества хлороформом.

Пробы *слюны* центрифугируют и замораживают с целью замедления активности ферментов. Хранят в склянках из фторопласта, тефлона или полипропилена. Токсические вещества, содержащиеся в слюне, связываются с белковыми соединениями (альбумины, глобулины, липопротеиды, глико- и фосфопротеины). Ферменты слюны (амилаза, фосфатаза, лизоцим и эстеразы) влияют на метаболизм токсических веществ. Между концентрацией токсического вещества в слюне и крови существует прямая зависимость, так как неионизированные формы токсиканта из плазмы пассивно диффундируют в слюну. Экстракцию токсических веществ из слюны проводят аналогично, как из крови.

Жель содержит воду, эндогенные вещества, желчные кислоты и пигменты. К особенностям химико-токсикологического анализа желчи относятся длительное центрифугирование (желчные кислоты образуют стойкие эмульсии) и необходимость гидролиза желчи или обработка β -глюкуронидазой перед экстракцией, так как большинство токсических веществ в желчи находится в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой. Рекомендуются пробы центрифугировать при низких скоростях (удаляется холестерин), а для осаждения белков прибавлять смесь хлороформ – изопропанол (9:2) или хлороформ – метанол (2:1).

Фекалии при длительном хранении замораживают или лиофилизируют для замедления действия бактериальной флоры. Высушенные образцы дают более воспроизводимые результаты. Наличие эндогенных (желчные кислоты, сахара, порфирины, стероиды) и экзогенных соединений, поступивших с пищей, влияют на результаты анализа.

Волосы человека как объект для химико-токсикологического анализа в последние годы представляют особый интерес, так как установлено, что наркотические вещества не метаболизируют в них и остаются неизменными в течение длительного времени (до нескольких лет). В настоящее время разработаны методики определения более 90 лекарственных и наркотических веществ (опиаты, амфетамины, кокаин, каннабиноиды, фенциклидин и др.), а также их метаболитов.

Волосы – это ороговевшие эпителиальные отростки кожи, содержат 1–9% липидов, 15–35% воды и менее 1% некоторых ферментов, пигментов и холестерина. Липидный материал состоит из жирных кислот, глицеридов, сложных эфиров, углеводов и спиртов. Минеральные компоненты находятся в количестве от 0,25% до 0,95%. Химический состав зависит от происхождения, возраста и пола человека.

Скорость роста волос головы составляет в среднем 0,1–0,5 мм в сутки и зависит от пола человека и зоны их роста.

Протеиновая матрица волос представляет собой полимерную сетку, преобладающими компонентами которой являются алифатические аминокислоты. Ответственными за образование связей с ксенобиотиками являются пептидные, аминокислотные, дисульфидные, карбоксильные группы, а также ароматические и гетероциклические кольца. Принимают участие в процессе удерживания ксенобиотиков и пигменты. Основным пигмент волос – меланин, состоящий из двух модификаций (феомеланин и эумеланин). Удерживание ксенобиотиков на матрице волос происходит за счет водородных связей, ионных и гидрофобных взаимодействий.

Основной путь поступления ксенобиотиков в матрицу – через кровь. В процессе дыхания, приема пищи, лекарственных и других средств ксенобиотики накапливаются в основании волос. Возможно поглощение ксенобиотиков и внешним путем (через воздух, руки, из шампуней) и т.п. Кинетика проникновения и степень удерживания ксенобиотиков зависит от условий, природы веществ и особенностей матрицы. Главным фактором, определяющим механизм внедрения и прочность удерживания ксенобиотиков на матрице волос, является их химическая природа. Экспериментально установлено, что менее полярные соединения (кокаин, героин, 6-ацетилморфин) в большей степени накапливаются в волосах, чем более полярные вещества (бензоилэксгонин, морфин, сальбутамол). Этот факт можно объяснить тем, что большинство лекарственных и наркотических веществ являются слабыми основаниями или кислотами и находятся в крови как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Ионизированные молекулы в отличие от неионизированных плохо проникают через липидную клеточную мембрану.

В качестве количественных характеристик проникновения веществ в волосы предложен коэффициент перехода веществ в волосы (Incorporation Rate into hair, ICR). Для слабо проникающего вещества этот коэффициент имеет минимальное значение – 0,001 (11-нор- Δ^9 -тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота). Для кокаина – вещества с высокой способностью проникновения этот коэффициент равен 3,6.

Волосы как объект анализа на наличие ксенобиотиков имеет определенные достоинства: простой пробоотбор, легкость хранения, возможность определять вещества малоустойчивые в крови или моче, а также возможность получения информации о воздействии на организм в течение длительного времени. Основные недостатки волос как объекта ХТА: невозможность получения срочной информации о поступлении ксенобиотика в организм и следовые количества определяемых ве-

ществ. Поэтому особое внимание уделяется проведению этапов отбора пробы и подготовки ее к анализу.

Хотя ксенобиотики распределяются в волосах различных частей тела (на голове, лице, в подмышечной и лобковой областях), основным объектом анализа являются волосы головы (затылочная часть). Как правило, отбирают пробу (50–500 мг) не ранее чем через 3 недели с момента поступления в организм и срезают как можно ближе к корню. Затем их фиксируют липкой лентой на бумаге, отмечая верх и низ. Некоторые современные методы, имеющие низкий предел обнаружения (на уровне пг/мг волос) позволяют определять органические ксенобиотики в одном волосе массой 1 мг. Результаты секционного анализа кусочков волос различной длины позволяют проследить динамику поступления ксенобиотика в организм (в среднем скорость роста волос около 1 см/мес) и определить степень наркотической зависимости.

Для очистки (промывания) волос от внешних загрязнителей применяют три типа жидкостей: водные растворы ПАВ (чаще 0,1–5% раствор додецилсульфата натрия), гидрофильные и гидрофобные органические растворители. Переход определяемого вещества в промывные жидкости может быть обусловлен как способом загрязнения, степенью измельченности образца, эффективностью промывания, так и чувствительностью метода определения. При определении лекарственных и наркотических веществ условия промывания должны быть максимально мягкими: использовать теплый раствор ПАВ с последующим промыванием дистиллированной водой. Промывание может быть многократным, но не длительным. Эндогенные соединения более прочно связаны с протеиновой матрицей волоса, чем экзогенные и поэтому последние легко удаляются промыванием.

После очистки проводится сушка волос на воздухе или в токе азота. Затем волосы разрезают на сегменты длиной от 0,1 до 1–2 см и образец измельчают до порошка (в мельнице или растирание в ступке с битым стеклом или кварцем).

Полное разложение волос происходит при щелочной или ферментативной обработке. Выбор способа разложения и условия измельчения веществ зависит от природы определяемых соединений. Например, щелочное или кислотное разложение волос используют при определении устойчивых соединений. При определении производных бензодиазепина щелочное и кислотное разложение не применяют в связи с образованием множества продуктов.

Щелочное разложение волос проводят в 1 мл 0,1–2 М раствора NaOH или KOH при температуре 65–95 °С в течение 10–120 мин. При комнатной температуре время разложения увеличивается до 16–18 ч. При экстракции веществ кислотного характера (например, каннабиноид-

ды) полученный раствор нейтрализуют добавлением HCl или фосфатного буферного раствора (pH 6–9). Щелочное разложение используют при извлечении никотина, каннабиноидов, кокаина, опиатов, амфетамина и его метаболитов.

При кислотном разложении волос чаще применяют 0,1–0,3 М растворы HCl (иногда – 3 М HCl), а также растворы серной и трифторуксусной кислот в метаноле. Время разложения – 16–18 ч при температуре 37–56 °С. После разложения полученный раствор нейтрализуют добавлением 0,1–1 М растворов NaOH (KOH) или фосфатного буферного раствора (pH 6–9) для подавления ионизации функциональных групп. Кислотное разложение используют при извлечении кокаина, опиатов, амфетамина, ЛСД, эфедрина, меперидина, фенциклидина, фенobarбитала и др.

Ферментативное разложение волос применяется реже, что связано с высокой стоимостью ферментов. Наиболее часто используют такие ферменты, как арилсульфатаза и протеаза. Ферментативное разложение используют при извлечении нестабильных соединений (ацетилмофин, кокаин, производные бензодиазепина и др.)

Возможны два варианта извлечения ксенобиотиков из волос: 1) экстракция из раствора, полученного после разложения волос; 2) непосредственная экстракция из волос. В первом варианте применяют жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), твердофазную экстракцию (ТФЭ) и твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ). Ко второму варианту относятся твердо-жидкостная экстракция (экстракция из твердой матрицы в аппарате Сокслета), экстракция в ультразвуковых и микроволновых полях, а также сверхкритическая флюидная экстракция (СФЭ).

ЖЖЭ из раствора после разложения волос наиболее часто используется. Оптимальное значение pH раствора создается с учетом кислотно-основных свойств определяемых соединений. В качестве экстрагентов используют этилацетат, гексан, пентан, изооктан, диэтиловый эфир, дихлорметан и различные смеси органических растворителей. Очистку раствора проводят перед экстракцией (мешающие соединения чаще экстрагируют *n*-пентаном) или очистку раствора проводят с помощью ТФЭ после ЖЖЭ. Необходимость использования больших объемов токсичных растворителей и концентрирование примесей из растворителя при упаривании являются основными недостатками ЖЖЭ.

ТФЭ используется для извлечения определяемых веществ из раствора, полученного после разложения волос различными способами. Для очистки определяемых веществ промывают картридж растворителем, который элюирует примеси, но не смывает определяемые веществ-

ва. Органические растворители в этом способе используются в меньших количествах.

В способе ТФМЭ используют волокна, покрытые неподвижной фазой. Затем определяемые вещества десорбируют в испарителе хроматографа. Низкая степень извлечения и необходимость применения органических реагентов для химической модификации – основные недостатки ТФМЭ.

ТЖЭ без разложения волос используется для определения как экзогенных веществ (пестициды, компоненты шампуней), так и для извлечения эндогенных веществ. В случае ТЖЭ не мешают вещества, образующиеся при разложении волос. Однако этот способ длительный (до 72 ч) и степень извлечения эндогенных веществ ниже по сравнению со способом предварительного разложения волос. Экстракцию определяемых веществ проводят органическими растворителями или буферными растворами (чаще – фосфатными).

В методе СФЭ в качестве сверхкритического флюида используют диоксид углерода. Скорость экстракции в этом способе значительно выше (10–30 мин) по сравнению с ТЖЭ. Сравнение эффективности СФЭ опиатов показало, что этот метод по эффективности (степени извлечения) выше кислотного и щелочного извлечения и не уступает метанольному и ферментативному. Методом СФЭ возможно извлечение нестабильных соединений без их разложения.

В ряде случаев с целью увеличения степени извлечения определяемых веществ, повышения их летучести проводят после упаривания экстракта (ЖЖЭ) или элюата (ТФЭ) химическую модификацию гидрофильных групп.

Основными методами определения органических ксенобиотиков после экстракции являются ГЖХ, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС), иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА) методы анализа. Высокая чувствительность и селективность ГХ-МС позволяет определять низкие концентрации органических веществ – 0,005–3,8 нг/мг волос. Однако высокая стоимость анализа, сложность аппаратуры и необходимость проводить модификацию веществ с целью перевода в более летучие соединения ограничивают широкое применение этого метода. Близким по чувствительности и специфичности к методу ГХ-МС является метод ВЭЖХ-МС, но он также имеет недостатки (высокая стоимость оборудования и недолговечность дорогих колонок).

Значительно реже для определения лекарственных и наркотических веществ в волосах используются РИА и ИФА. Радиоиммунный метод требует дорогих реагентов (антитела и антигены, меченые радиоактивными изотопами). В иммуноферментных методах используют фермент в качестве метки. Применяют методы ИФА при скрининговых

(предварительных) исследованиях в связи с их малой точностью при определении органических ксенобиотиков на уровне нг/мг – пг/мг волос.

Анализ *ногтей* на наличие токсикантов проводится редко. Имеются сведения о накоплении наркотических веществ (опиатов) в ногтях. В ногтях содержится 10,1–13,7% воды, 0,15–0,76% жироподобных веществ (холестерин и его эфиры), а также химически устойчивый белок кератин и различные минеральные вещества (кальций, цинк, мышьяк, фосфор и др.).

Печень – орган, в котором проходят основные реакции биосинтеза. Печень выполняет основные биохимические функции: регуляторно-гомеостатическую, мочевинообразовательную, желчеобразовательную, экскреторную и обезвреживающую. Печень участвует в регуляции практически всех видов обмена веществ.

В экстракте из печени присутствуют разнообразные как эндогенные, так и экзогенные соединения. Этот объект является самым сложным и неудобным, так как даже при длительной и многократной экстракции остаются в экстракте разнообразные эндогенные соединения. Например, при определении лекарственных веществ кислотного характера в хлороформном экстракте обнаруживаются 8 разнообразных эндогенных соединений.

Ткани мозга содержат значительное количество фосфолипидов, стерина и др. Холестерин, относящийся к стеринам, в мозговой ткани содержится до 2–3 %. Он не растворим в воде, легко набухает, образуя стойкую эмульсию, и поэтому удерживает огромное количество воды. Растворимость холестерина уменьшается в ряду: хлороформ–диэтиловый эфир–горячий этанол–бензол–толуол–ацетон. Предварительное удаление липидов осуществляется различными способами.

При интерпретации полученных результатов анализа следует учитывать, что более высокие концентрации метаболитов свидетельствуют о хроническом отравлении, а высокая концентрация вещества по сравнению с его метаболитами – об остром отравлении. Обнаружение равных концентраций лекарственного вещества в печени и крови свидетельствует о хроническом потреблении высоких доз. При остром отравлении концентрация вещества в печени значительно выше концентрации этого вещества в крови.

Сохранение лекарственных веществ в организме зависит от химического строения и частоты употребления. Например, кокаин быстро выводится из организма и поэтому отбор пробы мочи должен производиться сразу после приема наркотика. Для отбора мочи на каннабиноиды время отбора мочи не так важно, так как компоненты гашиша медленно выводятся из организма.

11.4. Отбор и подготовка проб

Отбор объектов исследования регламентируется правилами судебно-медицинской экспертизы трупа в Республике Беларусь.

Подготовка объекта (внутренние органы) к исследованию состоит из нескольких стадий: измельчение, обработка ультразвуком, лиофилизация, замораживание при температуре от -5 до -15°C . При такой подготовке нарушается целостность тканей и клеточных структур, что значительно повышает эффективность экстракционного концентрирования токсических веществ.

Измельчение образца проводят различными способами: с помощью ножниц, ультразвуком, растирание с песком, стеклом; с помощью гомогенизаторов или высокоскоростных турбин (ультратураксы).

Лиофилизация (обезвоживание) проводится под вакуумом в эксикаторах, содержащих сульфат натрия или кальция. Сублимационное высушивание замороженных образцов в вакууме проводится с помощью лиофильных сушилок.

При экстракции токсических веществ необходимо разрушить комплекс «вещество-белок» и удалить из экстракта низкомолекулярные пептиды и разнообразные липиды. Степень связывания токсических веществ с белками зависит от химической природы яда. Например, производные 1,4-бензодиазепина связываются с белками на 80–90%.

Депротенизация заключается в удалении белковых веществ путем их осаждения при обработке этанолом или ацетоном (ацетонитрилом, метанолом). Растворимость белковых веществ зависит от диэлектрической проницаемости растворителей. Диэлектрическая проницаемость этанола ($\epsilon = 24$) ниже, чем у воды ($\epsilon = 80$). С понижением диэлектрической проницаемости силы притяжения между молекулами возрастают. Поэтому под влиянием этанола и других растворителей происходит агрегация молекул белковых веществ, понижается их растворимость и белки выпадают в осадок.

Для осаждения белковых веществ могут применяться кислоты (HCl , HClO_4 , трихлоруксусная, вольфрамовая) и соли (сульфаты аммония, меди (II), цинка и др.). Электролиты способствуют высаливанию, т.е. осаждению белков. Добавляемые катионы или анионы снимают гидратную оболочку белков, которая является одним из факторов её устойчивости. Возможно, одновременно происходит и нейтрализация заряда белков ионами соли, что также способствует осаждению белков. По силе высаливающего действия анионы и катионы располагаются в ряды: сульфат > ацетат > хлорид > нитрат > бромид > иодид > тиоцианат; $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$. Поэтому чаще применяется сульфат натрия или аммония. При очистке веществ кислотного характера (бар-

битураты и др.) для осаждения белков используется хлороводородная, хлорная, вольфрамовая кислоты; при очистке веществ основного характера – трихлоруксусная кислота. Белковые вещества после коагуляции отделяют фильтрованием или центрифугированием. В настоящее время находят применение ферментативное депротеинизирование с использованием ферментов-пептидаз.

При экстракции токсических веществ извлекаются разнообразные липиды. Удаление липидов достигается проведением реэкстракции вещества в раствор кислоты или щелочи и повторной экстракции. Предложены и другие методы удаления липидов – экстракция их тетрахлорметаном, петролейным эфиром и другими органическими растворителями. Метод двумерной хроматографии позволяет, используя две системы растворителей, сначала отделить липиды (идут с фронтом растворителей), а затем в другой системе растворителей разделить токсические вещества. Для удаления липидов используют также вымораживание, сепарационные методы.

11.5. Основные этапы изолирования экзогенных веществ из биологических объектов

Выбор способа изолирования определяется в основном характером исследуемого объекта и физико-химическими свойствами определяемого вещества. На исследование могут поступать биологические жидкости (кровь, моча, слюна), промывные воды и содержимое желудка, паренхиматозные органы (печень, почки) и др.

При общем анализе биологических объектов используются общие (универсальные) методы изолирования подкисленным спиртом или водой. В случае направленного анализа используют частные методы, выбор которых определяется константой ионизации вещества.

Изолирование экзогенных веществ при общем анализе из твердых биологических объектов состоит из 3-х стадий: 1 – извлечение вещества полярным растворителем (спирт, ацетон, вода и др.) т.е. твердо-жидкостная экстракция; 2 – жидкость-жидкостная экстракция веществ кислотного характера из кислого раствора; 3 – жидкость-жидкостная экстракция веществ основного характера из щелочной среды. Растворители, применяемые на первой стадии, называют извлекателями, а на второй и третьей стадиях – экстрагентами. Жидкости, полученные при извлечении токсических веществ из биоматериала полярными растворителями (подкисленной водой или подкисленным спиртом), называют вытяжками. При направленном анализе изолирование лекарственных веществ состоит из 2-х стадий (твердо-жидкостная экстракция – извлечение полярным растворителем и жидкость-жидкостная экстракция ор-

ганическим растворителем при определенном значении рН водной фазы). При исследовании биожидкостей в зависимости от химической природы определяемого вещества изолирование (извлечение) вещества проводят жидкость-жидкостной экстракцией (или сорбцией) его из кислого или щелочного растворов.

В общем процесс изолирования токсических веществ органической природы из твердых биологических объектов можно рассматривать как 2-х этапный: 1-й этап – твердо-жидкостная экстракция; 2-й этап – концентрирование (жидкостно-жидкостная экстракция, сорбция, хроматографические методы).

11.6. Твердо-жидкостная экстракция

Извлечение веществ из внутренних органов трупа зависит как от качественных (природа объекта, анализируемого вещества, экстрагента, добавление электролита), так и количественных факторов (навеска органа, рН среды, время экстракции, объем экстрагента и др). На степень экстракции влияет состояние объекта (свежий или находящийся в стадии разложения). Необходимо учитывать и физико-химические свойства определяемых веществ: показатель ионизации (pK_a), липофильность (K_r или D – коэффициент распределения вещества при разных рН), степень связывания с белками.

В качестве извлекателей на 1 этапе изолирования применяют в основном воду и этанол, так как они в большей степени удовлетворяют предъявляемым требованиям (растворяют исследуемые вещества, незначительно извлекают эндогенные вещества, малотоксичны, легко диффундируют в клетки тканей). Вода хорошо извлекает соединения, ионизированные при определенных значениях рН. Извлечение водой гидрофобных соединений (барбитураты) при рН 1–3 можно объяснить действием эндогенных поверхностно-активных веществ (жирные кислоты, фосфолипиды), находящихся в тканях и способствующих солюбилизации молекул веществ кислотного характера.

Применение этанола имеет некоторые преимущества по сравнению с водой: хорошо извлекает ионизированные и неионизированные формы веществ; в меньшей степени извлекает белки, так как этанол обладает депротеинизирующим действием; большие объемы экстрактов можно концентрировать упариванием. Методики извлечения экзогенных веществ спиртом также не являются идеальными. Они длительны (8–10 дней), при осаждении белков наблюдаются потери определяемых веществ, при нагревании разрушаются термолабильные соединения.

Для создания необходимого значения рН применяются как органические (щавелевая, уксусная, трихлоруксусная), так и минеральные

(серная, хлороводородная) кислоты и основания (гидроксид натрия, аммиак). Введение кислот способствует ионизации веществ основного характера и повышению их экстрагируемости полярным растворителем. В частном методе Валова для создания необходимого значения рН применяется NaOH, способствующий ионизации барбитуратов. В настоящее время нет единой точки зрения на преимущества той или другой кислоты. Имеются данные о том, что для ряда соединений степень экстракции повышается при применении уксусной кислоты. Применение таких кислот – сильных электролитов, как трихлоруксусная и щавелевая не только поддерживает определенное значение рН, но и способствует осаждению белковых веществ. В ряде работ показано, что добавление электролитов (сульфаты аммония, натрия) способствует разрушению комплекса «белок-алкалоид» и повышает выход определяемого соединения, а также получают более чистые извлечения. Однако следует иметь в виду, что электролиты могут сорбировать определяемые вещества, что приведет к их потере. Электролиты могут изменять рН среды, что также повлияет на полноту извлечения определяемых соединений.

На полноту извлечения влияют и количественные факторы. Считают оптимальным соотношением навески органа и извлекавателя 1:2. Хотя в некоторых случаях установлено, что степень извлечения увеличивается при изменении этого соотношения до 1:7. При соотношении 1:1 в присутствии кислот из тканей выделяются вещества, влияющие на растворимость определяемых веществ в воде.

Обычно для изолирования берут 100 г биоматериала, в настоящее время имеются рекомендации об анализе 10–20 г навески.

Оптимальное время извлечения зависит как от природы определяемого вещества, так и от вида и количества извлекавателя. При извлечении веществ водой равновесие наступает через 0,5–2 часа (метод Васильевой), этанолом – около 24 часов (метод Стаса – Отто).

В зависимости от кислотно-основных свойств определяемого вещества для извлечения его требуется определенное значение рН среды. Пользуясь уравнением Гендерсона – Хассельбаха можно рассчитать необходимое значение рН для изолирования веществ полярными растворителями:

$$\text{pH}_{\text{экстр}} = \text{p}K_{\text{a}} - \lg C_{\text{к}}/C_{\text{осн}} \quad (11.2)$$

В условиях максимальной ионизации наблюдается лучшая растворимость вещества в воде и соответственно более полное извлечение. В кислых растворах алкалоиды практически полностью ионизированы. Для веществ кислотного характера максимальная ионизация наблюдает-

ся в щелочной среде. При $pH = pK_a$ в растворе устанавливается равновесие между ионной и молекулярной формами.

Для извлечения токсических органических веществ, при расчете оптимальных значений pH , пользуются зависимостью $pH_{opt} = pK_a \pm 2$. В таблице 11.1 приведены характеристики некоторых лекарственных веществ, имеющих токсикологическое значение.

Таблица 11.1

Константы ионизации и токсикокинетические параметры некоторых лекарственных веществ, изолируемых полярными растворителями

Соединение	pK_a		pK_{BH^+}		lg P	$t_{1/2}$, час	V_d , л/кг	PB, %
	1	2	1	2				
Антипирин			1,5		0,4	7-15	0,6	10
Амидопирин			5,0		1,0	5-8		25-30
Теобромин	10		0,8		0,8	5-11	0,5-1	
Теофиллин	8,6		0,8		0	3-13	0,5	40
Кофеин			0,6		0	2-10	0,5	35
Барбитал	8,0	11				48	0,5	20
Бутобарбитал	8,0	11			1,7	40	0,8	26
Фенобарбитал	7,4	11			1,4	50-150	0,5	50
Этаминал-натрий	8,0	11			1,9	15-48	0,7-1	65
Диазепам	10,8		3,3		2,7	20-100	0,5-2,5	99
Нитразепам	10,8		3,2		2,1	18-38	2-3	85-88
Оксазепам	11,6		1,7		2,2	4-25	0,5-2	95
Хлордиазепоксид			4,6		2,5	5-30	0,3-0,6	90-97
Флунитразепам			1,8			10-70	4	78
Триазолам						1,5-3	1-2	78
Алпразолам			2,4			6-20	1	70
Никотин			7,8	3,1				
Атропин			9,9		1,8	2-3	2-3	50
Скополамин			7,6		1,2			
Кокаин			8,6			0,7-1,5	1-3	
Морфин	9,9		8,0		0,1	2-3	3-5	20-35
Кодеин			8,2		0	2-4	3,5	7-30
Героин			7,6		0,2	3 мин		20-35
Папаверин			6,0		0,5	7		90
Трамадол			8,3			6	3	5
Промедол			9					
Стрихнин			8,3	2,3				
Хинин			8,5	4,1		4-15	2	70-90
Эфедрин			9,6					
Новокаин			9,0			0,1		
Новокаиамид			9,2		1,5	3	2	15

Аминазин			9,3	3,8	3,4	7-120	8	95-98
Дипразин			9,1	3,8	2,9	10-15	13	75-93
Левомепромазин			9,2	3,8	4,7	15-77	30	98
Тиоридазин			9,5	3,8		10-30		99

$\lg P$ – логарифм коэффициента распределения в системе октанол-водный фосфатный буферный раствор рН 7,4; V_d – объем распределения, отнесенный к массе тела (л/кг); PB – степень связывания вещества с белками плазмы крови, %.

Расчитанные значения рН не всегда являются оптимальными. Например, значения рН 5–7 соответствуют области максимального взаимодействия веществ основного характера с белками. Поэтому извлечение веществ основного характера проводят при рН 2–3 (метод Крамаренко), а веществ кислотного характера – из щелочной среды (частный метод Валова). Для извлечения слабых оснований целесообразно создавать $pH \leq 1$ и соответственно при общем анализе извлечения (1 этап) рекомендуется проводить при рН 1–2.

Следующим этапом химико-токсикологического анализа органических ядовитых веществ является концентрирование, которое проводится разными способами (жидкость-жидкостная экстракция, сорбция и др.) Применение жидкость-жидкостной экстракции позволяет увеличить концентрацию токсических веществ, провести их разделение и очистку.

11.7. Жидкость-жидкостная экстракция

Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) основана на различной растворимости веществ в двух несмешивающихся между собой жидких фазах и является самым распространенным способом выделения лекарственных и наркотических веществ из биологических объектов. Количественной характеристикой экстракции является коэффициент распределения (D) – отношение растворимости вещества в двух фазах. Чем больше коэффициент распределения D , тем больше вещества переходит в экстрагент.

Степень экстракции зависит от многих факторов: свойства определяемого вещества (растворимость, pK_a , липофильность), природа экстрагента, рН водной фазы, соотношение фаз, продолжительность экстракции. Липофильность вещества определяется наличием в нем заместителей, их количеством и видом.

К экстрагенту на втором этапе изолирования предъявляются определенные требования:

- высокая селективность к определяемому веществу;

- плотность органического растворителя должна значительно отличаться от плотности воды (CHCl_3 , CCl_4 , эфир);
- низкая температура кипения;
- несмешиваемость с водой;
- не токсичность;
- отсутствие необратимых реакций между растворителем и растворенным веществом;
- не образовывать эмульсий.

При использовании растворителей с плотностью меньшей, чем у воды, меньше образуется пены.

Очистка растворителей производится с использованием перегонки, ректификации, сорбции и другими методами.

Предложены различные классификации экстрагентов. Согласно классификации, основанной на способности молекул растворителей образовывать водородные связи, различают пять классов растворителей (таблица 11.2).

Таблица 11.2

Классификация растворителей по способности образовывать водородные связи

Класс	Общая характеристика растворителя	Растворители
I	Способность образовывать прочные водородные связи	Вода, глицерин, аминоспирты, оксикислоты
II	Наличие активных атомов водорода или полярных групп, содержащих азот или кислород	Одноатомные спирты, кислоты, фенолы, первичные и вторичные амины
III	Отсутствие активных атомов водорода, наличие полярных групп, содержащих азот или кислород	Эфиры, кетоны, третичные амины, нитросоединения
IV	Наличие активных атомов водорода	Дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан
V	Неспособность образовывать водородные связи, отсутствие активных атомов водорода	Углеводороды, четыреххлористый углерод, сероуглерод

По другой классификации экстрагенты делят на активные и инертные. К активным экстрагентам относят органические растворители, образующие сольваты с экстрагируемым веществом, активный экстрагент способен хорошо извлекать данное вещество. Инертный экстрагент или вообще не образует сольватов с экстрагируемым веществом,

или сольваты весьма нестабильны, такой растворитель не экстрагирует или плохо экстрагирует данное вещество. Инертные экстрагенты иногда добавляют для улучшения свойств активных экстрагентов – для изменения их вязкости, плотности и т.п.

Известна классификация, в которой растворители делят на протонные (вода, спирты и др.) и апротонные. В протонных растворителях атом водорода связан с электроотрицательными атомами, главным образом с кислородом, молекулы таких растворителей служат донорами водорода при образовании водородных связей. Среди апротонных растворителей выделяют экстрагенты, не образующие прочных комплексов (сольватов) с экстрагируемыми веществами, например алифатические углеводороды, четыреххлористый углерод, и экстрагенты, образующие относительно прочные комплексы, например эфиры.

Различают также экстрагенты полярные (т.е. с высокой диэлектрической проницаемостью, например, спирты, эфиры) и неполярные (т.е. с малой диэлектрической проницаемостью, например, углеводороды, четыреххлористый углерод).

По теплоте испарения экстрагенты делят на легко- и малолетучие.

В органический растворитель переходят, как правило, неионизированные формы органических веществ. В качестве органических растворителей в ЖЖЭ наиболее часто применяются эфир и хлороформ, так как эти растворители хорошо взаимодействуют с растворенными веществами, т.е. сольватируют их.

Вещества кислотного характера чаще экстрагируют эфиром, так как они лучше растворяются в эфире, чем в хлороформе (например, у барбитала $D = 5,2$ для эфир-вода и $D = 0,7$ для хлороформ-вода). Хлороформ чаще используется для экстракции веществ основного характера. Применение смеси органических растворителей в ряде случаев позволяет повысить степень извлечения определяемого вещества. В этом случае к тому же уменьшается степень сорбции вещества на стекле и объекте. Например, смесь хлороформ-изопропанол (3:2) позволяет почти полностью извлечь кокаин и его метаболиты, трициклические антидепрессанты и другие лекарственные вещества.

Компоненты смеси растворителей могут взаимодействовать между собой с образованием комплекса, например бензол-хлороформ ($C_6H_6 \cdot CHCl_3$ или $(C_6H_6H)^+CCl_3^-$), обладающего другой экстракционной способностью по сравнению с индивидуальными растворителями.

Экстракция определяемого вещества в значительной степени зависит от его физико-химических свойств и в первую очередь от его липофильности, т.е. от коэффициента распределения. В органическую фазу в значительной степени переходят вещества с большей липофильностью. Переход вещества из водной фазы в органическую зависит от его

кислотно-основных свойств, что выражается уравнением Гендерсона – Хассельбаха (11.2).

На первом этапе изолирования степень экстракции зависит от степени ионизации вещества, так как в полярный растворитель переходят ионизированные формы веществ. На втором этапе необходимо создать условия, при которых вещество будет находиться в недиссоциированной (молекулярной) форме. Поэтому экстракцию веществ кислотного характера проводят при $pH = pK_a - 2$, а основного – $pH = pK_{BH^+} + 2$.

При общем анализе необходимо извлечь в максимальной степени вещества, близкие по свойствам, но с различными значениями pK_a и pK_{BH^+} . Поэтому строгое соответствие pH водной фазы расчетным значениям pH не соблюдается. Рекомендуется экстракцию веществ кислотного характера проводить при pH 1–2, а основного характера – pH 10–11. В этих условиях концентрация недиссоциированных форм веществ кислотного и соответственно основного характера наибольшая. Для веществ слабо-основного и нейтрального характера не требуется строгое соблюдение pH водной фазы, так как такие вещества хорошо экстрагируются органическими растворителями как из кислого, так и из щелочного растворов (производные пурина, пиразола). При изолировании амфотерных соединений (морфин, теобромин), имеющих кислотные и основные центры, оптимальное значение pH водной фазы соответствует изоэлектрической точке, в которой такие соединения не имеют электрического заряда. Применение смеси растворителей (полярный и неполярный) повышает степень экстракции амфотерных соединений. Например, для экстракции морфина применяется смесь хлороформ-изоамиловый спирт (9:1). В этом случае экстрагируется около 80% морфина, а хлороформом – 10–20%.

В таблице 11.3 представлены экстрагенты и оптимальные значения pH экстракции некоторых токсикологически важных групп лекарственных веществ.

Для полноты экстракции экзогенных веществ необходимо учитывать и другие факторы. Обычно применяется трехкратная экстракция при соотношении водной и органической фаз 3:1, а при экстракции эфиром – 1:1. Продолжительность экстракции устанавливается экспериментально, обычно равновесие устанавливается в первые 3–5 минут. При резком встряхивании образуются трудноразделимые эмульсии. При центрифугировании происходит четкое разделение фаз.

Таблица 11.3

Оптимальные условия экстракции некоторых групп лекарственных веществ

Группа веществ	pH	Экстрагент
Барбитураты	1-3	Эфир, хлороформ
Алкалоиды	Широкий диапазон	Органические растворители средней полярности
Фенотиазины	9-12	Гексан, диэтиловый эфир, эфир-гексан (1:3), дихлорметан-гексан (1:9)
Бензодиазепины	7-11	Бензол, 1,5% изоамиловый спирт в гексане, диэтиловый эфир, хлороформ
Трициклические антидепрессанты	9-12	Петролейный эфир, дихлорметан, гексан, эфир, 1,5% изоамиловый спирт в гексане

Выделение ионных соединений возможно в виде ионных ассоциатов. При экстракции анионных соединений в раствор вводят соль органического основания с большой молекулярной массой и проводят экстракцию. Катионы органических оснований образуют ионные ассоциаты с солями органических кислот. Полнота экстракции ионных ассоциатов зависит от полярности, диэлектрической постоянной, донорно-акцепторных свойств растворителя и его способности к образованию водородных связей. Для экстракции ионных ассоциатов наиболее часто используют бензол и хлороформ, в которых ионные ассоциаты не диссоциируют.

Введение основных или кислотных красителей в качестве противоионов позволяет получать окрашенные экстракты, которые анализируют спектрофотометрическим методом.

11.8. Сорбционное концентрирование

С целью концентрирования и очистки лекарственных веществ применяется также сорбция.

Сорбция – процесс поглощения газов, паров и растворенных веществ твердыми и жидкими поглотителями (сорбентами). В некоторых источниках сорбцию определяют как твердо-жидкостную или твердо-фазную экстракцию (сорбенты – твердые поглотители). Хотя в отличие от ранее рассмотренной твердо-жидкостной экстракции (первая стадия изолирования экзогенных веществ из трупного материала, т.е. изолирование полярными растворителями) сорбция применяется для извлечения и очистки токсических веществ из биологических жидкостей и анализируемых растворов (водные извлечения, гидролизаты). В основе метода

сорбционного концентрирования лежит принцип колоночной хроматографии (выделяемые вещества из биоматериала взаимодействуют с сорбентом, находящимся в колонке или патроне-картридже).

Основные количественные характеристики сорбции, как и экстракции, – коэффициент распределения и степень извлечения. Коэффициент распределения – это отношение концентрации вещества в фазе сорбента к концентрации его в водной фазе. Процесс сорбции осуществляется статическим и динамическим методами. В основу хроматографического разделения положен динамический метод.

Сорбенты *классифицируют* по химической природе (происхождению):

1. Природные (силикагель, диатомит, целлюлоза и др.).
2. Модифицированные природные сорбенты (например, ХМК – химически модифицированные кремнеземы с привитыми неполярными, полярными и ионогенными группами).
3. Синтетические сорбенты (например, сополимер стирола и дивинилбензола).

В качестве сорбента для очистки алкалоидов был применен активированный уголь (Лассань, 1823г.). Элюирование адсорбированных лекарственных веществ кислотного и основного характера проводят метанолом, этанолом, эфиром или смесью хлороформа и изопропанола. Твердые сорбенты на основе диатомитов (цеолит 545 и 560) предложены для выделения фенобарбитала, мепробамата, ацетилсалициловой кислоты и других веществ из плазмы и цельной крови. Элюирование адсорбированных веществ проводят метиленхлоридом, диэтиловым эфиром и др.

Для выделения производных тетрагидроканнабинола из мочи предложены анионо- и катионообменные смолы в виде специальных патронов. Ионообменники в колоночном варианте наиболее удобны для выделения веществ кислотного характера из биожидкостей.

В 1959 г. был синтезирован «сефадекс» – продукт взаимодействия растворимого декстрана с эпихлоргидрином, который широко применяется в гель-хроматографии. Гель-хроматография – метод отделения крупных молекул от мелких. Сефадексы применены для выделения и очистки барбитуратов (метод Поповой), хинидина, фторацизина и др. Однако гель-хроматография имеет определенные недостатки:

- большие объемы водных элюатов, что требует концентрирования (обычно – экстракция);
- длительность;
- потери анализируемых веществ.

Начало применения пористых органических неионогенных полимеров (смолы типа амберлита ХАД) относится к 1970–1971 годам и в

настоящее время они применяются при концентрировании, очистке и разделении различных веществ. Важными характеристиками сорбентов являются размер их пор и поверхностная площадь. Наибольшая поверхностная площадь у сорбентов с малым размером пор.

Сорбция органических веществ из водных систем основана на распределении веществ между сорбентом и водой. Степень сорбции и десорбции органических веществ определяется состоянием веществ в растворе. Например, слабые основания и кислоты лучше сорбируются на амберлите ХАД-2 в молекулярной форме, а десорбируются в ионной.

Выпускаемые промышленностью сорбенты обычно содержат остаточные продукты полимеризации и их нужно отмыть водой и органическими растворителями. Для очистки амберлитов ХАД применяют ацетон, метанол, метилхлорид, хлороформ или эфир. Учитывая высокую стоимость сорбентов, предложены разные способы их регенерации с применением органических растворителей, кислот, щелочей или воды для отмывки веществ гидрофильного характера.

Пористые органические полимеры широко используются при подготовке проб воды или биологических жидкостей к анализу. В ряде случаев сорбция имеет преимущества перед жидкость-жидкостной экстракцией, при которой образуется эмульсия, получают разбавленные растворы, необходимо выпаривание. Сорбцией можно выделить гидрофильные соединения и их метаболиты.

Выбор условий сорбции и десорбции является решающим при выделении экзогенных веществ из биожидкостей. Удачный выбор элюента позволяет достичь максимального выхода определяемых веществ и чистых элюатов. Для веществ кислотного характера сорбция зависит от величины рН. Например, для барбитуратов создают рН 2, морфина – 8–9, амфетамина и его аналогов – 9–12.

При исследовании крови необходима предварительная обработка крови (отделить сгустки фибрина центрифугированием или фильтрованием, разбавить кровь водой или буферным раствором в соотношении 1:2 или 1:5). Для мочи не требуется предварительная подготовка.

Сорбенты используются также при химико-токсикологическом анализе тканей органов: водные извлечения из органов трупа или гидролизаты доводят до определенного значения рН и пропускают через сорбент. При этом выход лекарственных веществ (производные барбитуровой кислоты, 1,4-бенздиазепина, фенотиазины, мепробамата, наркотических алкалоидов и др.) достигает 60–90%.

Кроме амберлитов ХАД в химико-токсикологическом анализе применяется полисорб-1 (сополимер стирола и дивинилбензола), синхром (сополимер стирола, дивинилбензола и этилвинилбензола), хромосорбы, полиуретан, пенополиуретаны и др. Улучшение характеристик

сорбентов достигается синтезом сорбентов типа силикагеля с радиальнопривитыми цепями (химически модифицированные сорбенты). Например, феназепам, хлордиазепоксид и их метаболиты выделяют из крови на колонках с силикагелем C_{18} (сорбцию проводят при pH 9, десорбция – метанолом).

Методика изолирования экзогенных веществ, например, из мочи состоит из нескольких этапов:

1. Подготовка сорбента (полисорб 1). Сорбент с зернением 0,5 – 1,0 мм отделяют от пыли путем просеивания, помещают в аппарат Сокслета и промывают диоксаном (9 часов), затем этанолом (9 час). Отмытый сорбент промывают на воронке Бюхнера дистиллированной водой и хранят в колбе с притертой пробкой под слоем воды в холодильнике.

2. Подготовка колонки. На дно колонки помещают стекловату и переносят сорбент (1,5 г) в колонку. На сорбент помещают тампон стекловаты. Подготовленный сорбент хранят под слоем воды. Перед работой сорбент промывают 50 мл этанола и 50 мл воды.

3. Подготовка пробы (моча). Для создания необходимого значения pH биопробы (8,5–9,0 для веществ основного характера применяют 25% раствор аммиака – объем пробы 50 мл). В случае определения веществ кислотного характера создают pH 2 с применением 0,1М HCl. При выпадении осадка его отделяют фильтрованием или центрифугированием.

4. Сорбция. Подготовленную пробу мочи пропускают через колонку со скоростью 1,5–2,0 мл/мин.

5. Десорбция. Выбор элюента зависит от кислотно-основных свойств определяемого вещества. Элюирование веществ кислотного характера чаще проводят этилацетатом, а основного характера – смесью хлороформ-изопропанол (3:1). Элюаты собирают в химические стаканы емкостью 50 мл. Если в элюатах содержится водная фаза – её удаляют пипеткой или с помощью делительной воронки.

6. Концентрирование. Полученные элюаты, содержащие вещества основного и кислотного характера (отдельно), делят на аликвоты в концентриционные чашки и упаривают растворитель досуха. Сухие остатки растворяют в небольшом количестве (100–200 мкл) хлороформа и проводят ТСХ-скрининг в соответствующих системах растворителей.

7. Регенерация сорбента. Регенерацию сорбента проводят в аппарате Сокслета этанолом (9 часов), затем водой. Сорбент хранят в колбе с притертой пробкой под слоем воды в холодильнике.

Выбор патронов-картриджей для твердофазной экстракции проводится с учетом свойств определяемого вещества. Для заполнения патронов применяют как немодифицированные силикагели (Диапак силикагель), так и химически модифицированные силикагели (например силикагель, модифицированный гексадецильными группами C_{16} (Диапак

C₁₆). Для модификации силикагеля применяются вещества, содержащие амино-, диольные, карбокси-, нитрильные, сульфогруппы, алифатические и ароматические радикалы.

Проведение сорбционного концентрирования с применением патронов-картриджей состоит из нескольких этапов:

1. Активация (промывка патрона этанолом или метанолом).
2. Кондиционирование (пропускание ацетатного или аммиачного буферного раствора в зависимости от свойств определяемых веществ).
3. Сорбция (пропускание исследуемого раствора через патрон).
4. Элюирование исследуемого вещества.

На рис. 11.1 показана последовательность проведения твердофазной экстракции.

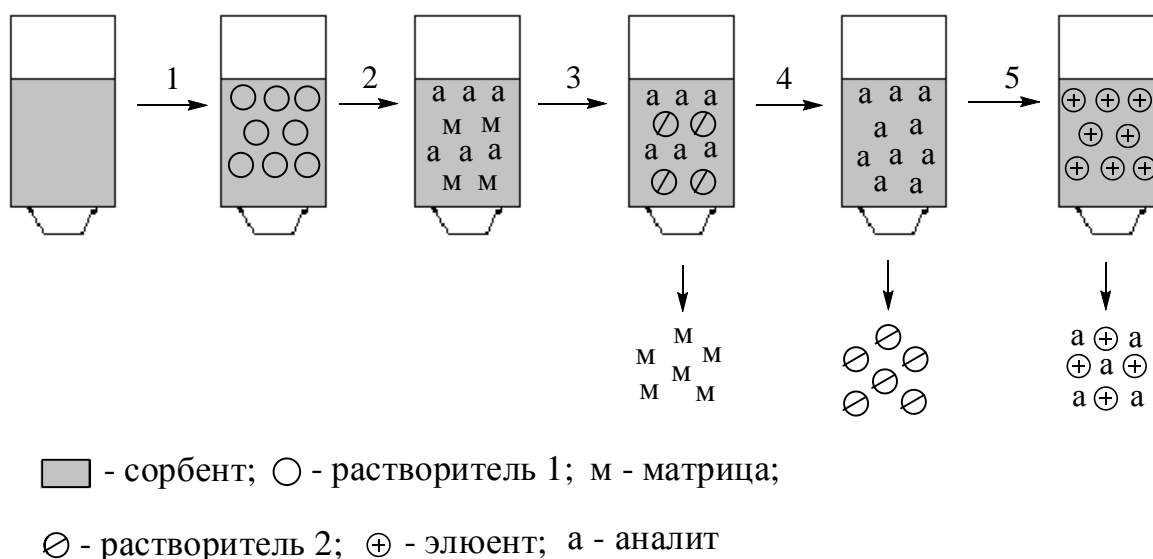


Рис. 11.1. Алгоритм твердофазной экстракции:

1 – кондиционирование патрона с сорбентом; 2 – пропускание образца через сорбент; 3 – промывка; 4 – высушивание сорбента; 5 – элюирование.

11.9. Способы очистки извлечений

Извлечения из биологического материала всегда загрязнены жирами, белками, красящими, дубильными и другими веществами, что в значительной степени затрудняет дальнейшее исследование и требует проведения дополнительной очистки. Используемые методы делят на грубые методы очистки и методы тонкой очистки. К грубым методам очистки относятся:

1. Процеживание через марлю (методы Васильевой, Драгендорфа);
2. Фильтрование и центрифугирование;
3. Осаждение белков трихлоруксусной кислотой, этанолом, высаливанием электролитами. Высаливание эффективно при очистке из гнилого биоматериала. Для осаждения примесей применяют также таннин, вольфрамовую, фосфорно-вольфрамовую и фосфорно-молибденовую кислоты. Эти методы приводят к значительным потерям определяемых веществ, связанных с белками.
4. Вымораживание жира из экстракта с последующим его механическим удалением.

К методам тонкой очистки относят различные виды хроматографии (ТСХ, колоночная, ВЭЖХ), диализ, электрофорез, экстракция, реэкстракция, сорбция. Наиболее доступными, простыми и эффективными методами очистки являются экстракция, реэкстракция и сорбция. Хроматографические методы и электрофорез требуют специального оборудования и материалов.

11.10. Общие методы изолирования лекарственных веществ

К общим методам изолирования лекарственных веществ относятся методы изолирования лекарственных веществ подкисленным спиртом или подкисленной водой. Эти методы применяются при исследовании биологического материала на лекарственные вещества кислотного, слабоосновного и основного характера, т.е. при общем анализе.

11.10.1 Изолирование лекарственных веществ подкисленным спиртом

В 1851 году бельгийский ученый Ж. С. Стас провел исследование биологического материала путем извлечения алкалоидов спиртом из кислого раствора (щавелевая, винная кислоты). Экстракция алкалоидов проводилась эфиром из предварительно подщелоченного раствора.

По методу Стаса не проводилась очистка вытяжки. В 1856 году Р. и Ю. Отто предложили обработку полученной вытяжки эфиром (примеси растворяются в эфире) – это метод Стаса – Отто: биоматериал несколько раз настаивают с этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой. Кислые спиртовые вытяжки сливают, фильтруют и взбалтывают с диэтиловым эфиром, в который переходят примеси. Отделяют эфирный слой, а водную вытяжку обрабатывают растворами Na_2CO_3 или аммиака и взбалтывают с эфиром (в этих условиях в эфир переходят алкалоиды). Эфирные вытяжки выпаривают.

За прошедшие более чем 150 лет метод Стаса – Отто модифицировали: заменяли щавелевую кислоту (винная, хлороводородная, серная, уксусная) для подкисления, вместо эфира предлагали хлороформ, бензол, амиловый спирт. В современном варианте метода Стаса – Отто в качестве экстрагента из щелочной и кислой сред применен хлороформ, а очистка вытяжек от белковых веществ производится прибавлением спирта к фильтрату, упаренному до густоты сиропа.

Этот метод применяется при выделении токсических веществ из гнилостного биоматериала.

Удобство применения хлороформа в качестве растворителя заключается в том, что он достаточно хорошо растворяет большинство токсикологически важных алкалоидов и других веществ из группы изолируемых подкисленным спиртом и легко отделяется от водного раствора (нижний слой). Экстрагированием хлороформом из кислого, а затем из щелочного раствора достигается разделение группы веществ, изолируемых подкисленным спиртом, на две подгруппы:

1) подгруппа веществ, экстрагируемых хлороформом из кислого раствора;

2) подгруппа веществ, экстрагируемых хлороформом из щелочного раствора.

Экстрагирование хлороформом из кислого водного раствора, кроме того, имеет своей задачей очистку жидкости от жира, красящих, дубильных и других веществ, мешающих дальнейшему качественному обнаружению, главным образом, алкалоидов.

Из кислых растворов экстрагируются: кислоты и их производные; многоатомные фенолы (гидрохинон, пирогаллол); некоторые вещества нейтрального характера (производные анилина и *n*-аминофенола); слабые основания (антипирин, кофеин и др.).

Достоинства метода: способность спирта свертывать, переводить в нерастворимое состояние белки – главную составную часть большинства объектов судебно-химического исследования.

Недостатки метода:

- длительность настаивания, упаривания и осаждения белков (8-10 дней);

- большое количество операций;

- возможность потери малых количеств алкалоидов как вследствие адсорбции их белками и фильтровальной бумагой, так и в результате продолжительного нагревания в кислом растворе (гидролиз кокаина, атропина и др.);

- дороговизна метода (около 500 мл 96% этанола на одно исследование).

Однако несмотря на указанные недостатки этот метод является эффективным при изолировании токсических веществ из гнилостного материала.

11.10.2. Изолирование лекарственных веществ подкисленной водой

Выделение морфина из органов трупа водой впервые предложил Лассань в 1823 г. В этом методе биологический материал кипятили с водой, а затем раствор фильтровали и выпаривали досуха. После растворения сухого остатка в этаноле проводили обнаружение морфина. Аналогично М.Ж. Орфила выделял и другие алкалоиды из биологических объектов. Основной недостаток этого метода состоит в том, что основания большинства алкалоидов не растворяются в воде и не извлекаются водой из биоматериала. К тому же сухие остатки содержат примеси, мешающие обнаружению алкалоидов.

В 1856 г. Макадам предложил выделение алкалоидов водой, подкисленной щавелевой кислотой, а в 1861 г. Усляр и Эрдман предложили изолирование алкалоидов водой, подкисленной хлороводородной кислотой.

Из других описанных в литературе методов извлечения алкалоидов подкисленной водой следует отметить метод Драгендорфа (1865 г.).

По методу Драгендорфа алкалоиды и другие вещества извлекали 2–3 раза при температуре 40–50°C водой, содержащей серную кислоту. Водные вытяжки упаривали и настаивали с 3–4-х кратным объемом 96% спирта в течение суток и фильтровали. Из кислого фильтрата последовательно извлекали токсические вещества петролейным эфиром (салициловая, бензойная кислоты), бензолом (кофеин, фенол, антипирин), хлороформом (папаверин, теобромин). Фильтрат подщелачивали раствором аммиака и экстрагировали алкалоиды петролейным эфиром (никотин, стрихнин, хинин), бензолом (атропин, кокаин, стрихнин, кодеин), хлороформом (папаверин), амиловым спиртом (морфин).

Метод имеет недостатки: при упаривании сернокислой вытяжки происходит гидролиз некоторых веществ (атропин, скополамин, кокаин и др.); в результате применения нескольких растворителей наблюдаются потери веществ.

В 1943 г. М. Д. Швайкова и А. В. Степанов для изолирования алкалоидов из объектов растительного происхождения предложили, так называемый, «скоростной метод извлечения алкалоидов». Он основан на том, что алкалоиды изолируют водой, подкисленной щавелевой кислотой. Такое изолирование является более полным, чем подкисленным спиртом.

В 1949 г. этот метод был применен А. А. Васильевой для выделения алкалоидов из свежих внутренних органов трупа, после чего он вошел в практику судебно-химического анализа в лабораториях.

Сущность метода А. А. Васильевой состоит в том, что тщательно измельченный трупный материал (100 г) заливают 200 мл дистиллированной воды, подкисляют 10% раствором щавелевой кислоты до кислой реакции на лакмус и оставляют на 2 часа при частом взбалтывании. После 2 часов вытяжку процеживают через марлю. Остаток на марле несколько раз промывают водой. Вытяжку и промывные воды объединяют и 3–4 раза извлекают токсические вещества сначала хлороформом из кислого, а затем из подщелоченного раствора. Анализируют хлороформные вытяжки из кислого раствора, потом – из щелочного. В настоящее время этот метод несколько усовершенствован: экстракцию веществ из кислой среды проводят эфиром, т.к. коэффициент распределения веществ кислотного характера для систем эфир/вода значительно больше, чем для хлороформ/вода. Такой метод носит название «метод Швайковой – Васильевой».

Недостаток метода – образование стойкой эмульсии при экстракции алкалоидов хлороформом. Во избежание образования стойкой эмульсии к водному извлечению добавляют растертый хлорид натрия до насыщения, этиловый или амиловый спирт (до 2 мл) и другие приемы. Для разрушения эмульсий применяется центрифугирование.

В «Приложении» приводятся схемы основных методов изолирования лекарственных веществ полярными растворителями.

ГЛАВА 12

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

12.1. Общая характеристика методов

Для определения лекарственных и наркотических веществ в биологических объектах используются различные методы. Идеальный метод должен обладать следующими свойствами:

- высокая чувствительность,
- большая избирательность,
- надежность и воспроизводимость,
- экспрессность,
- возможность работы с малыми объемами проб,
- простая пробоподготовка,
- возможность автоматизации,
- универсальность.

Однако идеального метода для определения лекарственных веществ в биологических объектах не существует. Все известные методы имеют как положительные, так и отрицательные свойства. Лучшим среди известных методов является **хромато-масс-спектрометрия (ХМС)**. Хромато-масс-спектрометрия – гибридный метод анализа, позволяющий разделять вещества методом газовой или жидкостной хроматографии, а идентификацию и количественное определение проводят методом масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия основана на определении отношения массы к заряду (m/z) ионов, а также количества ионов, возникающих при ионизации анализируемого вещества. Ионизации подвергают вещества, находящиеся в газообразном состоянии. Проводят ионизацию разными методами (химическая ионизация, с помощью лазера, электронным ударом). При ионизации образуются как положительные, так и отрицательно заряженные ионы. Однако отрицательно заряженных ионов образуется незначительное количество и к тому же у ограниченного числа соединений. Наиболее вероятным явля-

ется образование однозарядных положительных ионов. Приборы, как правило, настроены на регистрацию положительно заряженных ионов.

Образовавшиеся при ионизации ионы разделяются согласно величине m/z с помощью масс-анализатора, в котором разделение ионов происходит в магнитном или электрическом поле. В современных масс-спектрометрах для регистрации образующихся ионов чаще используются высокочувствительные электронные умножители. Зависимость ионного тока от величины m/z ионов графически представляется в виде масс-спектра вещества. Неизвестное соединение считают идентифицированным, если масс-спектр вещества в смеси совпадает с масс-спектром стандартного вещества. При этом исследование неизвестного и стандартного веществ проводят в одинаковых условиях.

Недостатки ХМС: высокая стоимость прибора, сложность проведения анализа, необходимость специально подготовленного персонала. Метод используется в качестве эталонного при точном определении концентрации лекарственных веществ.

Спектрометрические (молекулярно-абсорбционные и молекулярно-эмиссионные) методы основаны на измерении электромагнитного излучения, поглощенного или излучаемого анализируемым веществом. К этим методам относятся: спектрометрия в УФ и видимой областях, а также флуориметрия. Вещества, не поглощающие в УФ (200-400 нм) области, переводят в окрашенные соединения при обработке соответствующими реагентами. Фотометрические методы просты в исполнении и не отличаются высокой стоимостью.

Флуориметрия имеет ограниченное применение в химико-токсикологическом анализе, так как небольшое количество органических веществ обладает собственной флуоресценцией. Для нефлуоресцирующих веществ предложены способы перевода их в флуоресцирующие соединения с последующим измерением интенсивности флуоресценции. Флуориметрия – более чувствительный и избирательный метод по сравнению с фотометрией.

Хроматографические методы (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ) позволяют быстро и точно определять в одной пробе несколько лекарственных веществ, но ГЖХ и ВЭЖХ трудоемки для широкого практического применения.

Хроматографические методы можно рассматривать как комбинированные (гибридные) методы, в которых разделение веществ производится методами хроматографии, а регистрация и количественное определение может осуществляться спектральными, электрохимическими и другими методами. Выбор метода хроматографического анализа зависит от свойств анализируемого вещества. В химико-токсикологическом анализе широкое применение находят газо-жидкостная (ГЖХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

ГЖХ имеет некоторые преимущества перед ВЭЖХ:

- дешевле приборы;
- колонки можно приготовить в лаборатории;
- выше чувствительность, особенно в случае применения масс-спектрального детектора, ДЭЗ;
- требуется малый объем пробы.

Однако при определении веществ этим методом требуется достаточная летучесть определяемых веществ, сложная пробоподготовка, удаление нелетучих примесей, приготовление безводного раствора.

Известные способы перевода нелетучих веществ в летучие сложны и трудоемки. Проведение анализа при высоких температурах колонки (200–300⁰С) приводит к деструкции определяемого вещества, что является причиной ошибок.

Метод ВЭЖХ позволяет анализировать водные растворы, сокращается время анализа, быстрое установление равновесия между подвижной и неподвижной фазами, отпадают ограничения по термоустойчивости, не требуется летучесть веществ. Применение специфических и неразрушающих методов детектирования позволяет, например, снимать электронные спектры отдельных фракций.

К недостаткам ВЭЖХ можно отнести: малая чувствительность детекторов, ограниченные возможности спектрофотометрического детектора (180–700 нм), более дорогостоящая аппаратура и сложность заполнения колонок. Методики с применением метода ВЭЖХ требуют значительных количеств высокочистых органических растворителей. Очистка растворителей в лабораториях весьма трудоемкий процесс, а очищенные растворители дорогие. Чувствительность метода определяется типом используемого детектора. Наиболее чувствительными являются флуоресцентный и МС-детекторы, наиболее универсальными – спектрофотометрический.

Вариант распределительной хроматографии с обращенной фазой наиболее часто применяется и позволяет определять большое количество веществ. В качестве подвижной фазы используются водно-органические смеси, как правило, это буферные растворы с добавкой смешивающихся с водой органических растворителей (метанол, ацетонитрил, реже – ацетон).

Предложены методики прямого ВЭЖХ – определения лекарственных веществ в биологических жидкостях после предварительного осаждения белков. В настоящее время в основном применяются обращенные фазы с «привитыми» алкильными заместителями (C₁₈, реже C₈).

В таблице 12.1 представлена сравнительная оценка основных инструментальных методов определения лекарственных веществ в биологических объектах.

Таблица 12.1

Сравнительная оценка инструментальных методов определения лекарственных веществ в биологических объектах

Методы	Чувствительность		Сложность	Избирательность	Универсальность	Суммарная оценка
	в граммах	оценка				
Хромато-масс-спектрометрия	10^{-11} - 10^{-12}	5	-5	5	4	9
Иммунохимические	10^{-10} - 10^{-11}	5	-1	4	1	9
Газовая хроматография: - ДЭЗ	10^{-10}	5	-4	4	2	7
-ДИП	10^{-8} - 10^{-9}	4	-3	2	4	7
Жидкостная хроматография: - УФ-детектор	10^{-7}	3	-3	4	4	8
- флуоресцентный детектор	10^{-8} - 10^{-9}	4	-4	5	2	7
ТСХ	10^{-6} - 10^{-7}	3	-1	2	4	7
Спектрофотометрия	10^{-6} - 10^{-7}	3	-2	2	4	7
Флуориметрия	10^{-8} - 10^{-9}	4	-2	4	1	7

По суммарной оценке некоторое преимущество имеют хромато-масс-спектрометрия и иммунохимические методы. Однако эти методы имеют и определенные недостатки (дорогостоящее оборудование, наборы специфических реактивов и др.).

12.2. Хроматографические методы

В химико-токсикологическом анализе широко применяются методы газовой и жидкостной хроматографии. Метод газовой хроматографии рассмотрен в первом томе «Токсикологическая химия».

12.2.1. Жидкостная колоночная хроматография

В методах жидкостной хроматографии (ЖХ) подвижной фазой является жидкость. Классификация методов жидкостной хроматографии проводится по 8 основным признакам (агрегатное состояние хроматографической системы, способ перемещения сорбата, конфигура-

ция разделяющей системы, относительная полярность подвижной и неподвижной фаз, механизм разделения веществ, цели и задачи, химическое превращение сорбата, способ детектирования).

В зависимости от агрегатного состояния фаз различают жидкостно-адсорбционную и жидкостно-жидкостную хроматографию. По способу перемещения сорбата выделяют следующие виды жидкостной хроматографии: вытеснительная, фронтальная, элюентная. По конфигурации разделяющей системы выделяют планарную (тонкослойную, бумажную) и колоночную. По относительной полярности подвижной и неподвижной фаз различают нормально- и обращенно-фазовую хроматографию. По механизму разделения выделяют адсорбционную, распределительную, эксклюзионную, аффинную, лигандообменную, ионообменную и другие виды жидкостной хроматографии. По химическому превращению сорбата выделяют реакцию и осадочную хроматографию. По способу детектирования различают хроматографические методы, сочетающие разделение компонентов смеси с прямым детектированием веществ спектрофотометрическими, рефрактометрическими, флуориметрическими, хемилюминесцентными, электрохимическими и другими детекторами.

К основным особенностям жидкостной хроматографии относятся:

1. Метод ЖХ позволяет анализировать смеси почти всех растворимых веществ, в том числе и тех, которые не могут быть проанализированы методом газовой хроматографии.

2. Для оптимизации условий разделения веществ учитывают не только взаимодействия молекул разделяемых веществ с неподвижной фазой, но и с подвижной фазой.

3. Разделение веществ методом ЖХ происходит при низких температурах (в отличие от ГХ), что иногда повышает эффективность разделения.

Отличие теоретических положений ЖХ от газовой хроматографии состоит в том, что в жидкостях по сравнению с газом возрастает плотность (в 10^3 раз) и вязкость (в 10^2 раз), а коэффициенты диффузии уменьшаются в 10^4 раз. Поэтому процесс массообмена в ЖХ идет медленнее, чем в газовой хроматографии.

Основное влияние на ширину хроматографической полосы оказывает вихревая диффузия и массопередача, которые существенно зависят от диаметра частиц неподвижной фазы.

Уравнение Ван-Деемтера с определенными дополнениями применимо и к жидкостной хроматографии. Коэффициент А, отражающий вклад вихревой диффузии в размывание зоны, в приложении к жидкостной хроматографии принимает вид $d_p U^\beta$, где U – скорость подвижной фазы, β – коэффициент (определяется из опытных данных), d_p – средний диаметр частиц сорбента. Коэффициент В в уравнении Ван-

Деемтера в приложении к жидкостной хроматографии равен $2\gamma D_m$, где γ – коэффициент извилистости, учитывающий ограничение пути диффузии в извилистых каналах между зернами сорбента, D_m – коэффициент диффузии вещества в подвижной фазе. Продольная диффузия в жидкостной хроматографии незначительно влияет на размывание полосы. Вклад продольной диффузии большинства исследуемых соединений в подвижном растворителе в общую высоту тарелки равен примерно 10^{-3} см.

Величина третьего слагаемого в уравнении Ван-Деемтера отражает вклад процессов массопередачи и кинетики сорбции–десорбции в размывание зоны:

$$CU = \left(\frac{grd^2}{D_s} + \frac{wd_p^2}{D_m} \right) U \quad (12.1)$$

где g – коэффициент, зависящий от геометрии каналов; r – константа, зависящая от относительной скорости перемещения подвижной фазы и растворенного вещества; d – длина диффузионного пробега молекулы в неподвижной фазе; w – коэффициент, зависящий от структуры сорбента и геометрии колонки; d_p – диаметр частиц сорбента; D_m и D_s – коэффициенты диффузии вещества в подвижной и неподвижной фазах.

Полное уравнение Ван-Деемтера для жидкостной хроматографии имеет вид:

$$H = d_p U^{\beta} + \frac{2\gamma D_m}{U} + \left(\frac{grd^2}{D_s} + \frac{wd_p^2}{D_m} \right) U \quad (12.2)$$

Коэффициент S для ВЭЖХ является очень важным, так как зависит от скорости массообмена между подвижной и неподвижной фазами. Величина коэффициента S зависит от внутренних свойств сорбента: размера и формы пор, однородности их по размерам и форме и др.

Основными принципами, на которых основано разделение в жидкостной хроматографии, являются: адсорбция, распределение, ионный обмен, эксклюзия. Разделение компонентов смеси обычно осуществляется по нескольким механизмам одновременно.

Жидкостная хроматография по конструктивным особенностям подразделяется на открытые системы и замкнутые системы (ВЭЖХ).

Классическая жидкостная хроматография в стеклянных колонках при нормальном давлении, предложенная М.С. Цветом, в настоящее время используется в препаративных целях для предварительного разделения и для демонстрационных экспериментов. В настоящее время

широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – скоростная жидкостная хроматография. Высокая эффективность скоростной жидкостной хроматографии обеспечивается применением частиц с диаметром 3–10 мкм и высокого давления. Уменьшение размера частиц снижает высоту теоретической тарелки и, соответственно, повышает эффективность разделения. ВЭЖХ – это современная форма реализации классической жидкостной колоночной хроматографии.

Высокоэффективная жидкостная хроматография используется для разделения и определения молекул (жидкостная адсорбционная и жидкостная распределительная хроматография), для разделения макромолекул (гель-хроматография), для разделения и определения ионов (ионообменная, ионная и ион-парная хроматография).

Основные теоретические положения классической колоночной ЖХ и ВЭЖХ практически одинаковы.

В настоящей главе рассмотрены основы и аналитические возможности важнейших методов жидкостной колоночной хроматографии (адсорбционная, распределительная, ионообменная, ионная, ион-парная, лигандообменная, эксклюзионная, аффинная) и планарной хроматографии (тонкослойная, бумажная).

Качественный и количественный анализ методом жидкостной хроматографии. Качественный анализ смеси методом ЖХ проводят аналогично идентификации компонентов смеси методом газовой хроматографии, т.е. определяют времена или объемы удерживания $t_R(V_R)$ и рассчитывают относительное время удерживания.

Количественное определение компонентов смеси основано на пропорциональной зависимости высоты пика или его площади от количества хроматографируемого компонента. Основными методами определения количественного состава смесей являются метод градуировочного графика и метод внутреннего стандарта. В ВЭЖХ метод нормировки редко используется, так как в методе ВЭЖХ нет детектора (подобного катарометру в ГХ), обладающего общей чувствительностью к соединениям различной химической природы.

В современных хроматографах пики обрабатываются с помощью компьютеров и исследователь (аналитик) получает нужные параметры в печатном виде: название веществ, времена удерживания, площади пиков и содержание компонентов анализируемого образца.

12.2.1.1. Жидкостная адсорбционная хроматография

Если неподвижной фазой является твердое вещество и элементарным актом взаимодействия анализируемого вещества (сорбата) с твердой фазой (сорбентом) является акт адсорбции – это жидкостная адсорбционная хроматография.

В зависимости от полярности подвижной и неподвижных фаз различают два варианта адсорбционной жидкостной хроматографии: нормально-фазовой и обращенно-фазовой. Если применяют полярные сорбенты (силикагель, оксид алюминия) и неполярные подвижные фазы (гексан и др.) – это нормально-фазовой вариант. Методом нормально-фазовой хроматографии разделяют многие полярные вещества. При выборе растворителя учитывают его полярность: с увеличением полярности растворителя элюирующая способность возрастает.

Основные преимущества силикагеля – относительная инертность, большая адсорбционная емкость, легко поддается модификации. Силикагель $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ имеет аморфную структуру, на его поверхности имеется несколько типов беспорядочно распределенных силанольных ОН-групп (рис. 12.1).

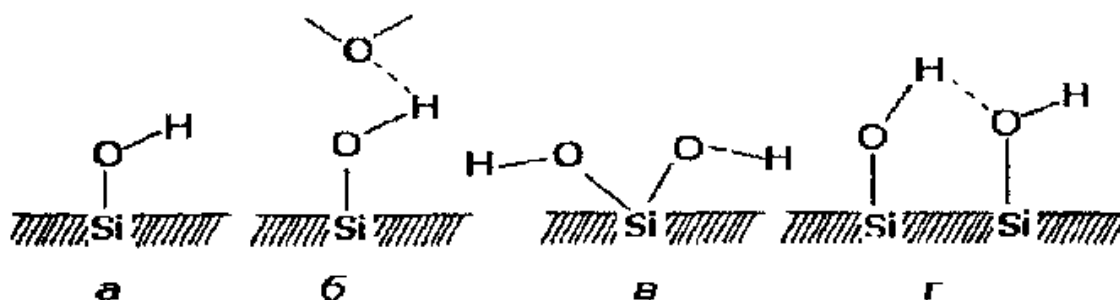


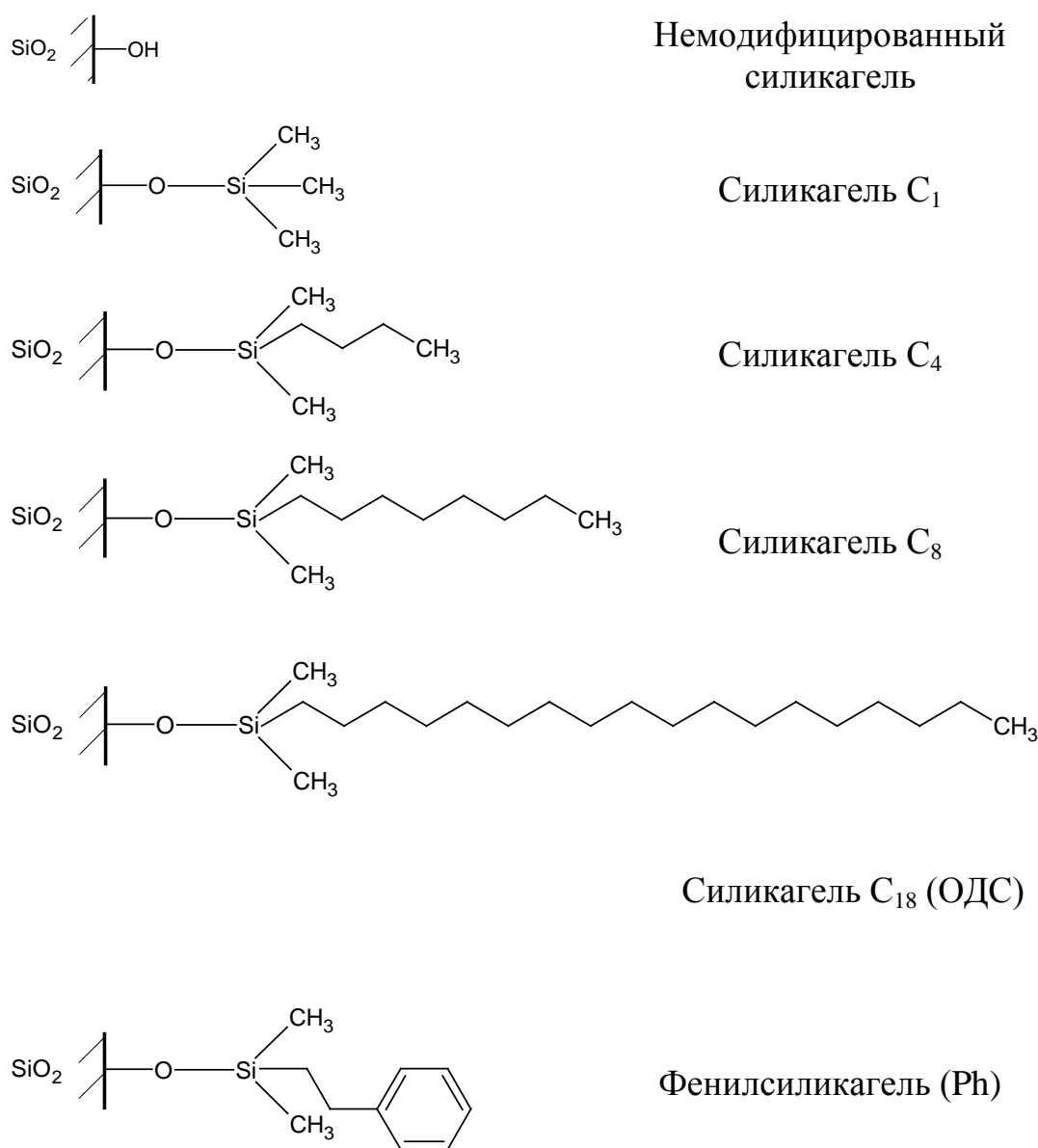
Рис. 12.1. Типы гидроксильных групп на поверхности силикагеля: а) свободная ОН-группа; б) связанная ОН-группа; в) геминальная ОН-группа; г) реакционноспособная ОН-группа.

Введение различных функциональных групп (CN , NO_2 , NH_2 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) позволяет изменить свойства и селективность силикагелей. С применением нормально-фазовой хроматографии достигается высокая селективность разделения пространственных изомеров (орто-, мета-, пара-изомеров ароматических соединений).

Название метода обращенно-фазовой хроматографии было предложено Говардом и Мартином в 1950 г. В этом методе изменяют на противоположную обычную полярность подвижной и неподвижной фаз. Под термином «хроматография с обращенными фазами» понимают использование в хроматографическом процессе менее полярных,

чем растворитель, неподвижных фаз. Например, было замечено, что при замене силикагеля (полярный сорбент) и толуола (менее полярный растворитель) на уголь (неполярный сорбент) и воду (полярный растворитель) последовательность элюирования смеси жирных кислот меняется.

В обращенно-фазовой адсорбционной хроматографии применяют полярные подвижные фазы и неполярные сорбенты. Соединения с неполярными группами сорбируются на неполярном сорбенте. В качестве подвижной фазы применяют сильнополярные растворители (вода, ацетонитрил или смеси воды со спиртами). Гидрофобным неполярным сорбентом является силикагель, химически модифицированный хлорсиланом $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$. Вместо гидроксильных групп такой силикагель содержит эфирную силильную группу (рис.12.2):



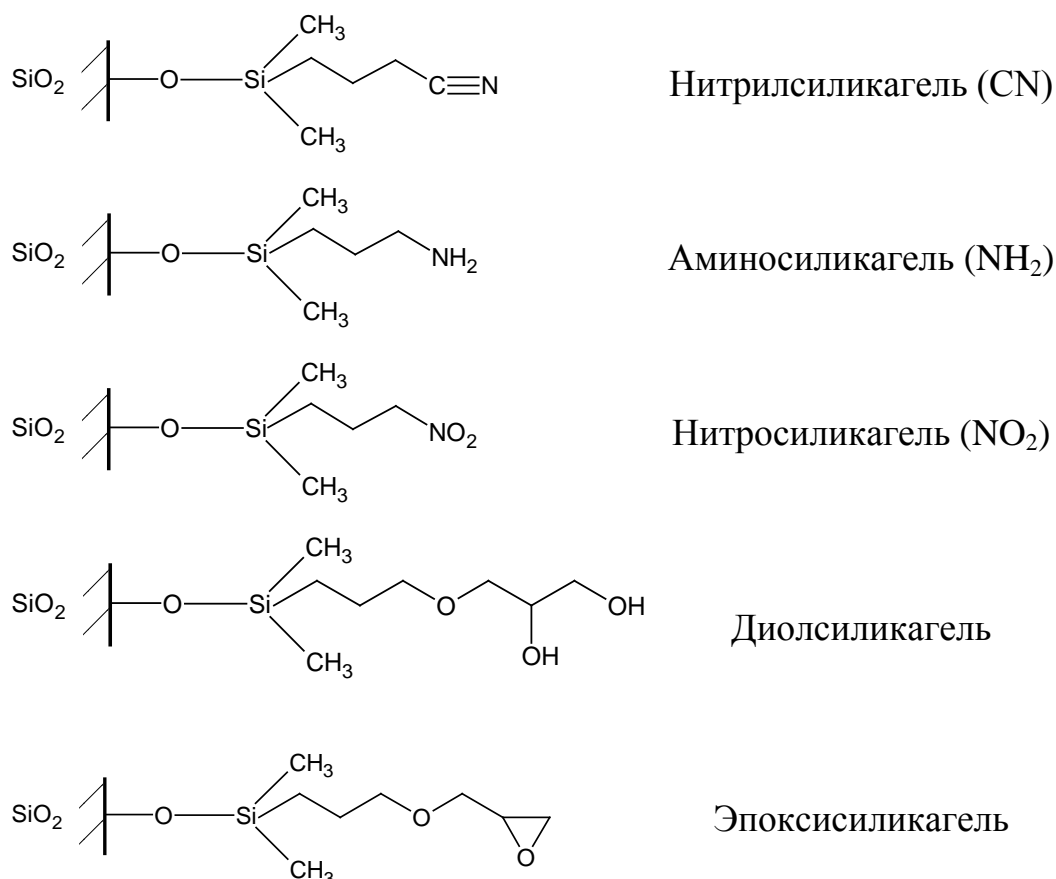


Рис. 12.2. Структуры некоторых модифицированных силикагелей

Такие сорбенты относят к химически привитым сорбентам. В зависимости от природы органического радикала получены разные сорбенты: метилсиликагель (силикагель C₁) применяется обычно в обращенно-фазовой хроматографии для разделения высокомолекулярных соединений; силикагель C₁₈ пригоден для работы в режиме ион-парной хроматографии, обладает высокой селективностью по отношению к гомологам; аминсиликагель используется как в обращенно-фазовой, так и в нормально-фазовой хроматографии, находит применение как слабый ионообменник для разделения кислот; нитрилсиликагель используется в системах с водными и органическими подвижными фазами, присутствие нитрильной группы изменяет селективность этого сорбента по сравнению с исходным силикагелем.

ОФХ применяется чаще, чем НФХ, так как сорбенты с привитыми неполярными группами имеют определенные преимущества: более устойчивы к действию растворителей, воды, изменению рН; механическая устойчивость к высоким давлениям; быстрота установления равновесия при смене элюента, возможность варьировать селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки. Применение градиентного элюирования (постепенного измене-

ния состава элюента) в ОФХ позволяет элюировать из колонки как слабо-, так и сильноудерживающиеся вещества с хорошим разделением.

Адсорбционная жидкостная хроматография по эффективности не только конкурирует с газовой хроматографией, но и имеет существенные преимущества. Это высокочувствительный, селективный и экспрессный метод разделения и анализа многокомпонентных смесей в растворах.

Адсорбционная жидкостная хроматография выполняется в двух вариантах (колоночная и в тонком слое сорбента).

Теория адсорбционной жидкостной хроматографии базируется на теории адсорбции из многокомпонентных растворов. Адсорбция из растворов подчиняется уравнению изотермы мономолекулярной адсорбции Лэнгмюра:

$$n = n_{\infty}bc/(1 + bc) \quad (12.3)$$

где n – количество адсорбированного вещества;

n_{∞} - возможное максимальное количество вещества на адсорбенте;

c – концентрация;

b – постоянная (константа равновесия адсорбции).

Изотерма адсорбции в области разбавленных растворов линейна:

$$n = n_{\infty}bc \quad (12.4)$$

Область линейной адсорбции называют областью Генри.

Связь величины ВЭТТ (H) со скоростью подвижной фазы U выражается уравнением:

$$H = 2R_A(1 - R_A)Ut_s \quad (12.5)$$

где $R_A = t_m/(t_m + t_s)$; t_m – среднее время между десорбцией и повторной адсорбцией молекулы вещества; t_s – среднее время пребывания молекулы в неподвижной фазе.

Время, необходимое для адсорбции и десорбции вещества, связано с глубиной пор сорбента (d) и коэффициентом диффузии (D) уравнением Эйнштейна:

$$d^2 = 2Dt_s \quad (12.6)$$

После подстановки уравнения (12.6) в уравнение (12.5):

$$H = R_A(1 - R_A)Ud^2/D \quad (12.7)$$

С увеличением величины d увеличивается значение H и, соответственно, уменьшается эффективность колонки. Поэтому большая глубина пор адсорбента является одной из основных причин низкой эффективности.

Силы взаимодействия молекул сорбата и сорбента определяют селективность сорбента. Различают три вида таких сил.

Для *лондоновских* дисперсионных сил не предполагается образование химических связей. Результатом действия таких сил является физическая адсорбция (низкие значения энергии, быстрое установление равновесия). Например, адсорбция на неполярном адсорбенте (графитированная сажа) обусловлена дисперсионным взаимодействием.

Примером проявления *индукционных* сил можно считать адсорбцию на оксиде алюминия. В результате поляризации электронов соседних атомов или молекул в постоянном электрическом поле появляется индуцированный дипольный момент.

В адсорбции существенное значение имеют *специфические* силы, например, водородные связи. Наличие на поверхности адсорбента гидроксильных групп делает такой адсорбент специфичным по отношению к таким соединениям, как эфиры, нитрилы и др.

Свойства системы сорбат-сорбент определяют селективность хроматографической колонки. Эффективность разделения смеси определяется величиной ВЭТТ (H), так как эффективность зависит от процессов диффузии и массопередачи в обеих фазах.

12.2.1.2. Жидкостный хроматограф

Жидкостный хроматограф является более сложным прибором по сравнению с газовым, так как включает несколько дополнительных узлов: насосы и измерители давления, система дегазации и др.

Устройство для жидкостной хроматографии (рис. 12.3) состоит из нескольких модулей:

- емкости для растворителей (1);
- смесительная камера (2);
- насос (3);
- инжектор (4);
- колонка (5)
- детектор (6);
- регистрационная система (7).

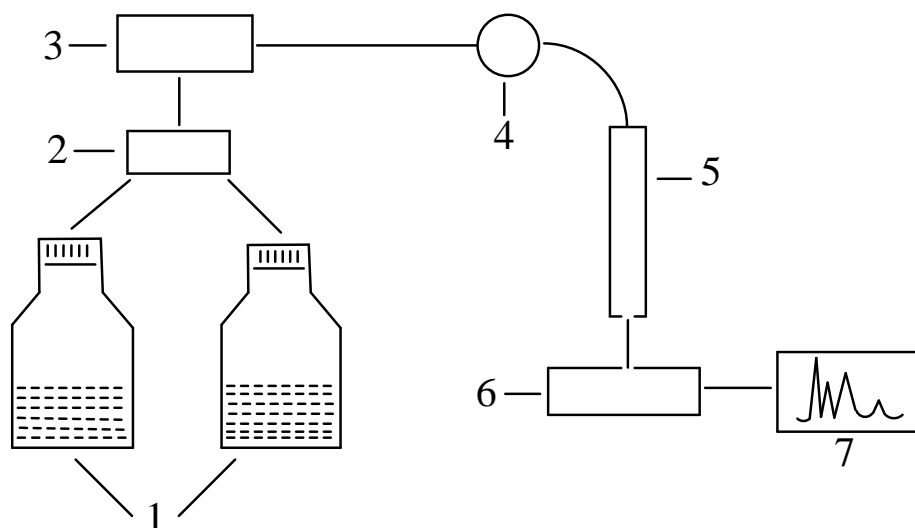


Рис. 12.3. Схема жидкостного хроматографа.

Насосы для ЖХ должны обеспечивать постоянную подачу растворителя в колонку и создавать давления до нескольких мегапаскалей. Насосы должны удовлетворять основным требованиям:

1. Химическая инертность материалов к подвижной фазе.
2. Достаточно высокое рабочее давление.
3. Высокая стабильность скорости потока.

Насосы, применяемые в ВЭЖХ, делят на две группы: постоянной скорости (расхода) и постоянного давления. Для насосов постоянного давления характерны высокая производительность и отсутствие пульсации. Насос с пневмоусилителем является наиболее совершенной конструкцией насосов этого типа. Недостатком насосов постоянного давления – изменение расхода подвижной фазы при изменении сопротивления системы.

К насосам постоянного расхода относятся шприцевые и возвратно-поступательные. Наиболее широко в ВЭЖХ применяются возвратно-поступательные насосы. Они бывают поршневые (плунжерные) и мембранные (диафрагменные). Прокачивание раствора в обоих случаях происходит за счет возвратно-поступательного движения поршня или мембраны. Основным достоинством поршневых насосов является возможность изменять производительность при использовании сменных головок с разным диаметром поршня. Ассортимент возвратно-поступательных насосов, выпускаемых различными фирмами мира, весьма широк.

Работа насоса считается оптимальной, если он обеспечивает поток жидкости от 0,5 до 10 мл/мин при давлении 400–500 атм.

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет значительно увеличить эффективность хроматографического разделения, так как используют сорбенты с размером частиц 3–10 мкм.

Заданный расход элюента поддерживается насосом с высоким рабочим давлением.

Жидкостные хроматографы в зависимости от способа элюирования бывают изократические и градиентные. При градиентном элюировании используются два различных типа жидкостных хроматографов. В первом типе хроматографов состав подвижной фазы формируется на линии низкого давления, во втором типе – состав градиента ПФ формируется на линии высокого давления.

12.2.1.3. Колонки

При выборе условий хроматографического разделения учитывают параметры колонки: длину, внутренний диаметр, материал, плотность насыпки адсорбента, скорость протекания элюента, градиент давления, температура, объем пробы. От длины колонки зависит эффективность и селективность колонки, а также продолжительность анализа.

Повышение температуры разделения улучшает эффективность колонок в обращенно-фазовой, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. При стабилизации температуры повышается точность количественных определений, поэтому использование термостатов желательно, а иногда и обязательно. Для большинства работ в ВЭЖХ достаточным является диапазон термостатирования до 100 °С.

С увеличением диаметра колонки повышается производительность, но уменьшается скорость движения подвижной фазы, происходит размывание хроматографических пиков.

Основной материал для изготовления колонок – нержавеющая сталь или толстое стекло.

От плотности заполнения колонки зависит постоянство скорости потока подвижной фазы, а разделительная способность колонки и продолжительность анализа определяются скоростью потока подвижной фазы.

Градиент давления в колонке зависит от многих факторов: вязкость подвижной фазы, длина колонки, диаметр частиц, скорость потока подвижной фазы.

Перед подачей подвижной фазы в колонку необходима дегазация жидкости. Выделение пузырьков газа в колонке снижает её эффективность, а при попадании пузырьков газа в детектор появляются беспорядочные колебания нулевой линии.

Основные способы дегазации – нагревание или вакуумирование. Если при нагревании изменяется состав подвижной фазы, то применяют вакуумирование. Для дегазации применяют также мембранные фильтры и барботирование.

12.2.1.4. Адсорбенты

По механическим свойствам неподвижные фазы (адсорбенты) делят на мягкие, которые выдерживают давление до 0,2 мПа (изготовлены на основе целлюлозы, полистирола, полиакриламида и др.), полужесткие – выдерживают давление до 10 мПа (на основе поливинилового спирта, полистирола) и жесткие – работают при давлении до 50 мПа (изготовлены из стекла, оксидов кремния, алюминия, циркония).

К адсорбентам, применяемым в жидкостной адсорбционной хроматографии, предъявляются определенные требования: высокие эффективность и селективность, достаточная скорость хроматографирования. Таким требованиям отвечают поверхностно-пористые сорбенты и обычные объемно-пористые сорбенты, обладающие небольшой удельной поверхностью. Поверхностно-пористые сорбенты обладают большой механической прочностью, небольшим сопротивлением потоку и хорошо регенерируются. Отсутствие глубоких пор в поверхностно-пористых сорбентах снижает время пребывания вещества в подвижной фазе, находящейся в порах, и, соответственно, увеличивается скорость массообмена.

Сорбенты, используемые в жидкостной хроматографии, отличаются не только материалом, поверхностной модификацией, но и размерами зерен сорбента (в микрометрах, нм или в «меш»). Величина зерна в мешах соответствует числу отверстий на дюйм самого тонкого сита, через которое может пройти зерно. Ситовые шкалы (номер сита), принятые за стандарт в разных странах, различаются. В колоночной жидкостной хроматографии применяются сорбенты с зернением 80–200 меш (стандарт США), а в планарной (плоскостной) хроматографии > 250 меш. Малый разброс в мешах указывает на однородность зерен по размерам и обеспечивает более эффективное разделение.

В жидкостной адсорбционной хроматографии применяют силикагели, алюмогели, силикат натрия, гидроксид кальция и другие объемно-пористые мелкозернистые адсорбенты.

На основе кремнезема выпускается несколько марок силохромов (силохромы 1; 2; 3; С-80; С-120). Они имеют удельную поверхность от 30 до 120 м²/г и малый диаметр пор (30–150 нм).

В таблице 12.2 дана классификация адсорбентов для жидкостной адсорбционной хроматографии (ЖАХ).

Таблица 12.2

Классификация адсорбентов для ЖАХ

Класс	Общая классификация	Типичные представители
I	Полярные неорганические	силикагель, оксид

Глава 12. Методы определения лекарственных и наркотических веществ

		алюминия, оксид магния
II	Неполярные неорганические	графит, уголь
III	Полимерные привитые	Пропиламин, бутиронитрил, фазы, содержащие диольные группировки (-O-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ OH)
IV	Неполярные органические	привитые фазы C ₈ , C ₁₈
V	Полярные органические	целлюлоза, хитин, полиамид

Полярные адсорбенты (SiO₂, Al₂O₃, силикат магния и др.) имеют на поверхности OH-группы. Недостаток этих адсорбентов – высокая чувствительность к воде в растворителях: силоксановые группы -Si-O-Si- переходят в силанольные ≡Si-OH, что приводит к изменению свойств поверхности.

При выборе адсорбента необходимо иметь в виду, что они обладают кислыми или основными свойствами и анализируемые вещества могут претерпевать химические превращения. Поэтому такие адсорбенты требуют определенной подготовки (модифицирование), длительного промывания водой и др. Влияние окислителей можно уменьшить при хроматографировании в среде азота.

Адсорбентами заполняют колонки, изготовленные из специальных сортов стекла (дюран, пирекс). Стандартная колонка имеет длину 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм и заполнена частицами размером 5 или 10 мкм. При работе с такой колонкой достигается эффективность около 50000 теоретических тарелок на метр. В микроколоночной ВЭЖХ частицы имеют размер 3 мкм, а длина колонки – 30–75 мм при внутреннем диаметре – 1 мм. Для предварительного разделения применяют короткие предколонки, заполненные более крупным сорбентом.

Применение сорбентов заводского производства и хроматографирование в строго определенных условиях способствует лучшей воспроизводимости результатов.

При использовании силикагеля в качестве неподвижной фазы времена удерживания увеличиваются в определенной последовательности: алкены < ароматические углеводороды < галогенсодержащие соединения и сульфиды < простые эфиры < нитросоединения < сложные эфиры, спирты, амины < сульфоны < сульфоксиды < амиды < карбоновые кислоты.

Метод адсорбционной хроматографии применяется чаще для неполярных соединений, так как они мало растворимы в воде и не могут

быть разделены методом распределительной жидкостной хроматографии.

В жидкостной хроматографии используют и специальные сорбенты, например, хиральные сорбенты для разделения рацемических смесей энантиомеров, нуклеотидов и нуклеозидов, олигонуклеотидов и РНК, биополимеров и вирусов. Для разделения энантиомеров в рацемических смесях получены сорбенты как на основе хиральных смол, так и на основе силикагеля с привитыми динитробензолпроизводными фенилглицина и лейцина и с привитыми производными нафтилаланина. Для определения лекарственных веществ в биологических жидкостях без удаления из сыворотки пептидов выпускают бифункциональные «сорбенты Пинкертон» на основе силикагеля, внешняя поверхность которых гидрофилизирована, а внутренняя гидрофобизирована. Привитая фаза – трипептид глицилфенилаланила. Молекулы белков не проникают внутрь глобул, а лекарственные вещества проникают внутрь пор сорбента и разделяются.

12.2.1.5. Подвижные фазы

В качестве подвижной фазы в колоночной жидкостной адсорбционной хроматографии применяется жидкий растворитель или смесь растворителей.

К растворителю предъявляются определенные требования:

1. Он должен хорошо растворять все компоненты анализируемой смеси.
2. Не должен взаимодействовать с определяемыми веществами, адсорбентом, кислородом воздуха.
3. Не должен необратимо адсорбироваться на применяемом адсорбенте.
4. Должен быть маловязким, доступным, не содержать примесей.
5. Должен обеспечивать нормальную работу применяемого детектора.
6. По окончании хроматографического процесса растворитель должен полностью удалять все адсорбированные вещества с поверхности адсорбента.

Очистка растворителей. От свойств и качеств используемых растворителей во многом зависит работа хроматографа. К основным способам очистки растворителей относятся: фильтрование, дегазация (деаэрация), очистка от химических примесей. Перед использованием подвижная фаза должна быть профильтрована через мембранный фильтр с размером пор 0,5 мкм. Наличие механических примесей в подвижной фазе сказывается на работе насоса, приводит к увеличению сопротивления колонки.

Дегазация (удаление газов) особенно необходима при работе с вредными элюентами. Обычно через барботер в резервуар с растворителем пропускают гелий или азот, которые увлекают за собой растворенные газы. При насыщении азотом удаляется нежелательный компонент (кислород), который является причиной образования газовых пузырьков и может реагировать с подвижной фазой и сорбентом. Для дегазации используется и обработка ультразвуком.

Очистка от химических примесей проводится в основном двумя способами: перегонка и адсорбционное отделение примесей. В качестве адсорбентов используют оксид алюминия и силикагель с большой удельной поверхностью и размером зерна 0,1–0,5 мм. Предварительно сорбенты сушат в течение нескольких часов при температуре 250–300⁰С (оксид алюминия) и 160–180⁰С (силикагель).

Полярность растворителей. В жидкостной хроматографии высокая селективность разделения компонентов достигается не только выбором селективного адсорбента, но и подбором системы растворителей.

В таблице 12.3 дана классификация растворителей для ЖАХ.

Таблица 12.3

Классификация растворителей для ЖАХ

Классификация	Общая классификация	Представители
N	Неполярные, средней полярности	Гептан, бутилхлорид, бензол, хлороформ
P	Неамфотерные полярные	Метилэтилкетон, тетрагидрофуран, этилацетат, ацетонитрил
AB	Амфотерные полярные	n-пропанол, метанол, вода

В качестве критерия полярности растворителей М.С. Цвет использовал диэлектрическую проницаемость ϵ_r . Диэлектрическая проницаемость измерена как для индивидуальных растворителей, так и для смешанных растворителей. В зависимости от величины диэлектрической проницаемости различают полярные и неполярные растворители. Диэлектрическая проницаемость характеризует диссоциирующую способность растворителя. Однако диэлектрическая проницаемость не позволяет описать молекулярные взаимодействия между веществом и растворителем.

Дипольный момент (μ) дополняет диэлектрическую проницаемость при характеристике полярности вещества, он определяет полярность растворителя на молекулярном уровне. Дипольный момент ха-

характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц.

Произведение ϵ_r на μ известно как электростатический коэффициент EF . В зависимости от величины этого коэффициента растворители делят на 4 группы: углеводородные растворители ($EF = 0 - 7 \cdot 10^{-30}$ Кл·м), электронодонорные растворители ($EF = 7 \cdot 10^{-30} - 70 \cdot 10^{-30}$ Кл·м), гидроксидные растворители ($EF = 50 \cdot 10^{-30} - 170 \cdot 10^{-30}$ Кл·м) и биполярные растворители ($EF \geq 170 \cdot 10^{-30}$ Кл·м).

В качестве критерия полярности Гильдебранд предложил параметр растворимости δ_T , который характеризует количество работы, затрачиваемой на отделение молекул растворителя друг от друга. Наиболее высокий параметр растворимости у воды ($52,2 \text{ МПа}^{1/2}$). Значения параметров растворимости для других веществ лежат в пределах $14 - 34 \text{ МПа}^{1/2}$. Однако параметр растворимости δ_T не объясняет значительных различий веществ с близкой полярностью. Например, хлористый метилен и диоксан имеют близкие значения полярности, однако хлористый метилен не растворяется в воде, а диоксан смешивается с водой в любых соотношениях.

Сольватохромный параметр Димрота – Райхардта $E_T(30)$, применяемый в хроматографии, рассчитывается на основании взаимодействия растворителя с N-феноксипиридинийбетаиновым красителем. Степень полярности растворителя характеризуется энергией электронного перехода полосы переноса заряда. Более полярному растворителю соответствуют более высокие значения $E_T(30)$.

Сольватохромный эффект бетаинового красителя зависит от растворителя и регистрируется в широком спектральном диапазоне в видимой области спектра: красный – в метаноле, фиолетовый – в этаноле, зеленый – в ацетоне, голубой – в изоамиловом спирте и желто-зеленый – в анизоле. Недостаток такого красителя – малая растворимость в неполярных растворителях. Поэтому был предложен другой более липофильный бетаиновый краситель, структура которого отличается наличием трет-бутильных заместителей в *para*-положении пяти фенильных радикалов.

Снайдер предложил параметр полярности P' , который рассчитывают по формуле:

$$P' = \lg K'_e + \lg K'_d + \lg K'_n \quad (12.8)$$

где K'_i – коэффициенты распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между газовой фазой и исследуемым растворителем. Индексы e , d и n обозначают этанол, диоксан и нитрометан. Высокое значение P' имеет вода, а низкие значения P' – у насыщенных углеводов.

Значения параметра P' определены методом газовой хроматографии. Для количественной оценки полярности растворителей в жидкостной хроматографии эти значения оказались менее точными.

В таблице 12.4 приведены численные значения рассмотренных параметров полярности растворителей.

Таблица 12.4
Параметры полярности растворителей при 25 °С

Растворители	ϵ_T	μ, D	$\delta_T, \text{МПа}^{1/2}$	$E_T(30), \text{кДж/моль}$	P'
Пентанол	13.90	1.80	20.05	205.4	3.5
Изопентанол	14.70	1.82		205.0	3.6
Анизол	4.33	1.25	18.61	155.2	3.5
Анилин	6.99	1.51	21.1	185.3.	6.3
Ацетон	20.54	2.70	21.50	176.6	5.1
Ацетонитрил	35.94	3.44	26.90	190.8	5.8
Бензол	2.23	0	19.86	143.5	2.7
Бутан-1-ол	17.10	1.66	23.30	210.1	3.9
Бутан-2-ол	16.40	1.55	22.09	197.1	4.0
Изобутанол	18.50	1.79	20.86	203.3	4.0
Бутилацетат	5.10	1.84	17.39	161.1	
Вода	78.54	1.83	52.20	264.0	10.2
Гексан	1.88	0.08	15.84	129.7	0.1
Гептан	1.93	0	16.18	130.1	0.2
Глицерин	42.5	2.56		238.5	
Диизопропиловый Эфир	3.88	1.13	14.52	142.7	2.4
ДМСО	48.50	3.96	26.18	188.7	6.4
ДМФА	36.71	3.8	24.14	183.3	6.4
1,4-Диоксан	2.21	0.45	21.78	150.6	4.8
1,2-Дихлорэтан	10.38	1.86	21.76	172.8	3.8
Диэтиламин	3.80	1.11		148.1	
Диэтиленгликоль	29.40	2.31	26.80	225.1	5.0
Диэтиловый эфир	4.27	1.15	16.20	144.4	2.8
Изооктан	1.94	0	14.99	130.1	0.1
<i>Мета</i> -Крезол	11.80	1.54		223.4	7.0
<i>пара</i> -Ксилол	2.27	0.02	17.94	138.5	2.4
Метанол	32.66	1.70	32.42	231.8	5.1
Метилацетат	6.68	1.61	18.82	167.4	
Метилизобутилкетон	13.1	2.79	17.18	164.8	4.2
Муравьиная кислота	58.0	1.41	24.75	227.2	
Нитробензол	35.50	4.03	22.70	165.8	4.5
Нитрометан	37.78	3.56	27.70	193.3	6.0

Глава 12. Методы определения лекарственных и наркотических веществ

Октан-1-ол	10.00	1.76	21.70	194.4	3.4
Пентан	1.84	0	15.65	129.7	0
Петролейный эфир	1.9	0			
Пиперидин	5.80	1.17			
Пиридин	12.4	2.37	21.27	169.5	5.3
Пропан-1-ол	20.33	1.657	25.10	212.2	4.0
Пропан-2-ол	19.13	1.66	25.30	202.5	3.9
Сероуглерод	2.60	0.06	20.45	137.2	1.0
ТГФ	7.39	1.75	20.21	156.5	4.0
Толуол	2.37	0.36	19.49	141.8	2.4
Трифторуксусная Кислота	8.26	2.28			
Триэтиламин	2.42	0.66	15.34	134.3	1.9
Уксусная кислота	6.30	1.7	20.70	216.4	6.0
Формаид	111.0	3.37	36.61	237.2	7.3
Хлорбензол	5.62	1.53	19.40	156.9	2.7
Хлористый метилен	8.93	1.14	21.85	170.3	3.1
Хлороформ	4.72	1.15	20.19	163.5	4.1
Циклогексан	2.02	0.0	16.77	129.4	0.2
Циклогексанон	18.3 ⁽²⁰⁾	3.01	20.3	166.5	4.5
Циклогексен	2.22	0.51			
Циклопентан	1.97	0	16.57		0.1
Тетрахлорметан	2.23	0	17.59	135.5	1.6
Этанол	24.55	1.68	27.92	217.1	4.3
Этилацетат	6.02	1.88	19.58	159.5	4.4
Этилбензол	2.4	0.35	17.98		
Этиленгликоль	37.7	2.28	34.77	235.6	6.9

Элюирующая способность растворителей. Элюирующая способность растворителей в адсорбционной жидкостной хроматографии оценивается безразмерной величиной ε° (энергия адсорбции растворителя, отнесенная к площади адсорбента, занятой растворителем). Элюирующая способность зависит от растворителя, адсорбента и других условий.

Для сравнения элюирующей способности растворителей используют параметры ε° , определенные на оксиде алюминия и силикагеле. Между этими величинами имеется зависимость: $\varepsilon^{\circ}(\text{SiO}_2) = 0,77 \varepsilon^{\circ}(\text{Al}_2\text{O}_3)$.

Элюирующую способность растворителя в случае работы с неорганическими адсорбентами (силикагелем, оксидом алюминия и др.) оценивают по шкале Гильдебранда, в основе которой лежит энергия

поляризации растворителей. Энергия поляризации *n*-пентана принята за нуль.

Элюирующая сила растворителя указывает на то, во сколько раз энергия сорбции этого растворителя больше энергии сорбции растворителя-стандарта (*n*-пентан). Различают слабые и сильные элюенты-растворители. Сильные растворители сильно адсорбируются неподвижной фазой, а слабые растворители слабо адсорбируются.

Растворители располагают в порядке изменения элюирующей силы в определенные ряды (элюотропные). Хроматографические растворители располагаются между неполярными алканами и полярной водой.

В таблице 12.5 представлен элюотропный ряд растворителей в порядке возрастания их элюирующей способности.

Таблица 12.5

Элюотропный ряд растворителей

Растворители	Адсорбенты			Растворители	Адсорбенты		
	Al ₂ O ₃	SiO ₂	MgO		Al ₂ O ₃	SiO ₂	MgO
Н-Пентан	0,00	0,00	0,00	Ацетон	0,56	0,47	-
Гексан	0,01	-	-	1,4-Диоксан	0,56	0,49	-
Циклопентан	0,05	-	0,03	Тетрагидрофуран	0,57	0,38	-
Четырех-хлористый углерод	0,18	0,11	0,10	Этилацетат	0,58	-	-
Бензол	0,32	0,25	0,22	Метилацетат	0,60	0,50	0,28
Хлороформ	0,40	0,26	0,26	Ацетонитрил	0,65	-	-
Хлористый метилен	0,42	0,38	0,26	Этанол	0,88	-	-
Диэтиловый эфир	0,46	0,38	0,21	Метанол	0,95		-

При выборе растворителя в случае работы с неполярными адсорбентами (активированные угли, графитированные сажи и др.) учитывают обратный порядок расположения растворителей по элюирующей способности (вода < метанол < этанол < ... < бензол).

Для повышения эффективности разделения смесей часто используют подвижные фазы более сложного состава (многокомпонентные элюенты). В ряде случаев это приводит к улучшению разделения. Однако применение тройных и более сложных систем растворителей не всегда оправдано, особенно если разделяемые смеси не являются сложными.

Таким образом, основными характеристиками подвижных фаз являются их элюирующая способность и эффективность.

При выборе элюента придерживаются определенных правил: с ростом числа двойных связей и ОН-групп сорбция увеличивается. Эмпирически установлено, что сорбция уменьшается в ряду органических соединений: кислоты > спирты > альдегиды > кетоны > сложные эфиры > углеводороды.

Применение легколетучих растворителей (температура кипения ниже 60 °С) приводит к невоспроизводимости величин удерживания, так как состав подвижной фазы в результате испарения изменяется. Высокая вязкость, характерная для менее летучих растворителей, требует использования высокого давления.

В зависимости от метода детектирования предъявляются определенные требования к растворителю. От разности коэффициентов преломления подвижной фазы и определяемых соединений зависит чувствительность рефрактометрического детектора. Понятно, что для спектрофотометрического детектора подвижная фаза должна быть прозрачна в определенной спектральной области.

Наиболее доступным растворителем является вода. Имеющиеся в ней примеси могут выходить в виде ложных пиков. Поэтому при выполнении, например, градиентного элюирования необходима продолжительная очистка воды в специальных системах.

Из других растворителей наиболее широко применяется метанол и ацетонитрил в обращенно-фазовой хроматографии, реже применяются тетрагидрофуран, этанол и диоксан. Эти растворители имеют низкую вязкость и хорошую растворяющую способность. Очистку ацетонитрила обычно проводят экстракцией примесей гексаном, а затем водно-ацетонитрильную фазу перегоняют при температуре 75–77 °С.

В нормально-фазовой хроматографии в основном применяют изопропанол, эфиры (диэтиловый), диоксан, тетрагидрофуран, а также алкилгалогениды (чаще хлороформ).

Из алканов наибольший практический интерес представляет гексан. Малая летучесть и низкая вязкость гексана позволяет использовать его для хроматографического разделения малополярных веществ.

Высокая токсичность паров ароматических углеводородов (бензол, толуол), а также непрозрачность их по отношению к УФ-свету являются основными недостатками при применении их в жидкостной хроматографии.

В таблице (см. «Приложения») приведены характеристики растворителей, применяемых в жидкостной хроматографии.

Применение индивидуальных растворителей и их смесей в качестве подвижных фаз не всегда позволяет достичь селективного разделения анализируемых компонентов. В ряде случаев образуются асимметричные аномально уширенные зоны, появляются пики с малыми временами удерживания, либо вещества не элюируются.

Для преодоления возникающих затруднений в подвижную фазу вводят специфические модификаторы в небольших количествах (0,01-2%), которые изменяют термодинамические характеристики системы. В качестве модификаторов используют кислоты, основания, соли. При этом изменяются ионная сила и рН системы.

В качестве примера специфических модификаторов можно отметить применение аммиака и фосфорной кислоты в обращенно-фазовой хроматографии для приготовления буферных растворов. Следует иметь в виду, что в фосфатных буферных растворах могут размножаться микроорганизмы. Поэтому их хранят в холодильнике.

Алифатические амины снижают полярность поверхности сорбента и соответственно изменяется эффективность разделения.

При подготовке подвижной фазы, состоящей из органического растворителя и буферного раствора, следует иметь в виду, что при смешивании может увеличиться рН на 1–2 единицы и элюент станет агрессивным к сорбенту. Поэтому необходимо указывать рН водной части, а не элюента.

В жидкостной хроматографии применяют два типа элюирования: изократическое и градиентное. В изократическом методе применяют один растворитель постоянного состава. В градиентном элюировании состав подвижной фазы непрерывно изменяется, например, доля метанола в смеси с водой увеличивается от 30 до 70% (об). В этом методе достигается эффект, аналогичный программированию температуры в газовой хроматографии: сокращается время анализа.

12.2.1.6. Детекторы

В жидкостной хроматографии применяют детекторы, позволяющие непрерывно фиксировать концентрацию определяемого вещества в подвижной фазе. Известно три типа детекторов:

1. Реагируют на определенное свойство растворителя (рефрактометрические, детекторы по электропроводности и диэлектрической проницаемости).

2. Реагируют на свойства определяемых веществ (спектрофотометрические, полярографические, детекторы по радиоактивности).

3. Работают после удаления растворителя (пламенно-ионизационный детектор).

Наиболее часто детекторы делят на оптические, электрические, электрохимические и детекторы для измерения радиоактивности.

В каждом конкретном случае подбирают подходящий детектор, так как универсального детектора для жидкостной хроматографии нет.

Оптические детекторы. Среди оптических детекторов различают ультрафиолетовые детекторы (190–380 нм), детекторы для видимой

области (380–800 нм), инфракрасные, рефрактометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные детекторы.

Работа спектрометрических детекторов основана на измерении поглощения света в УФ-, видимой и ИК-области. Они являются неdestructивными, имеют достаточную чувствительность, высокий линейный динамический диапазон, малочувствительны к изменениям температуры и колебаниям потока подвижной фазы.

В качестве источников излучения применяют ртутные лампы низкого давления (254 нм), среднего давления (280 нм) или светофильтры.

Наиболее простым и доступным является **УФ-спектрометрический (спектрофотометрический)** детектор, детектирование обычно проводят при длине волны 254 нм. В этой области спектра имеют высокое поглощение многие органические вещества.

С целью получения сильнопоглощающих веществ в УФ-свете проводят дериватизацию с применением N-сукцинимидил-п-нитрофенилацетата, фенилгидразина, 3,5-динитробензоилхлорида и др. Дериватизация проводится как до разделения, так и после разделения (перед поступлением в детектор).

Применение **диодной матрицы** позволяет с большой скоростью без остановки потока подвижной фазы измерять поглощение света в широком диапазоне длин волн. Пучок света после прохождения через исследуемый раствор разлагается на дифракционной решетке. Измерение интенсивности светового потока производится с помощью единичных умножителей, собранных в решетку. Современные хроматографы оснащены матрицами, содержащими до 500 диодов, позволяющих измерять оптическую плотность в области 180–800 нм.

Работа **инфракрасного детектора (ИКД)** основана на поглощении света в инфракрасной области спектра. ИКД применяется для идентификации органических веществ. В качестве растворителей используют четыреххлористый углерод, хлороформ и сероуглерод.

Рефрактометрический детектор (РМД) позволяет непрерывно измерять разность показателей преломления сравнительной ПФ и ПФ с анализируемым компонентом. Основными недостатками этого детектора являются высокая чувствительность к изменению температуры и изменению скорости потока подвижной фазы, а также нечувствительность к веществам, имеющим одинаковый с растворителем показатель преломления. РМД удобен в работе, неdestructивен и имеет хорошую воспроизводимость результатов.

Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален концентрации этого вещества.

Основным преимуществом **флуориметрического** детектора (ФМД) является его высокая чувствительность по сравнению с детекторами поглощения. Чувствительность флуориметрического детектора

приблизительно в 100 раз выше, чем УФ-спектрометрического. Принцип действия ФМД основан на измерении флуоресцентного излучения. Применяется для количественного определения аминокислот, витаминов, стероидов и других флуоресцирующих соединений. Применение монохроматического лазера и гибких оптических световодов вместо ртутной лампы повышает чувствительность ФМД.

В таблице 3 («Приложение») приводятся спектральные характеристики флуоресцирующих лекарственных веществ.

Получение флуоресцирующих производных с помощью химических реакций позволяет значительно повысить селективность определения органических соединений. Для получения флуоресцирующих соединений применяют дансилхлорид, 4-бром-метил-7-метоксикумарин и флуорескамин. Предел детектирования для сильнофлуоресцирующих веществ достигает 10^{-9} г/мл. Широкие возможности появляются у лазериндуцируемого флуоресцентного детектора.

Сведения о соединениях, обнаруживаемых флуориметрическим детектором после их химической модификации, приводятся в таблице («Приложения»).

Электрохимические детекторы. Высокая чувствительность и селективность электрохимических детекторов (ЭХД) позволяет применять их при анализе биологически активных соединений, а также при исследовании загрязнений окружающей среды. Электрохимический способ детектирования основан на электрохимических свойствах соединений подвижной фазы. С применением ЭХД имеется возможность регулировать селективность при смене режимов работы детекторов, замены или модифицирования детекторов. Влияние температуры на работу ЭХД незначительно.

В электрохимических (вольтамперометрический, полярографический и некоторые типы кулонометрических) детекторах измеряется ток как функция времени при постоянном напряжении на электродах.

Вольтамперометрический детектор (ВАД) применяется при анализе как неорганических, так и органических веществ. Селективность детектора определяет определенный потенциал окисления или восстановления. Электроактивными соединениями являются ароматические соединения, а также соединения с кратными связями и др.

В детекторе имеется два электрода (рабочий и сравнительный). Потенциал рабочего электрода устанавливается по отношению к потенциалу сравнительного (каломельный, хлорсеребряный) электрода. Для изготовления электродов используют платину, золото, серебро, графит, ртуть и др.

Работа **полярографического детектора (ПГД)** основана на измерении силы электрического тока между поляризуемым и неполяри-

зубым электродами. Разработаны методики определения стероидов, нитроанилинов, нитрофенолов, нитроалканов с применением ПГД.

В **кулонометрических детекторах** анализируемые вещества электризуются полностью, рабочие электроды имеют большую поверхность.

Детектирование соединений, имеющих высокий окислительно-восстановительный потенциал, проводятся с применением двух электродов, расположенных последовательно.

Некоторыми недостатками ЭХД являются необходимость работы со ртутью и уменьшение чувствительности в связи с изменением характеристик электродов с течением времени.

12.2.1.7. Распределительная жидкостная хроматография

Жидкость-жидкостная (распределительная жидкостная) хроматография применяется более широко по сравнению с методами, основанными на адсорбции, ионном обмене и эксклюзии. Этим методом обычно определяют незаряженные полярные соединения (фармацевтический, биохимический, клинический, промышленный анализы). Распределительная жидкостная хроматография (РЖХ) осуществляется в трех вариантах: колоночном, на бумаге и в тонком слое сорбента.

Разделение веществ в распределительной жидкостной хроматографии основано на различии коэффициентов распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями. Одна жидкость является подвижной фазой, вторая жидкость (неподвижная фаза) находится на твердом носителе.

Разделение смеси веществ зависит как от селективности применяемых фаз, так и от эффективности колонки. Эффективность колонки связана с вязкостью и коэффициентом диффузии применяемых жидкостей. В качестве подвижных фаз применяют маловязкие растворители, которые несколько сокращают продолжительность анализа.

В распределительной жидкостной хроматографии используются различные системы. Если подвижной фазой служат неполярные растворители (изооктан, бензол и др.), а полярный растворитель (вода, спирт) зафиксирован на твердом носителе (силикагель, оксид алюминия, диатомит) – то это нормально-фазовая распределительная жидкостная хроматография. В обращенно-фазовой хроматографии на носителе находится неполярный растворитель, а в качестве подвижной фазы используют полярные растворители (спирт, вода, буферные растворы и др).

Неподвижные фазы. В качестве неподвижных фаз применяются жидкости, иммобилизированные на носителе, или химически закрепленные фазы. Жидкие фазы, нанесенные на твердый носитель, быстро

смываются подвижной жидкой фазой, особенно в ВЭЖХ. Поэтому жидкие фазы химически прививают к носителю.

Постоянство состава фаз достигается двумя способами. В первом способе подвижную фазу насыщают неподвижной, например, встряхивают в течение 24 часов подвижную фазу с избытком неподвижной при температурных условиях работы хроматографической колонки. Во втором методе проводят химическое закрепление неподвижной фазы на твердом носителе. Современная промышленность выпускает силанизированные носители с закрепленной на их поверхности жидкой фазой.

Связь иммобилизированной жидкости с носителем непрочная, она осуществляется за счет физической адсорбции. Поэтому носитель предварительно насыщают жидкостью из подвижной фазы. Химически закрепленные фазы практически более важны. Они применяются как в нормально-фазовой, так и в обращенно-фазовой хроматографии.

Носители. К носителям неподвижной фазы предъявляются определенные требования: они должны иметь достаточно развитую поверхность, быть химически инертным, не адсорбировать анализируемые вещества, прочно удерживать неподвижную жидкую фазу, не растворяться в применяемых растворителях.

В качестве носителей применяются силикагель, оксид алюминия или полимерные сорбенты. Поверхность силикагеля состоит из силанольных (гидроксильных) групп. Для гидрофобизации поверхности силикагеля проводят обработку алкилхлоросиланами. Длинные алкильные группы (C_8 -*n*-октил, C_{18} -*n*-октадецил) располагаются параллельно друг другу и перпендикулярно поверхности частиц. Силикагели с привитыми алкилсилильными группами от C_2 до C_{22} используются в обращенно-фазовой хроматографии.

Силанизирование является оптимальным, если поверхность носителя покрыта силанольными группами не более, чем на 50%. Силанольные фазы устойчивы в определенных условиях (рН 2–8; полярные подвижные фазы, содержащие воду, метанол, ацетонитрил). При повышении рН выше 8 силанольные фазы разрушаются в результате гидролиза.

В нормально-фазовой хроматографии химически привитые фазы также используются. В качестве функциональных групп применяются диол-, циано-, amino-, диметиламино-, диамино-группы.

К гидрофильным носителям, которые прочно удерживают воду, служащую неподвижной жидкой фазой, относятся силикагель, целлюлоза и др. Основной недостаток гидрофильных носителей связан с тем, что процесс распределения вещества зависит от состава и кислотности водной фазы.

В качестве гидрофобных носителей применяют различные полимеры: фторопласты, ацетилцеллюлоза и др. Гидрофобным носителем может быть любой полимер, не растворимый в воде и не набухающий в органических растворителях. Как и в газовой хроматографии, в распределительной жидкостной хроматографии широко применяются поверхностно-пористые носители.

Подвижные фазы. Выбор подвижной фазы зависит от полярности неподвижной фазы и полярности разделяемых компонентов. Неподвижная фаза должна, как правило, иметь полярность, близкую к полярности разделяемых компонентов. При близких полярностях подвижной и неподвижной фаз получаются малые времена удерживания. Сильное различие полярности подвижной и неподвижной фаз приводит к слишком большим временам удерживания. Значения коэффициента емкости должны быть от 2 до 5. В обращенно-фазовой хроматографии оптимальными являются смеси метанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана. Другие спирты, кроме метанола, в ОФХ используют значительно реже, так как высокая вязкость водно-спиртовых элюентов приводит к высокому рабочему давлению и ухудшению эффективности разделения в связи с затрудненной диффузией в подвижной фазе. Основной недостаток тетрагидрофурана – его нестабильность при хранении (в результате его окисления образуются гидропероксиды, уменьшающие диапазон пропускания УФ-света и вступающие в реакции окисления привитой фазы и сорбата). Ацетонитрил имеет определенные преимущества перед метанолом, так как лучше растворяет органические пробы, водно-ацетонитрильные смеси менее вязки, чем водно-метанольные. К тому же ацетонитрил не относится к группе особо опасных ядов, подобных метанолу.

В обращенно-фазовой хроматографии полярные соединения элюируются первыми. Чем более полярная подвижная фаза, тем сильнее удерживаются неполярные соединения.

В нормально-фазовой хроматографии используют смеси диэтилового эфира, дихлорметана, хлороформа. Полярные соединения элюируются последними, так как полярность неподвижной фазы больше полярности подвижной фазы.

Для оценки полярности растворителей Снайдер предложил индекс полярности (P'). Индекс полярности увеличивается от неполярных алканов до наиболее полярного растворителя (вода) – см. таблицу «Свойства растворителей» в «Приложении».

Полярность смеси растворителей рассчитывается с использованием индексов полярности индивидуальных растворителей.

Общая формула для расчета полярности смеси растворителей имеет вид:

$$P'_{\text{смесь}} = \sum P_i \Phi_i \quad (12.9)$$

где Φ_i – объемная доля растворителя

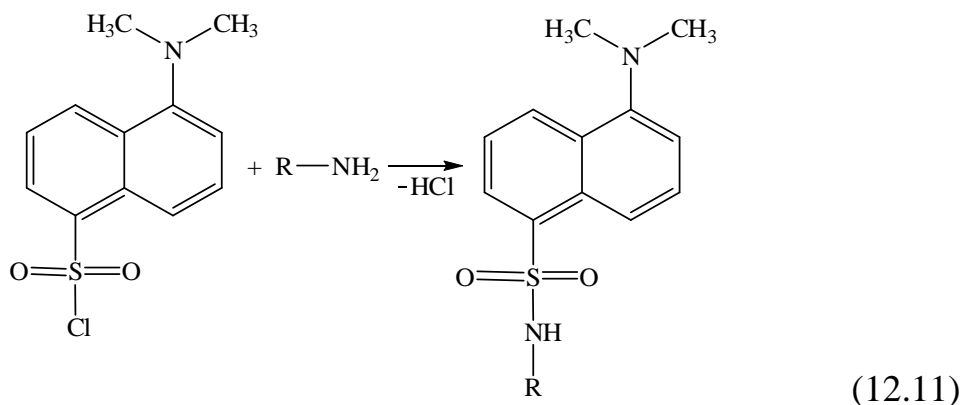
Например, расчет полярности водно-метанольной смеси (70/30) проводится так:

$$P'_{\text{мет/вода}} = 0,3P'_{\text{мет}} + 0,7P'_{\text{вода}} = 1,53 + 7,14 = 8,67 \quad (12.10)$$

При работе со смешанными подвижными фазами, состоящими из нескольких растворителей, необходимо иметь данные об их взаимной растворимости. Растворимость и смешиваемость – это разные термины. Смешиваемыми называют два компонента, которые могут быть смешаны друг с другом в любой пропорции и при этом не формируют две отдельные фазы. Если при смешивании компоненты образуют межфазную границу, то это несмешиваемые компоненты. Растворимость компонента А – это способность его образовывать до определенной концентрации истинные растворы в растворителе В. Насыщенные растворы могут быть и разбавленными (AgCl в воде и др.), так как растворимость различных веществ изменяется в широких пределах. Взаимную растворимость двух веществ определяют взаимодействия между молекулами растворенного вещества и растворителя. Вещество А будет растворяться в растворителе В только в том случае, если силы взаимодействия между молекулами А и В превосходят межмолекулярные силы притяжения между молекулами А...А и В...В.

В таблице (см. «Приложения») представлена миксотропная серия (миксотропный ряд) растворителей. Растворители расположены в порядке уменьшения их гидрофильности.

Одним из способов изменения свойств определяемых соединений является их дериватизация. При этом может быть изменена полярность, повышены чувствительность детектирования и селективность определения. Например, при дериватизации аминогруппы аминокислоты или пептидного остатка (R-NH₂) с использованием дансилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид) получается флуоресцирующее соединение:



Распределительная жидкостная хроматография успешно применяется в тех случаях, когда разделяемые компоненты смеси претерпевают каталитические изменения на активных сорбентах. Жидкая подвижная фаза подавляет активность сорбента. РЖХ чаще применяется при разделении средне- и сильнополярных соединений.

На рис. 12.1 представлена хроматограмма смеси, содержащей производные ксантина (кофеин, теобромин и теofilлин). Видно, что хроматографический метод позволяет проводить как обнаружение, так и количественное определение близких по химической природе веществ.

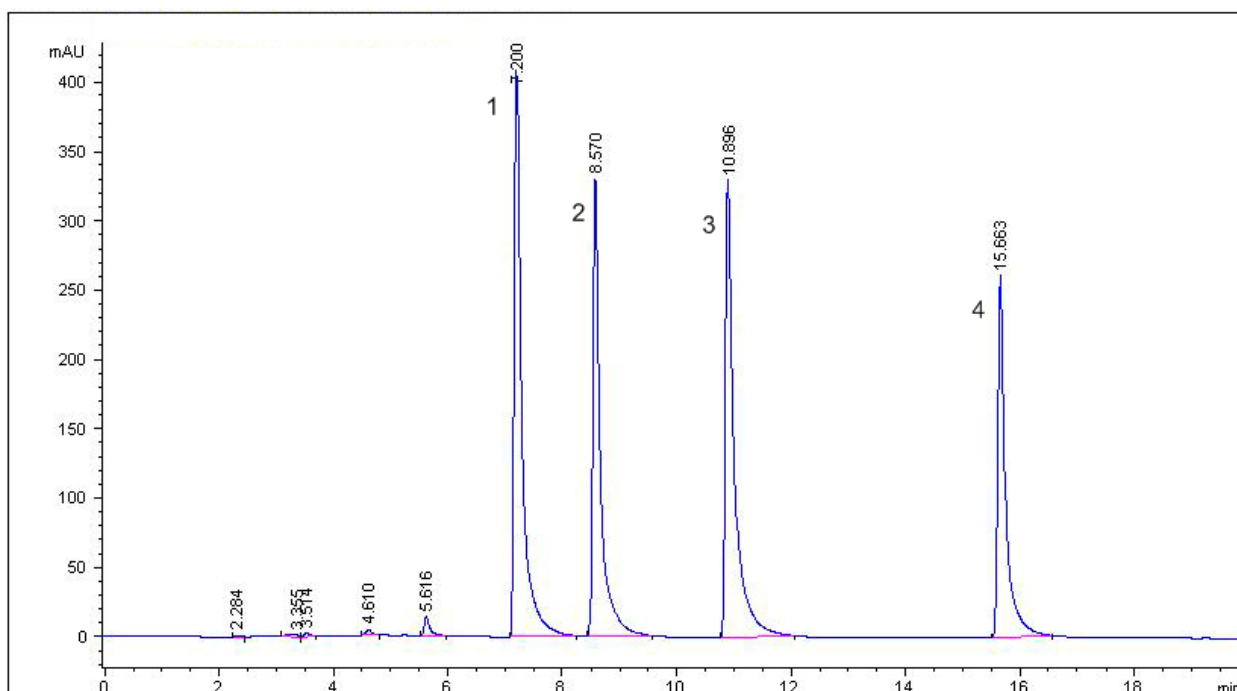


Рис. 12.1. Хроматограмма смеси теобромина (1), теofilлина (2) и кофеина (3); внутренний стандарт – пентоксифиллин (4); ПФ – (вода – ацетонитрил, 5–30%, градиентный режим); НФ – Zorbax Eclipse SB-C 18.

12.2.2. Планарная хроматография

В планарной хроматографии процессы разделения веществ осуществляются в плоском слое сорбента. Планарная или плоскостная хроматография относится к жидкостной хроматографии, так как подвижной фазой является жидкость. Основные методы плоскостной хроматографии:

- тонкослойная хроматография;
- хроматография на бумаге.

Бумажная и тонкослойная хроматографии простые и сходные по технике выполнения экспрессные методы, не требующие дорогостоящего оборудования.

Доступность и относительная дешевизна используемых реактивов и оборудования в сочетании с высокой чувствительностью позволяет широко использовать методы планарной хроматографии для решения различных аналитических задач.

Хроматографическое разделение компонентов смеси в плоскостной хроматографии обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы в соответствии с коэффициентами распределения определяемых компонентов. Движение подвижной фазы может осуществляться за счет капиллярных, гравитационных или электромигратационных сил.

Методы планарной хроматографии – это не только методы, в которых движение подвижной фазы происходит под действием капиллярных сил (бумажная, тонкослойная и высокоэффективная тонкослойная хроматография), но и методы, в которых приложены различные внешние силы (ТСХ под давлением, круговая ТСХ под давлением, ТСХ под действием центробежной силы – ротационная ТСХ).

Наиболее широко из методов планарной хроматографии в настоящее время применяются методы ТСХ и высокоэффективная ТСХ (ВЭТСХ).

На рис. 12.2 представлена классификация методов планарной хроматографии. Различают две группы методов в зависимости от того, под действием каких сил происходит движение элюента: капиллярные силы и внешние силы.

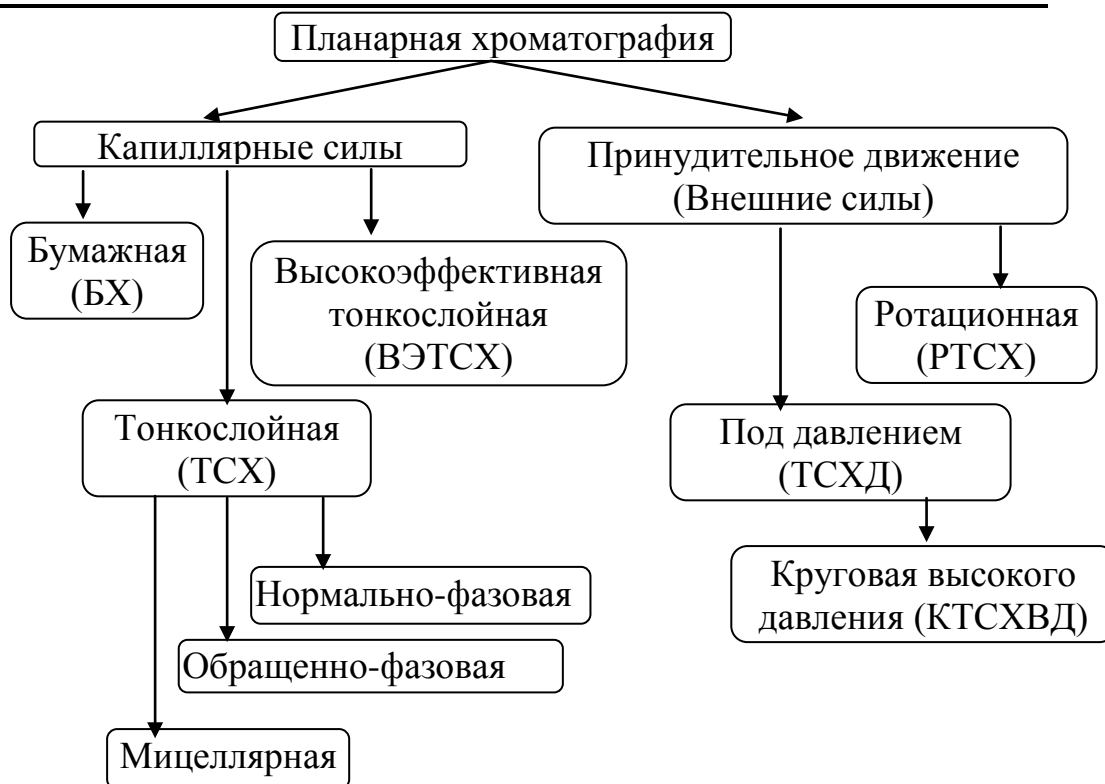


Рис. 12.2. Классификация методов планарной хроматографии

12.2.2.1. Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) был предложен в 1938 году (Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер), но широкое практическое применение нашел позже. Значительный вклад в развитие ТСХ внесли Ю. Кирхнер и Э. Шталь. Э. Шталь разработал оборудование, показал применимость ТСХ и в 1956 году написал первое практическое руководство по использованию ТСХ.

ТСХ используют как для обнаружения, так и для количественного определения органических и неорганических веществ в сложных объектах. Анализ методом ТСХ состоит из нескольких стадий: подготовка пробы; подготовка пластины; подготовка хроматографической камеры; нанесение пробы; хроматографическое разделение компонентов пробы; удаление элюента с пластины; детектирование; идентификация; количественное определение.

В методе ТСХ могут быть реализованы различные варианты хроматографирования: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, мицеллярный и хиральный. Высокоэффективная ТСХ отличается более высокой чувствительностью, эффективностью и скоростью. В методе ВЭТСХ толщина слоя носителя составляет около 100 мкм, размер частиц носителя – 5 мкм и менее. Время разделения составляет около 10 минут, а число теоретических тарелок может достигать 4000.

12.2.2.2. Механизмы разделения и выбор элюента

Разделение веществ методом ТСХ протекает по смешанным механизмам, так как ТСХ является разновидностью жидкостной хроматографии. Распределительная хроматография может сопровождаться адсорбционной и наоборот. В основе адсорбционной ТСХ лежит конкурентное взаимодействие полярных групп определяемого вещества и молекул растворителя с активными центрами адсорбента. Для элюирования неполярных веществ применяют неполярные элюенты, так как в этом случае неполярные вещества элюируются раньше, чем полярные. Увеличение концентрации полярного компонента увеличивает подвижность (R_f).

Подбор элюентов обычно проводится с учетом литературных данных. Изменяя состав элюентов, можно регулировать R_f с учетом типа пластин. Принцип элюотропных рядов дает лишь ориентировочную информацию, так как элюирующая способность растворителя определяется суммой всех сил его взаимодействия с веществом.

В нормальной распределительной ТСХ используют подвижные неполярные фазы и неподвижные полярные фазы (вода, уравновешенная с органическим растворителем). Между этими фазами распределяются хроматографируемые вещества, которые должны быть растворимы в неподвижной фазе. С увеличением полярности вещества наблюдается увеличение удерживания, а с увеличением полярности элюента удерживание уменьшается.

Распределительная ТСХ осуществляется как на обычных адсорбентах (силикагель, кизельгур, целлюлоза), так и на сорбентах, импрегнированных полярными (ДМСО, ДМФА, этиленгликоль) и гидрофобными соединениями (парафиновое, силиконовое масла, ундекан, тетрадекан). В качестве сорбентов могут использоваться гидрофильные сорбенты с химически связанными фазами (диол-, циан-, амино-фазы) и гидрофобные сорбенты с химически связанными фазами (C_2 -, C_8 -, C_{18} - фазы).

В обращенно-фазовой ТСХ в качестве элюентов используют в основном смеси полярных растворителей: спирты, ацетон, ацетонитрил, диоксан, смешанные с водой в разных соотношениях. Наиболее часто используют смеси метанол–вода и ацетонитрил–вода.

Обращенно-фазовая ТСХ используется для разделения как полярных, так и неполярных веществ.

В ион-парной ТСХ в элюент добавляют гидрофобные соли (противоионы). При разделении смеси кислот в элюент добавляют небольшие количества слабых кислот (например, уксусная кислота), при этом значение рН элюента должно быть меньше значения рН разделяемых кислот.

В таблице 12.6 даны примеры применения различных подвижных фаз в обращенно-фазовой ТСХ.

Таблица 12.6

Подвижные фазы в обращенно-фазовой ТСХ

Тип пластины	Вещества	Подвижные фазы
Диол-	Гликозиды наперстянки	Этилацетат – 25% аммиак (100:1)
Нитрил-	Прогестероны	Петролейный бензин – ацетон (8:2)
Амино-	Алкалоиды спорыньи	Хлороформ – метанол (100:4)
RP-2	Пиридазиновые производные	Метанол – вода (7:3), pH 4
RP-8	Афлатоксин М в молоке	Метанол – вода (20:1)
RP-18	Алкалоиды ароматические кислоты Пенициллины	Метанол – 0,5М NaCl (65:35) Ацетонитрил – 0,5М NaCl (2:8) Метанол – 0,1М K ₂ HPO ₄ (55:45), pH 8.8

12.2.2.3. Сорбенты

В качестве неподвижных фаз используются сорбенты, применяемые в колоночной жидкостной хроматографии. Толщина слоя сорбента составляет 200–500 мкм, а размеры частиц – 20 мкм и более. Число теоретических тарелок может достигать 2000 (при длине пути 12 см), время разделения – около 25 мин. Метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) позволяет производить разделение быстрее (около 10 мин) и более полно. Размер зерен составляет 5 мкм и менее, а толщина слоя сорбента – около 100 мкм. Число теоретических тарелок достигает 4000 при длине пути 3 см.

Тонкослойная хроматография выполняется в разных вариантах. Слой сорбента может быть незакрепленным и закрепленным. В первом случае пластина устанавливается под углом не более 15–20°. Во втором случае сорбент смешивается с каким-либо связующим веществом и распределяется тонким ровным слоем на поверхности пластинки. Такая пластинка может устанавливаться в камере в любом положении.

В настоящее время в ТСХ используются в основном готовые пластины, выпускаемые различными фирмами. Для приготовления пластин в качестве адсорбентов применяют силикагель и модифицированный силикагель, оксид алюминия, целлюлозу и модифицированную целлюлозу, ионообменные смолы и другие материалы. Адсорбенты могут содержать люминесцентный индикатор.

Пластины для ТСХ состоят из подложки, слоя сорбента и связующего элемента. Подложку готовят из стекла, алюминиевой фольги, полимерной пленки. Основные связующие вещества – крахмал, гипс, силикаты щелочных металлов и органические полимеры.

Наиболее универсальным и распространенным адсорбентом в нормально-фазовой ТСХ является силикагель. В таблице 12.7 представлены основные характеристики силикагелей для ТСХ.

Таблица 12.7
Основные характеристики силикагелей для ТСХ

Фирма	Диаметр пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверхность, м ² /г	Фракционный состав, мкм	Толщина слоя, мкм	Связующие вещества
«Мерк», Германия, TLC Si 60	6	0,82	550	2-20	250	Органический полимер
«Ватман», США, LK5 НРК	8	0,70	300	5-10	200	Органический полимер
«Машерей» и «Нагел», Германия, SILC 25	6	0,75	500	5-25	250	Гипс
«Кавалнер», Чехия, Силуфол	6	0,8	500	5-40	100	Крахмал
«Реахром», Армения, Реахром	6	0,8	300	10-20	100	Силиказоль
ПКБ Пластмаш, Краснодар, Sorbfil, АТСХ	120 - 150	0,8	350	5-20	130	Силиказоль

Характеристики пластин с модифицированными силикагелями приведены в таблице 12.8.

Таблица 12.8
Основные характеристики модифицированных силикагелей для ТСХ

Фирма, страна	Обозначение	Модифицирующая функциональная группа	Диаметр частиц, мкм
«Мерк», Германия	TLC RP-2	C-2	11-13
	TLC RP-18	C-18	11-13
	НР TLC RP-2	C-2	5-7

Глава 12. Методы определения лекарственных и наркотических веществ

«Машерей» и «Нагел», Германия	SILC 18-100	C-18	5-10
	SILC18-50	C-18	5-10
«Ватман», США	K C-2	C-2	10-14
	K C-8	C-8	10-14
	K C-18	C-18	10-14
	K CS 5	дифенилметил	10-14

Пластины, приготовленные с использованием силиказоля в качестве связующего вещества, отличаются химической стойкостью и высокой механической прочностью. Такие пластины можно использовать многократно после обработки хромовой смесью и водой. В качестве детектирующих реагентов можно применять концентрированные кислоты. Особый интерес представляют пластины с силиказолевым связующим для модификации химическими и физическими методами.

Широкое применение в биохимии, клинической и фармацевтической химии находят двухфазные пластины, покрытые двумя сорбентами. В первой зоне (преадсорбционный слой) происходит очистка и концентрирование пробы, во второй зоне – разделение компонентов смеси. В качестве сорбентов первой зоны могут быть адсорбционно-неактивный сорбент (диатомит или силикагель с диаметром пор 500 нм) или силикагель, модифицированный фазой RP-18. Вторая часть пластины покрыта обычным силикагелем. Применение таких пластин позволяет повысить эффективность разделения, а также экономит время.

Для улучшения разделения и последующего селективного детектирования проводят модификацию пластин с помощью химических реакций или импрегнирования их соответствующими реагентами. Наиболее простой способ силанизирования пластин – погружение их в растворы диметилдихлорсилана или гексаметилдисилазана и др.

Импрегнирование пластин производится погружением их в растворы реагентов (борная кислота, нитрат серебра, пикриновая кислота, соли цинка, кадмия и др.). Гидрофильность или гидрофобность пластин достигается импрегнированием их соответствующими растворителями, например, формамидом и полиэтиленгликолем – для гидрофильных фаз, а силиконовыми маслами и жидкими парафинами – для гидрофобных неподвижных фаз.

Иногда перед нанесением проб применяют активацию пластин – нагревание в термостате при 110–120 °С в течение 15–20 мин для удаления влаги. После активации пластины закрывают стеклянной пластиной.

12.2.2.4. Техника выполнения ТСХ

В тонкослойной хроматографии сорбент находится в виде тонкого слоя на стеклянной, металлической или пластмассовой пластине. Небольшой объем (0,5–5 мкл) пробы жидкости, содержащей анализируемые вещества, наносят с помощью капилляра, микрокапилляра или микрошприца на линию старта. В качественном анализе диаметр образующегося пятна не должен превышать 5 мм, а в количественном анализе диаметр пятна должен быть меньше. Пластины с нанесенным раствором подсушивают для удаления растворителя. Линия старта обычно находится на 1–2 см от края пластины. Пластины помещают в закрытую хроматографическую камеру, в которой находится растворитель (подвижная фаза). Вследствие действия капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и переносит компоненты разделяемой смеси с различной скоростью. После хроматографического разделения смеси (слой растворителя находится на 1–2 см ниже верхнего края пластины) пластину вынимают, подсушивают для удаления растворителя и проявляют.

Нанесение пробы анализируемого вещества на слой сорбента возможно двумя способами: нанесение в виде точки и в виде полосы (используется в основном в препаративной хроматографии).

Для получения четких хроматограмм и при количественном определении следует обращать внимание на объем наносимой пробы. При малых объемах пробы определяемое вещество может быть не замечено при проявлении. При больших объемах пробы наблюдается значительное размывание и перекрывание пятен. Поэтому предварительно на пластину наносят ряд проб разной величины, хроматографируют и после проявления выбирают оптимальное количество пробы.

На рис. 12.3 представлена схема тонкослойной хроматограммы.

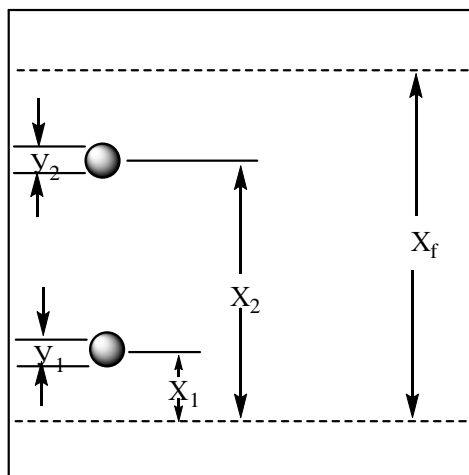


Рис. 12.3. Схема тонкослойной хроматограммы: X_1 и X_2 – расстояние, пройденное зоной вещества до центра зоны; Y_1 и Y_2 – расстояние от нижней до верхней границы пятна (ширина пятна); X_f – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

На рисунке 12.4 показана зависимость величины R_f пятна от количества нанесенного вещества. При больших количествах нанесенного вещества наблюдаются заниженные значения R_f .

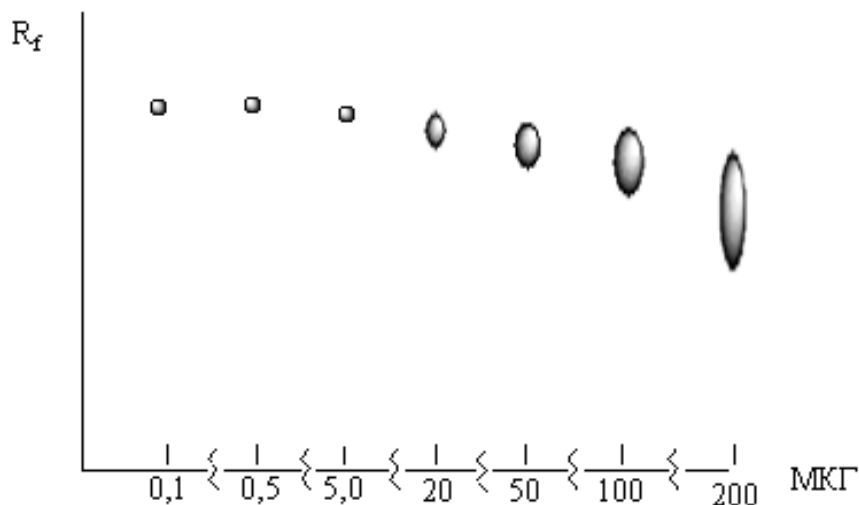


Рис. 12.4. Зависимость значения R_f и формы пятна от количества нанесенного вещества (на примере глицина).

Для растворения пробы применяют растворитель, в котором полностью должны растворяться все компоненты пробы. Растворитель должен быстро удаляться (испаряться) с пластины и хорошо смачивать слой сорбента. После нанесения пробы пластины нагревают или подсушивают феном для испарения растворителя.

12.2.2.5. Хроматографические характеристики

Основной характеристикой хроматографического поведения веществ в ТСХ является подвижность или коэффициент подвижности (удерживания) (R_f): отношение расстояния (X_n), пройденного зоной вещества от стартовой линии до центра зоны, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (X_f) от стартовой линии до границы фронта растворителя. Значения R_f находятся в пределах от 0 до 1, так как X_n не может быть больше X_f .

Ф. Гейс указывает на 26 факторов, влияющих на качество разделения в ТСХ: сорбент, растворитель, предварительное насыщение системой растворителей («кондиционирование»), диаметр частиц сорбента, размер пятна, относительная влажность, неравномерность качества слоя, скорость поступления растворителя, температура, закрепитель слоя, толщина слоя, наличие примесей в растворителе, рН и др. Величина рН может влиять на хроматографирование веществ, которые диссоциируют в воде. Значение R_f для таких веществ зависит не только от коэффициента распределения, но и от констант ионизации. Зависимость R_f от констант ионизации используют в том случае, если у разделяемых веществ близкие значения коэффициентов распределения. Такие соединения разделяют, используя буферные растворы.

Для идентификации разделенных веществ методом ТСХ на практике обычно используют относительные значения $R_{f(отн)}$:

$$R_{f(отн)} = R_f^x / R_f^{ст} \quad (12.12)$$

где R_f^x и $R_f^{ст}$ – подвижности анализируемого и стандартного веществ.

Зависимость между величиной R_f и коэффициентом распределения выражается уравнением:

$$D = (V_m / V_s) (1 / R_f - 1) \quad (12.13)$$

где V_m и V_s – объемы подвижной и неподвижной фаз.

Число теоретических тарелок и величину N рассчитывают по формулам:

$$N = 16 (X/Y)^2 \quad (12.14)$$

$$H = L/N = (L/16) \cdot (Y/X)^2 \quad (12.15)$$

В этих формулах «X» соответствует расстоянию удерживания, а «Y» – ширине пика.

Критерий разделения (разрешение) определяется по формуле:

$$R_s = 2\Delta X_{2,1}/(Y_1+Y_2) \quad (12.16)$$

Для определения селективности (фактора или коэффициента разделения) применяют формулу:

$$A = D_2/D_1 = (1/R_{f2}-1)/(1/R_{f1}-1) = t'_{R2}/t'_{R1} = V'_{R2}/V'_{R1} = k'_2/k'_1 \quad (12.17)$$

Коэффициент (фактор) емкости (k') выражается следующим образом:

$$k' = t_s/t_m = D(V_s/V_m) = (1-R_f)/R_f \quad (12.18)$$

где t_s и t_m – время нахождения вещества в неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазах; V_s и V_m – объемы неподвижной и подвижной фаз.

В тонкослойной хроматографии скорость потока подвижной фазы не постоянна и зависит от многих факторов (размер зерен сорбента, вязкость растворителя и др.).

Состав многокомпонентной подвижной фазы по мере ее продвижения по сорбенту непрерывно изменяется, что приводит к плохой воспроизводимости величин R_f .

12.2.2.6. Типы элюирования

В тонкослойной хроматографии в отличие от колоночной жидкостной хроматографии возможно три типа элюирования: линейное, круговое и антикруговое. Вариант линейной хроматографии был рассмотрен ранее.

Термины «круговая», «антикруговая», «центробежная», «центростремительная» предложены разными авторами. Схематически связь между этими терминами можно изобразить так:

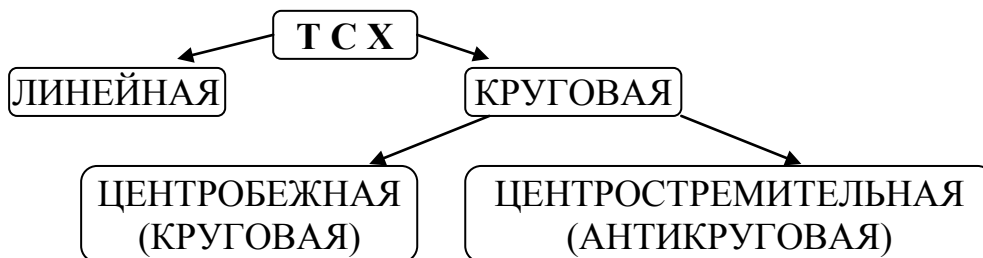


Схема 12.1. Типы элюирования

В круговой ТСХ проба и растворитель подается в центр пластины. После хроматографирования наблюдаются концентрические кольца (рис. 12.5).

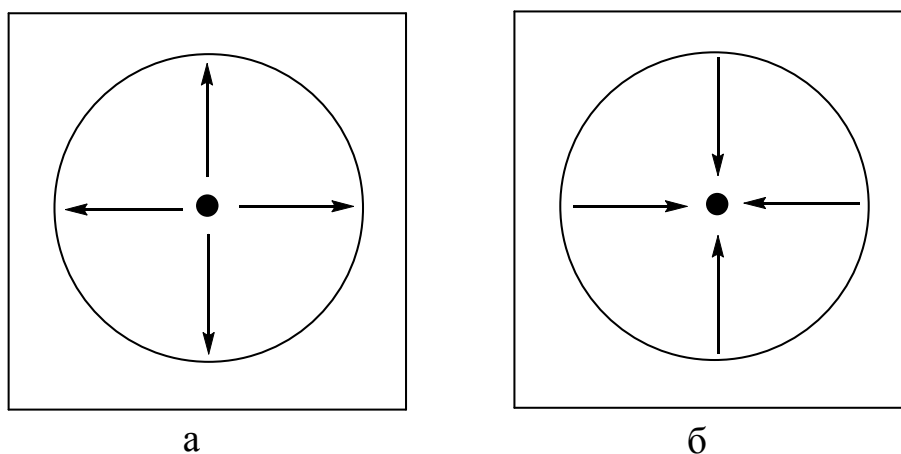


Рис. 12.5. Типы элюирования в ТСХ
а – круговое; б – антикруговое.

Близкой по технике выполнения является радиальная хроматография: пробы наносят по окружности на некотором расстоянии от центра пластины, элюент подается в центр пластины. После хроматографического разделения получают дугообразные полосы.

В антикруговой ТСХ пробы наносят по окружности по периферии пластины, а элюент подают в направлении к центру пластины. Основные преимущества антикруговой ТСХ: наиболее быстрый метод ТСХ, можно анализировать сразу много проб.

Наиболее простой способ выполнения круговой ТСХ достигается с использованием чашки Петри, а антикруговой ТСХ – с использованием двух чашек Петри.

На рисунке 12.6 представлены хроматограммы, полученные методами круговой и радиальной хроматографии.

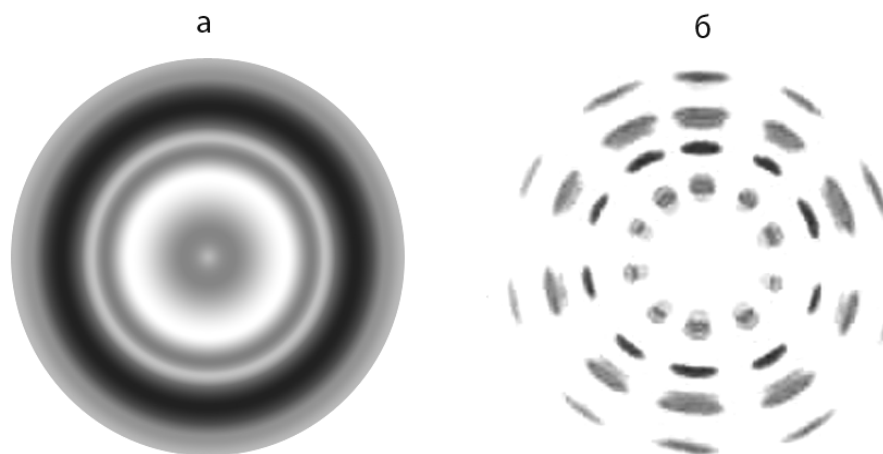


Рис. 12.6. Хроматограммы, полученные методами круговой (а) и радиальной (б) хроматографии.

Между значениями R_f в линейном варианте разделения и значениями R_f в круговой («центробежной») ТСХ имеется зависимость:

$$(R_f)_{\text{лин}} = (R_f)_{\text{цб}}^2 \quad \text{или} \quad (R_f)_{\text{цб}} = \sqrt{(R_f)_{\text{лин}}} \quad (12.19)$$

Значительное увеличение пиковой емкости в ТСХ достигается с использованием проточной, двумерной, многократной и других видов ТСХ.

Проточная ТСХ (ПТСХ). Элюент непрерывно поднимается по слою сорбента. Верхний конец пластины находится вне камеры, происходит непрерывное испарение растворителя по мере поступления его вверх. Если камера открыта (испарительный вариант ПТСХ), то растворитель испаряется по всей поверхности слоя (рис. 12.7). ПТСХ применяется для разделения веществ с близкими или малыми значениями R_f .

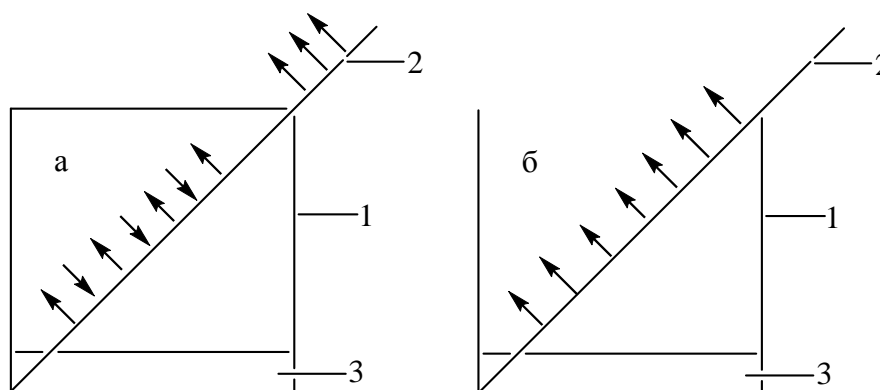


Рис.12.7. Проточная ТСХ: а – закрытая камера; б – открытая камера; 1 – камера; 2 – пластина; 3 – элюент.

Двумерная ТСХ (ДТСХ). Пробу наносят в левый угол пластины и хроматографируют сначала в одном растворителе или смеси растворителей, высушивают пластину, а затем пластину поворачивают на 90° и хроматографируют в другом элюенте. Перед хроматографированием во втором направлении можно изменять свойства сорбента (пропитка различными реагентами). В некоторых случаях после первого хроматографирования с помощью химических реакций (окисление, восстановление и др.) изменяют свойства разделенных компонентов смеси.

Предложены разные варианты ДТСХ. При использовании двухфазных пластин (с прямой и обратной фазами) разделение компонентов смеси может происходить по разным механизмам в разных направлениях элюирования.

Многократная ТСХ (МТСХ). Сущность этого метода ТСХ заключается в многократном повторении хроматографического разделения смеси в одном или двух направлениях, в одном или разных элюентах с одинаковым или разным расстоянием элюирования.

Проведение МТСХ на пластинах для ВЭТСХ позволяет оптимизировать разделение сложных смесей, так как дает возможность уменьшить длину пробега и время в каждом цикле. При многократной ТСХ достигается высокая эффективность разделения, эквивалентная $100 \cdot 10^3$ теоретических тарелок.

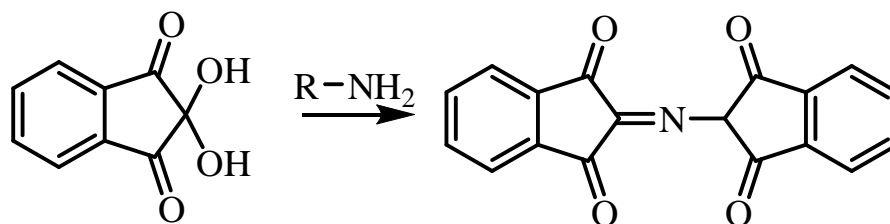
12.2.2.7. Способы детектирования

Предложены разные способы детектирования для идентификации определяемых компонентов разделяемой смеси.

1. Исследование флуоресцентных свойств разделяемых веществ. Это один из наиболее чувствительных методов детектирования. Усилить флуоресценцию веществ можно разными способами, например, наносят на пластину жидкий азот и освещают УФ-светом. Предложены реагенты для перевода нефлуоресцирующих веществ в флуоресцирующие соединения.

2. Использование флуоресцентных индикаторов, которые наносят на сорбент. В этом случае при облучении пластины УФ- светом на светящемся фоне пластины наблюдаются темные пятна определяемых веществ.

3. Применение групповых или селективных реагентов. Например, нингидрин используют как реагент на NH_2 -группы, а хлорид железа (III) – на фенолы.



Нингидрин

Синий продукт реакции

(12.20)

Предложены разные способы пред- и пост-derivатизации исследуемых веществ. Введение хромофоров или флуорофоров повышает чувствительность анализа. Пред-хроматографическая derivатизация может повысить селективность разделения компонентов смеси, увеличить стабильность, понизить адсорбционную активность, улучшить растворимость и другие свойства разделяемых веществ.

Измерение локального диффузного отражения света в УФ- и видимой области проводится с помощью денситометра или сканера.

12.2.2.8. Количественное определение

Количественное определение разделенных веществ в методе ТСХ возможно непосредственно на слое сорбента или анализируемое вещество извлекают из слоя сорбента и полученный раствор анализируют с применением других методов.

Полуколичественное определение вещества можно осуществить по размеру пятна. Более точные результаты количественного определения веществ непосредственно на хроматограммах могут быть получены методами, которые делят на две подгруппы: измерение размера пятна (площади зоны или ее длины) и инструментальные (сканирование пластины после ТСХ). К сканирующим методам относят оптические методы, ядерно-физические, электрохимические, ферментативные и др.

В оптических сканирующих методах измеряют поглощение, отражение, флуоресценцию, гашение флуоресценции. Измерение интенсивности флуоресценции веществ в слое сорбента является наиболее эффективным (высокая чувствительность и селективность) методом количественного анализа. Для этого метода характерен широкий интервал линейной зависимости «количество вещества – интенсивность флуоресценции», который не зависит от формы зоны. Derivatизация веществ до и после ТСХ с превращением их в флуоресцирующие производные расширяет возможности флуоресцентного метода.

Для оптического детектирования в ТСХ многие фирмы выпускают специальное оборудование. Например, универсальная сканирующая установка фирмы «Оптон» («Цейс» - Германия, США), сканирующие устройства фирмы «Шимадзу» (Япония). Сканеры фирмы «Камаг»

(Швейцария) позволяют измерять поглощение, флуоресценцию, гашение флуоресценции при круговом и антикруговом методах ТСХ. Оптико-механическое объединение (Санкт-Петербург) выпускает прибор для количественной ТСХ, который измеряет интенсивность поглощения или отражения монохроматического света, интенсивность флуоресценции или гашение флуоресценции. Диапазон длин волн соответствует 240–700 нм, предел детектирования поглощающих веществ – 10^{-8} г, флуоресцирующих – 10^{-10} г.

Хотя электрохимические методы отличаются высокой селективностью и быстротой, но широкого применения в ТСХ пока не нашли.

В ядерно-физических методах (ЯФМ) в качестве меток используют тритий и применяют эти методы для определения радиоактивно меченых соединений. Различают автордиографические, ионизационные и сцинтилляционные ядерно-физические методы. Для ЯФМ характерны высокая чувствительность, селективность и воспроизводимость.

Возможна количественная оценка веществ в ТСХ с помощью детекторов для газовой хроматографии: после перевода анализируемого вещества в газовую фазу проводят количественное определение с применением катарометра (ПВД, ДЭЗ и др.). Этот метод оптимален для веществ средней летучести.

12.2.3. Хроматографический скрининг лекарственных и наркотических веществ

Появление новых высокоэффективных лекарственных средств сопровождается ростом случайных и преднамеренных интоксикаций лекарственными средствами. Для диагностики интоксикаций как при острых отравлениях, так и при судебно-химических исследованиях при общем ненаправленном анализе в настоящее время применяются системы аналитического скрининга токсических веществ. Аналитические скрининги лекарственных веществ основаны на применении спектрометрических, хроматографических и иммунологических методов.

Применение иммунологических скрининговых систем ограничивается недостаточной специфичностью и использованием дорогостоящих реагентов для проведения реакций.

Из спектрометрических методов наибольший практический интерес для идентификации лекарственных соединений имеет УФ-спектрометрия. Основные недостатки УФ-спектрометрии – недостаточные чувствительность и специфичность, влияние соэкстрактивных веществ, значительная продолжительность.

Более широкое применение в анализе лекарственных соединений имеют хроматографические методы (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ/МС). ВЭЖХ и масс-спектрометрия в сочетании с газо-жидкостной хроматографией

применяются в основном в тех случаях, когда нужно подтвердить результаты, полученные методами ТСХ и ГЖХ.

12.2.3.1. ТСХ-скрининг лекарственных и наркотических веществ

Скрининг лекарственных и наркотических веществ с использованием ТСХ широко используется как в химико-токсикологическом анализе, так и при судебно-химическом исследовании. Он позволяет за минимальное время с достаточно высокой чувствительностью выявить из большого круга лекарственных веществ одно или несколько веществ, а затем целенаправленно составить схему химико-токсикологического анализа.

Качественной характеристикой определяемого вещества является величина R_f . Величина R_f зависит от техники эксперимента, активности и природы сорбента, толщины слоя сорбента, качества и толщины слоя сорбента, температуры, качества и природы растворителя, детектирования и др. Отношение величины R_f определяемого вещества к величине R_f стандарта (метчика) обозначают R_{st} . Воспроизводимые значения R_f и R_{st} получаются при соблюдении всех методических указаний.

Пробы наносят мерным капилляром, микрошприцом или обычным капилляром на линию старта на расстоянии не менее 1 см от нижнего края пластинки. Диаметр пятна не должен превышать 2–3 мм. Пластины с нанесенной пробой помещают в хроматографическую камеру, при этом слой подвижной фазы должен быть ниже линии старта на 0,5–1 см. Расстояние между соседними пробами на стартовой линии должно быть не менее 1 см.

В методе ТСХ в качестве сорбента используют различные материалы (оксид алюминия, силикагель, целлюлоза, сефадекс и др.), нанесенные на металлическую, стеклянную или пластиковую подложку. Например, хроматографические пластины «Силуфол» – это закрепленный слой силикагеля на алюминиевой фольге, а пластины «Сорбфил» – закрепленный слой силикагеля на полимерной подложке. Для закрепления сорбента применяются агар-агар, гипс, крахмал и другие связующие материалы. Иногда к сорбентам прибавляют флуоресцентный индикатор, что позволяет использовать УФ-свет при проявлении (свечение в УФ-свете или гашение флуоресценции индикатора).

В качестве хроматографической камеры используют стандартные камеры или стеклянные емкости любой формы, имеющие герметические крышки. В хроматографическую камеру помещают органические растворители или их смеси (подвижная фаза) и насыщают камеру парами растворителя в течение 30 мин. В качестве метчиков (свидетелей) используют субстанции анализируемых («подозреваемых») веществ.

Следует иметь в виду, что в случае использования в качестве метчиков лекарственных веществ, извлеченных из таблеток и других лекарственных форм, наблюдается неполное соответствие R_f метчика и определяемого вещества. Обнаружение (детектирование) определяемых веществ на хроматограмме проводят в УФ-свете и после обработки хроматографических пластин специальными реагентами. Пятна, обнаруженные на хроматограмме, копируют и измеряют расстояние от центра пятна до стартовой линии, рассчитывают R_f .

При анализе биологических объектов обязательно проведение холостого и контрольного хроматографического разделения, чтобы выявить влияние фона.

Система ТСХ-скрининга предусматривает поэтапное исследование токсикологически важных соединений: на первом этапе проводится скрининг в общих системах растворителей и, при положительном результате, исследование элюатов в частной системе растворителей.

Использование общих систем растворителей позволяет разделить определяемые вещества на определенные группы, локализованные в хроматографические зоны. Выбор частных систем растворителей основан на высокой эффективности разделения исследуемых веществ, входящих в ту или иную хроматографическую зону.

Обнаружение веществ на хроматограмме проводится с использованием реагентов, избирательно реагирующих с лекарственными веществами.

Метод ТСХ-скрининга имеет отрицательное судебно-химическое значение. При положительном результате проводят подтверждающее исследование, включающее: химические реакции, ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, фотометрию и УФ-спектрофотометрию, флуориметрию, фармакологические пробы.

При выполнении общего (ненаправленного) анализа на вещества, изолируемые полярными растворителями, ТСХ-скрининг в общих и частных системах растворителей проводится отдельно для веществ, экстрагируемых из кислого раствора и веществ, экстрагируемых из щелочного растворов.

Рассмотрим систему ТСХ-скрининга лекарственных веществ, разработанную Б. Н. Изотовым и Г. М. Родионовой (Московская медицинская академия).

Исследование веществ кислотного и слабоосновного характера в общих системах растворителей

Условия анализа:

1. Подвижная фаза – ацетон-хлороформ = 1: 9.

Неподвижная фаза – закрепленный слой силикагеля КСК на стеклянных пластинах 9*12 см (в отдельных случаях «Силуфол»).

Высота подъема фронта растворителя 10 см.

Время насыщения камеры 15–20 мин.

Схема разметки пластинки

А	Б	В	Г	
				Ш
				П
				І

Пластинка условно делится на 4 горизонтальные зоны по анализируемым соединениям (А, Б, В, Г) и 3 вертикальные зоны по значениям R_f отдельных групп соединений.

Зона А – наносим растворы метчиков.

Зона Б – 1/25 эфирного экстракта из кислой среды (для качественного анализа).

Зона В – стандарт (циклобарбитал) для расчета значений R_{st} .

Зона Г – 1/10 эфирного экстракта из кислой среды (используется после элюирования в частных системах).

После хроматографирования исследуемые соединения распределяются следующим образом:

І зона – антипирин, кофеин ($R_f = 0-0,25$).

ІІ зона – фенобарбитал, барбитал, нитразепам, барбамил, этаминал-натрий, циклобарбитал, бутобарбитал ($R_f = 0,30-0,40$).

ІІІ зона – диазепам ($R_f = 0,41-0,64$).

Обнаружение соединений на хроматограмме проводится путем последовательной обработки слоя сорбента зон А, Б, В, (при закрытой зоне Г) следующими реактивами:

– 5% раствор HgSO_4 и 0,1% раствор ДФК в CHCl_3 - обнаруживаются производные барбитуровой кислоты (красно-фиолетовые пятна), пластину нагревают (горячий фен) – пятна обесцвечиваются.

– 10% FeCl_3 – производные пиразолона: антипирин – красно-оранжевое окрашивание.

– реактив Драгендорфа по Мунье и 10% раствор H_2SO_4 (для повышения чувствительности): антипирин – оранжевое, кофеин – оранжево-коричневое, нитразепам, диазепам – оранжево-желтое.

Рассчитывают R_{st} .

Слой сорбента из зоны Г, расположенный параллельно окрашенному пятну в зоне Б, снимают и экстрагируют метанолом (зона I) или ацетоном (зона II,III). Экстракты хроматографируют в частных системах растворителей.

ТСХ-скрининг веществ кислотного и слабоосновного характера в частных системах растворителей

Схема нанесения соединений на хроматографическую пластину при исследовании в частных системах:

А	Б	В

Зона А и Б – метчики (вещества, входящие в исследуемую зону).

Один метчик – циклобарбитал.

Зона В – элюат из зоны Г, полученный при анализе в общих системах.

Соединения I зоны:

Подвижная фаза – ацетон-циклогексан = 5:1.

Сорбент – незакрепленный слой основного оксида алюминия на стеклянной пластинке 9*12.

Реагенты: 10% раствор FeCl_3 на антипирин; реактив Драгендорфа на вещества, содержащие в структуре вторичный и третичный атом азота (производные пиразола, кофеин).

Соединения II зоны:

Подвижная фаза – хлороформ-н-бутанол-25% раствор аммиака = 70:40:5.

Сорбент – силикагель КСК, забуференный 0,1М раствором H_3BO_3 , закрепленный на стеклянной пластинке 9*12.

Реагенты: 0,1% раствор ДФК (дифенилкарбазон) и 5% раствор HgSO_4 – на барбитураты. Значения R_f для барбитуратов: барбитал (0,70-0,75), барбамил (0,85-0,92), бутобарбитал (0,78-0,85), фенобарбитал (0,49-0,55), этаминал натрия (0,94-0,96).

Обнаружение нитразепама – гидролиз на пластинке (6М HCl , 140 °С, 40 минут) с последующим образованием азокрасителя с β -нафтолом.

Соединения III зоны:

1. Подвижная фаза – этилацетат-бензол-этанол-25% раствор NH_3 = 95:15:5:2,5.

Сорбент – силикагель КСК, закрепленный на стеклянных пластинках 9*12.

Реактив Драгендорфа.

Рассчитывают R_{st} .

Исследование веществ основного характера в общих системах растворителей

Подвижная фаза – хлороформ-диоксан-ацетон-аммиак = 45:47,5:5:2,5

Неподвижная фаза: силикагель.

Схема разметки пластинки:

А	Б	В	Г	
				IV
				III
				II
				I

Пластина делится на 4 горизонтальных зоны (по наносимым зонам) и 4 вертикальных зоны по значениям R_f отдельных групп соединений.

Зона А – наносим метчики (атропин, кокаин).

Зона Б – 1/25 часть хлороформного экстракта из щелочной среды.

Зона В – стандарт (этаперазин) для расчета значений R_{st} .

Зона Г – 1/10 часть хлороформного экстракта из щелочной среды.

После хроматографирования вещества основного характера распределяются по вертикальным зонам следующим образом:

I зона – пахикарпин, морфин, атропин, эфедрин, стрихнин, хинин, кодеин, дионин ($R_f = 0,12-0,36$).

II зона – этаперазин, антипирин, кофеин ($R_f = 0,5-0,58$).

III зона – хлордиазепоксид, дипразин, новокаин, тиоридазин, аминазин, промедол, нитразепам ($R_f = 0,63-0,83$).

IV зона – левомепромазин, папаверин, диазепам, кокаин ($R_f = 0,87-0,98$).

Обнаружение соединений производится путем последовательной обработки слоя сорбента зон А, Б, В следующими реагентами:

10% раствор $FeCl_3$ – производные пиразола и фенотиазина;

конц. $HClO_4$ + 3-5% раствор $NaNO_2$ – усиление окраски фенотиазинов;

10% раствор H_2SO_4 + УФ-свет – хинин;

реактив Драгендорфа по Мунье и 10% раствор H_2SO_4 (для усиления окраски) – все соединения, содержащие третичный атом азота.

Слой сорбента из зоны Г, расположенный параллельно окрашенному пятну в зоне Б, снимают и экстрагируют смесью метанол-диэтиламин = 9:1 (для I зоны) и смесью метанол-25% раствор NH_3 = 9:1 (для II-IV зоны). Экстракты хроматографируют в частных системах.

ТСХ-скрининг веществ основного характера в частных системах растворителей

Нанесение на пластину проводится как и в случае исследования веществ кислотного характера.

Соединения I зоны (пахикарпин, морфин, атропин, эфедрин, стрихнин, кодеин, дионин).

1. Подвижная фаза – хлороформ-диэтиламин = 9:1.

2. Сорбент – силикагель КСК (закрепленный слой).

3. Реагенты:

реактив Драгендорфа по Мунье – проявляются вещества, содержащие третичный атом азота;

реактив Марки – производные фенантренизохинолина;

10% раствор H_2SO_4 + УФ-свет (хинин).

Соединения II зоны (этаперазин, антипирин, кофеин).

1. Подвижная фаза – ацетон-хлороформ = 1:5.

2. Сорбент – незакрепленный слой нейтрального оксида алюминия.

3. Реагенты:

конц. HClO_4 + 3-5% раствор NaNO_2 – этаперазин (розовая окраска);

10% раствор FeCl_3 – антипирин (оранжево-коричневая окраска).

Соединения III зоны (дипразин, новокаин, тиоридазин, аминазин, промедол, нитразепам).

1. Подвижная фаза – хлороформ-этанол = 20:1.

2. Сорбент – незакрепленный слой основного оксида алюминия.

3. Реагенты:

конц. HClO_4 + 3-5% раствор NaNO_2 – дипразин, аминазин (розовое окрашивание), тиоридазин (зеленое окрашивание);

реактив Марки – промедол (розовое окрашивание);

реакция азосочетания – новокаин;

гидролиз с последующим азосочетанием – хлозепид, нитразепам.

Соединения IV зоны (левомепромазин, папаверин, diaзепам, кокаин).

1. Подвижная фаза – циклогексан-ацетон = 5:1.

2. Сорбент – незакрепленный слой основного оксида алюминия.

3. Реагенты:

конц. HClO_4 +3-5% раствор NaNO_2 – левомепромазин (фиолетовое окрашивание);

реактив Марки – папаверин (розовое окрашивание);

реактив Драгендорфа – диазепам (желто-оранжевое окрашивание), кокаин (оранжево-коричневое окрашивание).

Предварительное исследование методом ТСХ-скрининга особенно эффективно при анализе секционного материала, не подвергшегося гнилоственному разложению, так как, в противном случае, при изолировании экстрагируется значительное количество эндогенных аминов, пептидов и других ВМС, затрудняющих проведение ТСХ-скрининга.

Известны и другие системы ТСХ-скрининга лекарственных веществ. Например, В. А. Карташов с сотрудниками разработал вариант ТСХ-скрининга более 80 азотистых органических оснований (АСОО). Исследованные вещества разделены на 6 хроматографических зон:

I зона – бензогексоний, прозерин, карбахолин, конииин, гоматропин, атропин, пахикарпин, тропацин, хингамин, стрихнин, платифиллин, бруцин, азафен, мажептил, метеразин, анабазин, морфин, хинидин, хинин, гидрокодон, этаперазин, карбидин, кодеин.

II зона – трифтазин, новокаинамид, галидор, пропазин, дионин, имизин, тиоридазин, амитриптилин, димедрол, аймалин, пилокарпин, аминазин, никотин, дипразин, промедол.

III зона – дикаин, неупелтил, хлорпротиксен, хлорацизин, физостигмин, скополамин, совкаин.

IV зона – новокаин, тизерпин, галоперидол, фторацизин, мебекар, изоптин, дротаверин, текодин, вератрин, динезин, центедрин, антипирин, триседил, аконитин, элениум, кокаин, апрофен, френолон, кордиамин.

V зона – финлепсин, курантил, оксазепам, папаверин, этмозин, протионамид, этионамид, дибазол, коразол, медазепам, феназепам, нитразепам, стугерон.

VI зона – седуксен, резерпин, фепранон, эфедрин, мидокалм.

Условия хроматографирования: неподвижная фаза – силикагель КСК;

подвижная фаза – ацетон. Для детектирования АСОО использовали модифицированный реагент Драгендорфа и флуоресценцию в УФ-свете.

12.2.3.2. Газохроматографический скрининг лекарственных соединений

Результаты исследования методом ГЖХ во многом зависят от объектов исследования и подготовки проб.

При исследовании тканей органов применяют кислотный или ферментативный гидролиз, что позволяет определять как нативные вещества, так и продукты гидролиза. Основные способы изолирования токсических веществ и их очистки – ЖЖЭ и ТФЭ.

ЖЖЭ проводится при различных значениях рН в зависимости от кислотно-основных свойств определяемых веществ. ЖЖЭ мало эффективна при малых количествах исследуемой пробы, особенно в случае исследования не свежих образцов.

Основной способ концентрирования – выпаривание экстракта с последующей обработкой растворителем или смесью растворителей. При этом температура не должна превышать 50 °С, так как при более высокой температуре возможна необратимая сорбция некоторых определяемых веществ поверхностью стекла.

Проведение дериватизации определяемых веществ позволяет ускорить разделение, улучшить форму хроматографических пиков, повысить чувствительность определения. Обычно дериватизация проводится при определении веществ, имеющих большую молекулярную массу и содержащих полярные функциональные группы, способные взаимодействовать с материалом колонки. Однако следует иметь в виду, что проведение дериватизации сказывается на воспроизводимости результатов анализа. Поэтому предпочтительно проводить прямой ГХ-анализ.

При проведении ГХ-разделения веществ учитывают основные факторы, влияющие на результаты на этапе подготовки пробы: температура, характер полярности поверхности стеклянной посуды и веществ в пробе, концентрация веществ и др.

Использование стеклянных насадочных колонок требует их предварительной подготовки. Ранее использованные колонки заполняют хромовой смесью и выдерживают 24 часа. Колонки промывают дистиллированной водой и органическими растворителями в такой последовательности: этанол, хлороформ, ацетон, эфир (по 100 мл растворителя на одну колонку). Затем колонки промывают концентрированной HCl (100 мл), дистиллированной водой до нейтральной реакции и метанолом. Колонки сушат в сушильном шкафу в течение 2 часов при 250–300 °С и продувают инертным газом. Колонки заполняют 10%-ным раствором диметилдихлорсилана в безводном толуоле и оставляют на 24 часа. Сливают раствор и сушат колонки в течение часа при 150 °С. Промывают 2–3 раза метанолом и сушат один час при 250 °С.

Применяя различные детекторы (катарометр, ПИД, ДЭЗ, масс-спектральный и др.), можно успешно проводить химико-токсикологические исследования с высокой чувствительностью и избирательностью.

Выбор неподвижных фаз осуществляется с учетом их полярности. С повышением полярности жидкой фазы увеличивается удерживание полярного вещества.

Из неполярных фаз наиболее широко применяется Апиезон L (углеводород) в химико-токсикологическом анализе спиртов, алкалоидов, барбитуратов. Апиезоны SE-30, OV-1, OV-101 (полимеры диметилсилана) используются в качестве неподвижных фаз в капиллярных колонках.

Из полярных фаз широко применяются Карбовакс-20М (полиэтиленгликоль с молярной массой 20000), OV-17 (фенилметилсилан), ХЕ-60 (цианоэтилсилан) и др.

Проведение ГХ-анализа при направленном химико-токсикологическом анализе основано на выборе оптимальных условий с помощью литературных данных.

Определение неизвестного токсического вещества (ненаправленный анализ) основано на скрининговых исследованиях с применением газовой хроматографии. Идентификация неизвестного вещества проводится путем сравнения времени удерживания или индексов удерживания неизвестного и известного веществ.

При исследовании лекарственных и наркотических веществ со средней и низкой летучестью оптимальными системами (по разделительной способности и воспроизводимости) являются неподвижные фазы SE-30 и OV-1.

Для проверки эффективности работы хроматографа применяют тестовую смесь, содержащую метанольные растворы барбитала, этаминала натрия, фенobarбитала, кодеина, морфина, хинина, стрихнина и других веществ в концентрации 100 мг/л. Тестовая смесь стабильна в течение 2 месяцев при 4 °С.

Условия хроматографического разделения: носитель - хромосорб G (80–100 меш), НЖФ – SE-30 или OV-1; температура 200–280 °С; пламенно-ионизационный детектор.

Индексы удерживания определяемых веществ получают из простой графической зависимости исправленного времени удерживания вещества от индекса удерживания исследуемого вещества. Предварительно строят линейную графическую зависимость чистого (исправленного) времени удерживания *n*-алканов от количества атомов углерода в его молекуле.

Использование индексов удерживания позволяет идентифицировать неизвестные вещества путем сравнения с коллекцией банка данных индексов удерживания известных веществ.

К основным правилам определения индексов удерживания относятся одинаковые условия определения индексов удерживания *n*-алканов и неизвестного вещества, а также совместное инжектирование образца и веществ сравнения. Однако, если на хроматограмме много

пиков, второе правило не выполняется, и тогда проводят отдельное хроматографирование образца и вещества сравнения.

Возможности газожидкостной хроматографии определяются выбором хроматографических колонок и детекторов. Рассмотрим газохроматографический скрининг лекарственных и наркотических веществ применительно к такому наиболее доступному объекту, как моча.

При выделении лекарственных веществ методом ЖЖЭ пробу (20 мл) делят на 2 части и к одной части пробы прибавляют 2М HCl до pH 2, проводится экстракция эфиром (дважды по 5 мл). Эфирные экстракты пропускают через безводный сульфат натрия. Объединенный экстракт упаривают в токе воздуха.

К водной фазе прибавляют 25% раствор аммиака до pH 11-12, экстракция проводится смесью хлороформ : *n*-бутанол = 9:1 (дважды по 5 мл). Экстракты пропускают через безводный сульфат натрия, объединенный экстракт упаривают. Полученные сухие остатки из кислой и щелочной среды растворяют в 50 мкл 5% раствора изоамилового спирта в нонане. При растворении сухих остатков в 50 мл 5%-ного раствора изоамилового спирта в нонане снижается фон эндогенных соединений мочи.

Прибавляют 2 мл концентрированной HCl ко второй части пробы, нагревают в течение 40 минут при 110 °С (глицериновая баня). Гидролизат охлаждают, фильтруют, создают pH 8,5–9,0 и проводят экстракцию смесью хлороформ – *n*-бутанол (9:1) в течение 5 минут (дважды по 5 мл).

Объединенные экстракты пропускают через безводный сульфат натрия, упаривают в токе азота и остаток растворяют аналогично. Этот экстракт наряду с веществами основного характера содержит вещества кислотного (барбитураты) и слабоосновного характера (производные ксантина, пиразола и др.)

Сорбционное выделение лекарственных и наркотических веществ из мочи возможно с применением полисорба-1. Сорбция проводится отдельно из кислого и щелочного растворов: к 50 мл мочи прибавляют 2М HCl до pH 2 и проводят сорбцию на полисорбе-1. Ко второй части (50 мл) пробы прибавляют раствор аммиака до pH 8,5–9,0 и аналогично проводят сорбционное выделение. Десорбцию веществ, выделенных из кислой среды, проводят этилацетатом (25–30 мл). Для десорбции веществ, выделенных из щелочной среды, применяют хлороформ – изопропанол (3:1).

Пробоподготовка с применением ЖЖЭ и ТФЭ позволяет применять ВЭЖХ и ГХ/МС в качестве подтверждающих методов. В экстракте из кислой среды обнаруживаются барбитураты, частично производные 1,4-бензодиазепина.

После газохроматографического разделения проводится идентификация хроматографических пиков по индексам удерживания. Расчет индексов удерживания при линейном программировании температуры колонки проводится по формуле:

$$I_x = 100y \frac{t'_{Rx} - t'_{Rz}}{t'_{R(z+y)} - t'_{Rz}} + 100z \quad (12.21)$$

где I_x – индекс удерживания определяемого вещества (x); t'_{Rx} – исправленное время удерживания определяемого вещества; t'_{Rz} – исправленное время удерживания углеводорода с (z) числом атомов углерода; $t'_{R(z+y)}$ – исправленное время удерживания углеводорода с (z+y) числом атомов углерода ($t'_{R(z+y)} > t'_{Rx} > t'_{Rz}$).

В качестве стандартов используют *n*-алканы, имеющие близкие времена удерживания и отличающиеся друг от друга на один или два атома углерода.

Времена удерживания определяемых веществ и стандартов определяют в одинаковых условиях.

В таблице 12.9 приведены индексы удерживания некоторых веществ, имеющих токсикологическое значение (3%-ный SE-30 на хромосорбе W-HR 80–100 меш).

Таблица 12.9

Индексы удерживания лекарственных и наркотических веществ

Вещество	Индекс удерживания	Вещество	Индекс удерживания
Барбитал	1490	Дипразин	2275
Бутобарбитал	1680	Скополамин	2316
Барбамил	1732	Оксазепам	2346
Этаминал	1743	Кодеин	2383
Гексобарбитал	1861	Дионин	2410
Фенобарбитал	1974	Диазепам	2455
Циклобарбитал	1980	Морфин	2450
Амфетамин	1176	Аминазин	2515
Метамфетамин	1220	Трифтазин	2665
Эфедрон	1360	Феназепам	2686
Эфедрин	1383	Нитразепам	2770
Кофеин	1816	Папаверин	2848
Димедрол	1856	Теofilлин	2170
Атропин	2173	Новокаин	2022

Кокаин	2175	Хинин	2809
Амитриптилин	2193	Стрихнин	3110
Имипрамин	2225		

Для некоторых веществ (морфин, кофеин, теофиллин, эфедрин, эфедрон, фенобарбитал и др.) характерна концентрационная зависимость индексов удерживания. Поэтому «окошко поиска» составляет ± 20 единиц индекса от среднего значения индексов удерживания.

В результате газохроматографического скрининга производится отсев отрицательных проб, а положительные пробы затем подтверждаются другими методами (ВЭЖХ, ГХ/МС).

12.2.4. Хромато-масс-спектрометрия

В анализе сложных объектов большое применение находит хромато-масс-спектрометрия, сочетающая такой способ разделения смесей, как хроматография, с одним из наиболее информативных методов определения структуры органических соединений — масс-спектрометрией.

АППАРАТУРА

В настоящее время хромато-масс-спектрометрия стала наиболее применяемым методом анализа органических соединений. Современные хромато-масс-спектрометрические системы включают весь богатый арсенал средств газовой и жидкостной хроматографий и масс-спектрометрии: хроматографические капиллярные колонки высокого разрешения; жидкостную хроматографию с обращенными фазами, с реагентами в виде ионных пар, с буферными растворами; масс-спектрометрию высокого разрешения; методы мягкой ионизации для анализа термически нестабильных и нелетучих веществ; масс-спектрометрию положительных и отрицательных ионов; масс-спектрометрию метастабильных ионов. Существенным элементом современной аппаратуры для хромато-масс-спектрометрии является интерфейс — специфический узел, обеспечивающий соединение и совместную работу различных хроматографических и масс-спектрометрических приборов. Хромато-масс-спектрометрия дает исследователю широкие возможности при анализе сложных многокомпонентных смесей, при определении примесей и проведении скрининговых анализов.

Любой хромато-масс-спектрометр включает три основные части: хроматограф (обычно газовый или жидкостный), масс-спектрометр и соединительное устройство — интерфейс.

12.2.4.1. Хроматографы

Хроматограф в хромато-масс-спектрометрической системе служит для разделения исследуемой смеси на отдельные компоненты, которые затем анализируют масс-спектрометром, выполняющим роль детектора. Разделение в хроматографии основано на многократном перераспределении молекул между подвижной и неподвижной фазами. Подвижная фаза может представлять собой газ (газовая хроматография) или жидкость (жидкостная хроматография).

Газовая хроматография (ГХ) – наиболее распространенный хроматографический метод благодаря высокой чувствительности и избирательности, экспрессности и возможности качественного и количественного анализов.

Капиллярные колонки используются во многих хромато-масс-спектрометрических системах. Дезактивация стеклянных капилляров путем силилирования или покрытия слоем BaCO_3 позволяет получать колонки с неполярной фазой с рабочей температурой до $350\text{ }^\circ\text{C}$. Капиллярные колонки из плавленого кварца обеспечивают высокую воспроизводимость, имеют инертную поверхность. В то же время они достаточно гибки, что дает им преимущество перед хрупкими стеклянными колонками.

Широкое применение нашли два типа капиллярных колонок: 1) классические колонки, в которых жидкая фаза покрывает внутренние стенки колонки в виде тонкой пленки (wall coated open tubular columns, WCOT); 2) капиллярные колонки, в которых разными способами обеспечивается увеличение внутренней поверхности без уменьшения газового объема, эти колонки обозначаются общим термином – porous layer open tubular columns (PLOT). Наилучшими являются колонки, внутренняя поверхность которых покрыта частицами пористого носителя размером порядка нескольких мкм с нанесенной на него жидкой фазой (support coated open tubular columns, SCOT).

В качестве газа-носителя в принципе можно использовать любой газ, но к газу-носителю часто предъявляют специальные требования: инертность, чистота, совместимость с используемым масс-спектрометром и сепаратором.

Использование в качестве хроматографического детектора масс-спектрометра ограничивает круг возможных неподвижных фаз по сравнению с другими видами детекторов. В этом случае неподвижные фазы должны обладать пониженной упругостью паров, более высокой термической стабильностью, пониженным содержанием летучих примесей. Наиболее применяемыми в ГХ-МС жидкими неподвижными фазами являются метилсиликоны, фенилметилсиликоны, фторсиликоны, цианосиликоны и др.

В **высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)** используют колонки сравнительно небольших размеров: длина 10–30 см, внутренний диаметр 2–4 мм, размер частиц адсорбента 2–10 мкм. Для создания достаточного потока жидкости через такие плотно упакованные колонки необходимо создавать высокое давление – (1–40 МПа). ВЭЖХ обеспечивает высокую разделительную способность – более 10000 теоретических тарелок, сравнительно короткое время анализа, измеряемое минутами, и высокую разрешающую способность.

В последнее время в ВЭЖХ находят все большее применение микроколонки или капиллярные колонки, которые могут обеспечить очень высокую эффективность разделения сложных смесей и сокращают расход подвижной фазы.

В ВЭЖХ могут применяться как полярные, так и неполярные подвижные фазы. Полярные подвижные фазы (чаще всего смесь метанола и ацетонитрила с водой) обычно используют в сочетании с неполярными или слабополярными неподвижными фазами. Неподвижной фазой в этом случае обычно служит SiO_2 с привитой фазой, например, при реакции с октадецилсиланами.

12.2.4.2. Масс-спектрометры

Масс-спектрометрия согласно определению лауреата Нобелевской премии по химии Д. Фенна – «...это искусство измерения атомов и молекул с целью определения их молекулярной массы. Суть данного метода заключается в превращении нейтральной молекулы в ионы...»

К основным этапам развития и достижениям в области масс-спектрометрии относятся: определение отношения массы электрона к заряду (1898 г., Дж.Д. Томсон), создание первого масс-спектрометра (1912 г., Дж.Д. Томсон), создание первого газового хромато-масс-спектрометра (1953-1959 гг.) и первого жидкостного хромато-масс-спектрометра (1974-1980 гг.), получение первого масс-спектра молекулы белка (инсулина)-1981 г. Крупным достижением за последние годы считается создание электростатической ионной ловушки (1999 г., А. Макаров). За разработку двух мягких методов десорбции и ионизации для масс-спектрального исследования биологически активных молекул в 2002 году Д. Фенн и К. Танака получили Нобелевскую премию по химии.

Основное отличие масс-спектрометрии (МС) от спектральных методов состоит в том, что МС детектирует сами частицы вещества, а оптические методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами. Измерение отношения массы фрагмента к его заряду производит прибор – масс-спектрометр. Анализируемые вещества в масс-спектрометре ионизируются с образованием ионов, которые распределяют-

ся в зависимости от отношений массы к заряду. Информацию об образующихся ионах в результате ионизации вещества представляет масс-спектр.

Масс-спектрометры имеют широкий динамический диапазон: 5–6 порядков для анализа веществ органической природы и 9–10 порядков для элементного анализа веществ.

Соотношение величины сигнала детектора и интенсивности систематических помех, равное 3:1, считается значимым и обозначается как сигнал/шум.

Молекулярный ион или его фрагмент, присутствующий в масс-спектре, обозначается как **характеристический ион**.

В масс-спектрометре имеются четыре основных узла: система ввода образцов, ионный источник, масс-анализатор и система детектирования ионов (рис. 12.8). Имеется также система создания и измерения вакуума.



Рис. 12.8. Схема масс-спектрометра.

Ввод образца осуществляют разными способами в зависимости от вида образцов и типа анализа. Образцы для масс-спектрального анализа могут быть газообразными, жидкими и твердыми, для них в современных приборах предусмотрены соответствующие системы ввода. Прямой ввод вещества в камеру ионизации осуществляется в том случае, если образец невозможно проанализировать хроматографическими методами. Наиболее распространенный способ ввода образцов в масс-спектрометр осуществляется с помощью газовой хроматографии.

Масс-спектрометр может иметь несколько систем ввода, которые действуют либо по очереди, либо одновременно, например, при вводе анализируемого образца и стандарта или анализируемого вещества и газа-реагента для химической ионизации. Существенным требованием к системам ввода является возможность их быстрой очистки от остатков или продуктов превращения предшествующего образца, а также химическая инертность.

Система для ввода жидких образцов представляет собой резервуар из нержавеющей стали, стекла или металла, покрытого эмалью для уменьшения возможности химического взаимодействия анализируемого вещества со стенками резервуара, нагреваемого до 250–300 °С.

Для ввода газохроматографических элюатов предназначены две отдельные системы: одна (для набивных колонок) обеспечивает удаление большей части газа-носителя с помощью специального молекулярного сепаратора, другая служит для непосредственного соединения с капиллярными колонками, из которых поток элюата целиком направляется в масс-спектрометр.

Источник ионизации предназначен для генерирования ионов из молекул анализируемых веществ и формирования ионного пучка для последующего анализа ионов по массам. Существуют разные методы ионизации: бомбардировка пучком электронов, ионов или нейтральных атомов, ионно-молекулярные реакции (протонирование, депротонирование, катионизация), ионизация в сильном неоднородном электрическом поле, в электрическом разряде, ионизация лазерным пучком, термоионная эмиссия и другие. При выходе из ионизатора частицы пробы находятся в основном в виде положительно заряженных ионов, которые затем ускоряют и разделяют.

В ионном источнике с **электронной ионизацией** нейтральные молекулы анализируемого вещества в газовой фазе бомбардируются пучком электронов определенной энергии, испускаемых раскаленным катодом и ускоряемых до заданной энергии. Молекулы теряют электроны и получают заряд. Положительные ионы, образующиеся из молекул при электронном ударе, вытягиваются из зоны ионизации и формируются в пучок, который ускоряется до энергий обычно 1–10 кэВ и направляется в масс-анализатор. Метод применяется при ионизации неполярных низкомолекулярных веществ.

При **химической ионизации** ионы образуются в результате ионно-молекулярных реакций между нейтральными молекулами образца и ионной плазмой газа-реагента (метан, бутан, аммиак) при давлении в ионном источнике до 130 Па и парциальном давлении образца до 1 Па. Ионы газа-реагента получают при бомбардировке электронами с энергией 100—500 эВ, затем ионы газа-реагента взаимодействуют с молекулами аналита с образованием как положительных, так и отрицательных ионов. Для образования отрицательных ионов в структуре анализируемого вещества должны быть заместители с высоким сродством к электрону (галогены, нитрофенильные группы и др.).

Сравнительно новым методом ионизации, который очень перспективен для ХМС, является **ионизация при атмосферном давлении (ИАД)**. В этом случае ионно-молекулярные реакции проходят в слабоионизированной плазме инертного газа (обычно азота или аргона) при атмосферном давлении вневакуумной системы масс-спектрометра. Ионизация этого газа осуществляется обычно β -излучением, испускаемым ^{63}Ni . Химическая ионизация при атмосферном давлении применяется при анализе как полярных, так и неполярных веществ (лекарственные

вещества, пестициды). Метод применим как в режиме положительных ионов (протонирование исследуемых веществ), так и в режиме отрицательных ионов.

Фотоионизация при атмосферном давлении – новый метод, который появился в XXI веке. Поток элюата из колонки попадает в ионизационную камеру и облучается УФ-светом. Мощность облучения должна превышать потенциал ионизации исследуемых веществ, но не должна влиять на растворители и воду.

Большое развитие получили методы ионизации нелетучих или термически нестабильных соединений. Это, главным образом, десорбционные методы, позволяющие осуществлять ионизацию непосредственно из твердой фазы.

При **полевой ионизации (ПИ) и полевой десорбции (ПД)** пробу ионизируют на эмиттере (вольфрамовая проволока, покрытая пиролитическим углеродом) под действием высокого напряжения. При этом способе ионизации образуются, главным образом, молекулярные ионы, а степень фрагментации невелика. Полевая десорбция является дальнейшим развитием метода полевой ионизации; в этом случае не требуется, чтобы ионизируемый образец находился в газообразном состоянии. Образец наносится на активированный эмиттер, помещенный в сильное неоднородное электрическое поле. Эмиттер медленно нагревается электрическим током.

Лазерная десорбционная ионизация имеет перед другими десорбционными методами ряд преимуществ: молекулярные и квазимолекулярные ионы с высокой вероятностью образуются даже из термически лабильных и нелетучих молекул; отрицательные ионы образуются примерно с такой же вероятностью, что и положительные; электрическая проводимость образца не оказывает влияния на эффективность ионизации; практически не требуется подготовка образца для качественного анализа; количество энергии, сообщаемой данному объему ионизируемого образца, можно легко контролировать, регулируя таким образом степень фрагментации. При лазерной десорбции образуются, главным образом, четноэлектронные квазимолекулярные ионы, в отличие от масс-спектрометрии вторичных ионов, когда наблюдаются, главным образом, молекулярные ионы M^+ .

Десорбционные методы ионизации наиболее часто применяются при исследовании веществ с молекулярными массами порядка 10000, при этом для ионизации используют УФ-лазер с длиной волны 337 нм.

Электрораспыление (электроспрей) как источник ионизации был предложен еще в 60-х годах XX века. Наиболее удачно этот метод сочетается с ВЭЖХ. При введении жидких проб в масс-спектрометр подвижная фаза подается в капилляр, который заканчивается иглой. Высокое напряжение порядка 6 кВ, подаваемое на иглу, способствует образованию аэрозоля, который движется к противоэлектроду, и при

этом теряется растворитель – образуются микрокапли, содержащие одну заряженную частицу. Качество получаемых результатов зависит от выбора растворителя для подвижной фазы: растворитель должен быть легколетучим, хорошо растворять анализируемые вещества и способен отдавать протон. Такими растворителями являются метанол и смеси воды с метанолом и ацетонитрилом.

Эффективность образования ионов анализируемого вещества значительно улучшается при уменьшении скорости потока подвижной фазы (метод наноэспрей).

Масс-анализатор. Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются и фокусируются, после чего ионный пучок поступает в анализатор, где ионы разделяются по величинам m/z , образуя масс-спектр. Характеристики анализатора очень важны для хромато-масс-спектрометра, ибо он определяет такие важные параметры, как диапазон измеряемых масс, разрешающая способность, скорость сканирования масс-спектров, точность определения и др. Современные приборы имеют разрешение в пределах от 500 до 500000. В зависимости от поставленной задачи определяется разрешение.

В хромато-масс-спектрометрических системах используются, главным образом, два типа анализаторов: анализаторы с секторным магнитным полем и квадрупольные масс-фильтры.

В магнитном секторном анализаторе ионы при помощи электродов и ускоряющего поля попадают в магнитный сектор анализатора, где происходит их фокусировка в соответствии с их массами. Для улучшения фокусировки ионов и получения более высокой разрешающей способности служат анализаторы с двойной фокусировкой. В этом случае к магнитному анализатору добавляется электростатический анализатор, обеспечивающий фокусировку ионов по энергиям. Он представляет собой секторный конденсатор с радиальным электрическим полем. Имеются два основных типа масс-спектрометров с двойной фокусировкой, отличающихся взаимным расположением магнитного и электростатического анализаторов. Масс-спектрометры с двойной фокусировкой позволяют достичь разрешения порядка 100 000 (рис. 12.9).

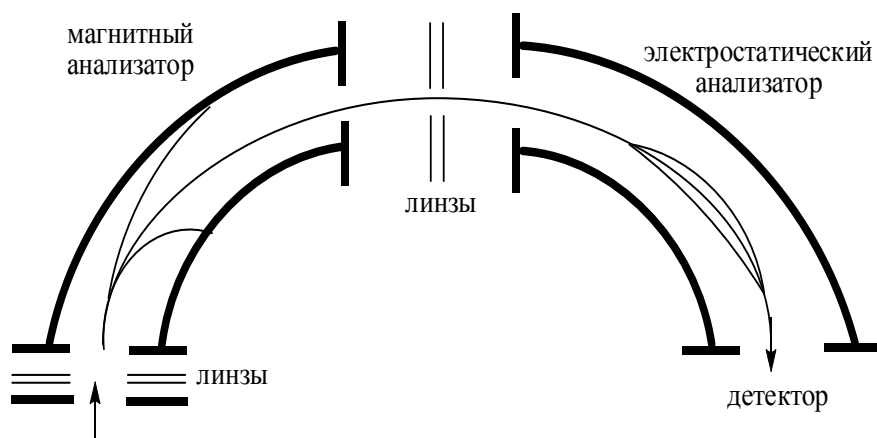


Рис. 12.9. Схема масс-анализатора с двойной фокусировкой.

Квадрупольные масс-анализаторы содержат четыре параллельных стержня, из них два противоположных стержня электрически соединены между собой. Два других стержня имеют противоположную по знаку компоненту постоянного тока. Через высокочастотное электрическое поле проходят только ионы с определенным отношением m/z (резонирующие ионы), которые затем детектируются. Такие анализаторы называют также «квадрупольными масс-фильтрами» (рис. 12.10). Квадрупольные анализаторы менее чувствительны, чем приборы с магнитным полем (с двойной фокусировкой).

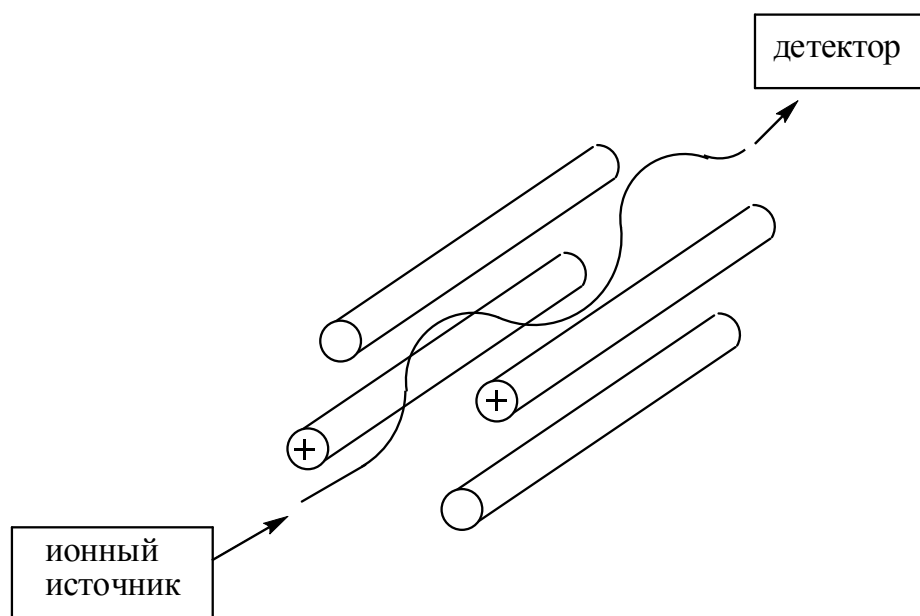


Рис. 12.10. Схема квадрупольного масс-анализатора.

Наряду с диапазоном масс и разрешающей способностью важной характеристикой масс-анализатора является чувствительность. В режиме селективного детектирования отдельных ионов квадрупольные и магнитные масс-спектрометры достигают предельной чувствительно-

сти в несколько пикограммов на 1 мкл образца, введенного в газовый хроматограф. При регистрации полного масс-спектра предел обнаружения составляет несколько сот пикограммов в зависимости от природы образца.

Для хромато-масс-спектрометрического анализа важна возможность цифрового управления, обеспечивающая высокую производительность и автоматизацию работы. В этом отношении квадрупольный масс-фильтр имеет значительные преимущества перед магнитным анализатором благодаря линейной шкале масс и низкому ускоряющему потенциалу (около 10 В по сравнению с несколькими киловольтами в магнитных масс-спектрометрах). Следует также отметить, что квадрупольный масс-фильтр очень удобен для регистрации отрицательных ионов, так как в анализаторе не происходит дискриминации ионов по их полярности.

Из других анализаторов следует отметить времяпролетный анализатор и электростатическую ионную ловушку. Принцип работы времяпролетного анализатора основан на том, что скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массам. Все ионы, попавшие в анализатор, доходят до детектирующей системы. В электростатической ионной ловушке через систему ионной оптики ионы попадают в линейную квадрупольную ловушку, частота осцилляций ионов в ловушке зависит от отношения массы к заряду. Этот анализатор совмещает лучшие качества анализатора по диапазону масс, чувствительности и разрешающей способности.

Методы детектирования ионов. Первыми детекторами ионов были фотопластинки. К основным современным детекторам относятся электронный умножитель, в котором происходит многократное усиление сигнала (до 10^6 раз) и сцинтилляционный счетчик (фотоумножитель). В фотоумножителе положительные ионы с энергией 1–10 кэВ выбивают из первого динода (электрод, обладающий высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии) вторичные электроны. Эти электроны ускоряются до энергии около 100 эВ и, ударяясь о поверхность следующего динода, выбивают большее количество электронов по сравнению с падающими на динод. Этот процесс повторяется 10–20 раз.

Диноды в умножителях либо расположены отдельно друг от друга, либо представляют собой непрерывные электроды типа «каналтрона». Умножители с отдельными динодами отличаются меньшим уровнем шумов и большим динамическим диапазоном по сравнению с каналтроном. Максимальное усиление умножителя составляет обычно около 10^6 . Большее усиление ухудшает линейность и уменьшает время жизни умножителя.

Все хромато-масс-спектрометрические системы, как правило, позволяют осуществить непрерывную регистрацию части ионного пучка с помощью специального электрода, называемого монитором пучка или монитором интегрального спектра, который непосредственно измеряет ионный ток. Этот сигнал служит для регистрации масс-хроматограммы, а так-

же для оценки условий работы и юстировки ионного источника и для фиксации входа в источник элюируемых хроматографических пиков, а в приборах с фоторегистрацией — для определения экспозиции. В современных приборах используются разные методы регистрации ионного пучка.

Проведение анализа. При проведении исследований с применением масс-спектрометра важным этапом является калибровка прибора с использованием веществ сравнения. Наиболее часто для калибровки применяют перфторкеросин, перфтортрибутиламин. В зависимости от используемых методов ионизации в качестве калибраторов применяют также иодид цезия, ацетат аммония, полипропиленгликоль, растворы миоглобина и низших пептидов в пропиленгликоле. Внешний стандарт для калибровки используется обычно для приборов с низким и средним разрешением. Для приборов высокого разрешения калибратор и аналит вводятся вместе в ионный источник.

Следующим этапом анализа является определение молекулярной массы, элементного состава и структуры вещества. Интерпретация пиков в масс-спектре – весьма сложный процесс. Выяснить структуру вещества позволяют библиотеки масс-спектров, полученных электронным ударом. Наиболее часто используемые библиотеки содержат от 2000 до 500000 масс-спектров, хотя количество известных соединений в настоящее время превышает 12000000. Значительно сложнее проводится интерпретация масс-спектров, полученных при мягкой ионизации и десорбционной химической ионизации, так как в этих условиях результаты масс-спектрометрии значительно зависят от экспериментальных условий.

12.2.4.3. Система газовый хроматограф-масс-спектрометр

Соединение хроматографа с масс-спектрометром представляет сложную проблему вследствие несовместимости их рабочих условий: хроматограф работает при атмосферном давлении или выше атмосферного, а масс-спектрометр – в глубоком вакууме. Хромато-масс-спектрометрия в современном варианте заключается в непосредственном соединении этих двух методов.

Наибольшее значение для нормальной работы комбинированной системы хроматограф-масс-спектрометр имеет скорость сканирования масс-спектров. Для получения представительного масс-спектра, а также информации о чистоте хроматографического пика необходимо регистрировать по крайней мере три спектра в процессе прохождения одного хроматографического пика. Если учесть, что время прохождения узких пиков в капиллярных колонках составляет считанные секунды, то скорость сканирования должна быть не менее 0,5–1 с/декада.

Хроматограф должен обеспечивать эффективное разделение, т. е. чтобы в масс-спектрометр вводились хорошо разделенные компоненты смесей. Это условие диктует выбор соответствующих колонок, например, для анализа очень сложных смесей нужны капиллярные колонки высокого разрешения. Возможно, необходимо предварительное фракционирование анализируемой смеси для ее упрощения или для отделения следовых компонентов от основных, мешающих их определению.

Неподвижная фаза должна обладать достаточной термической стабильностью, т. е. испарение и разложение, при которых могут выделяться летучие продукты, должны быть сведены к минимуму. Это необходимо для получения стабильной базовой линии и малоинтенсивного фонового масс-спектра. Последнее особенно важно при анализе следовых компонентов. Кроме того, испарение или разложение неподвижной фазы приводит к загрязнению ионного источника и масс-анализатора, к потере чувствительности и разрешающей способности масс-спектрометра.

В ГХ-МС большое значение имеет природа газа-носителя. Во-первых, он должен легко отделяться от компонентов смеси, обеспечивая возможность их обогащения (либо за счет большей скорости откачки газа-носителя из ионного источника масс-спектрометра, либо с помощью специальных сепараторов). Во-вторых, ионы, образующиеся из газа-носителя, не должны мешать анализу компонентов смеси. Поэтому при ЭУ ионизации в качестве газа-носителя в ГХ-МС обычно используют гелий, который откачивается быстрее, чем компоненты анализируемых смесей, и имеет высокий потенциал ионизации. При энергии электронов несколько ниже потенциала ионизации гелия молекулы анализируемых веществ ионизируются достаточно эффективно, а ионы гелия не создают помех при измерениях. В случае химической ионизации газ-носитель часто служит и газом-реагентом.

В настоящее время разработан целый ряд различных способов соединения ГХ и МС. Существует два основных типа соединительных устройств – интерфейсов: интерфейс с непосредственным соединением и интерфейс – молекулярный сепаратор.

Интерфейс – устройство, позволяющее ввести как можно больше элюата в масс-детектор или позволяющее провести обогащение определяемого вещества.

Непосредственное соединение ГХ и МС. Системы непосредственного соединения могут использоваться в тех случаях, когда скорость потока через колонку сравнима со скоростью откачки ионного источника (например, капиллярные колонки с минимальным потоком газа-носителя).

Интерфейс выполняет две основные функции: понижение давления от атмосферного на выходе ГХ-колонки до 10^{-2} – 10^{-3} Па в ионном источнике масс-спектрометра и удаление избытка газа-носителя. Если

при работе прибора не нужно обогащение, то соединение хроматографа и масс-спектрометра можно осуществить с помощью игольчатого вентиля или стеклянного капилляра. Размеры капилляра выбирают в соответствии с желаемой величиной потока. Например, в случае химической ионизации (ХИ) скорость потока газа-носителя CH_4 может быть до 15 мл/мин. Капилляр длиной 30–40 см и внутренним диаметром 0,012 см обеспечивает вязкостный поток желаемой величины. Для потока 1–2 мл/мин внутренний диаметр капиллярного ограничителя должен быть около 0,006 см.

Материалом для капилляра часто служит платина. Однако, существенным недостатком такого интерфейса является активность платиновой поверхности, которая может зависеть и от условий хроматографического разделения, в частности от вида жидкой фазы на капиллярной колонке.

Широко используется соединение с открытым разделительным устройством (рис. 12.11). В интерфейсе такого типа постоянный поток элюата из капиллярной колонки вводится в масс-спектрометр. Входной линией и ограничителем служит обычно платиновый капилляр, присоединенный к ионному источнику через отрезок тефлоновой трубки.

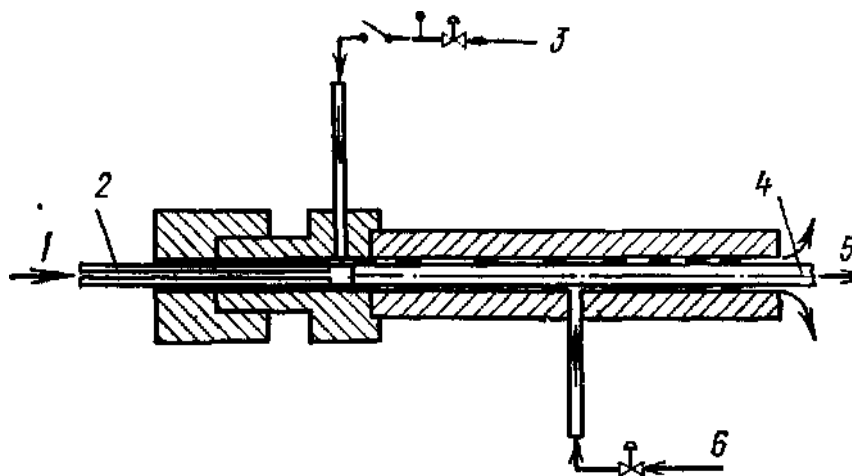


Рис. 12.11. Интерфейс с открытым делителем потока для ГХ-МС: 1 — поток из хроматографической колонки; 2 — остеклованная стальная трубка; 3 — газ для регулирования величины потока в масс-спектрометр (He); 4 — капилляр; 5 — поток в масс-спектрометр; 6 — газ для продувки (He).

Преимуществом такого устройства перед обычным интерфейсом с непосредственным соединением является то, что конец ГХ-колонки находится при атмосферном давлении и, таким образом, соединение с масс-спектрометром не влияет на ее рабочие параметры. При этом не нарушается высокая разделительная способность капиллярных колонок.

Основной недостаток интерфейса с открытым разделительным устройством — большая длина входной и ограничительной линий, что может приводить к потерям лабильных соединений, особенно в случае металлических капилляров. Это имеет большое значение при анализе микропримесей, особенно если используются силилированные или ацетилированные производные.

Применение обогатительных устройств (сепараторы). Созданы обогатительные системы, в которых значительная часть газа-носителя удаляется и достигается концентрирование образца перед вводом в масс-спектрометр.

Известно много разных типов молекулярных сепараторов: эффузионный сепаратор, струйный сепаратор и мембранный сепаратор.

В **эффузионном сепараторе** элюат из хроматографической колонки проходит через ограничитель давления в трубку со стенками из спекшейся стеклянной крошки со сверхтонкими порами (рис. 12.12). Эта трубка окружена вакуумной камерой, откачиваемой форвакуумным насосом. Для большего обогащения используется двухступенчатый сепаратор. Обогащенный поток входит в масс-спектрометр через другой капиллярный ограничитель.

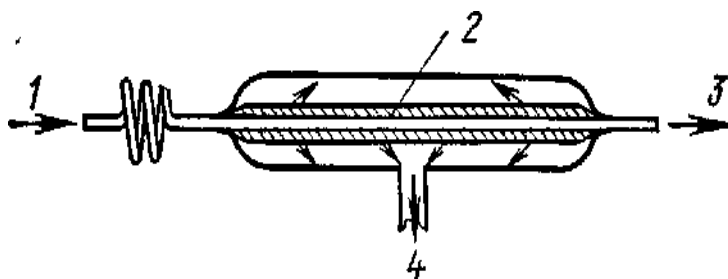


Рис. 12.12. Эффузионный молекулярный сепаратор (одноступенчатый): 1 — поток из газового хроматографа; 2 — пористая стеклянная трубка; 3 — поток в масс-спектрометр; 4 — откачка.

Недостатки эффузионных сепараторов: оптимизация наблюдается только в узком интервале скоростей потоков; возможность сорбции и разложения нестабильных веществ на пористой поверхности, более низкая эффективность, чем в других типах сепараторов. При работе не в оптимальных условиях эффективность сепаратора уменьшается.

Был разработан ряд модификаций эффузионного сепаратора, свободных от указанных недостатков и имеющих более компактную конструкцию. В частности, стеклянная пористая трубка заменялась в некоторых конструкциях на керамическую, серебряную или из нержавеющей стали. Поверхность металла силанизировали для придания ей инертных свойств.

Действие **струйного сепаратора** основано на различии скоростей диффузии разных газов в расширяющейся со сверхзвуковой скоростью газовой струе, что обеспечивает фракционирование газовой смеси. Элюат из колонки проходит через ограничитель и быстро расширяется в вакуумной камере. В свободно расширяющейся струе устанавливается градиент давления, направленный к середине струи. Скорость диффузии молекул в этой области зависит от их молекулярных масс и пропорциональна коэффициенту диффузии.

Струйные сепараторы обычно изготавливают из нержавеющей стали, но для анализа термически нестабильных соединений используются стеклянные сепараторы. Преимущество стекла как материала для струйного сепаратора – его химическая инертность, но при этом трудно обеспечить необходимую точность изготовления.

В **мембранном сепараторе** камера, в которую вводится поток из хроматографа, отделяется от вакуумной системы масс-спектрометра мембраной из силиконовой резины толщиной 0,025–0,040 мм. Газ-носитель и образец, проходящие над мембраной, диффундируют сквозь нее в масс-спектрометр. Проницаемость мембраны для органических веществ в 20–100 раз выше, чем для гелия и других неорганических газов. Обычно степень обогащения равна 10–20%, а эффективность составляет 30–90%. Мембранный сепаратор прост. Он может состоять из одной или двух ступеней. В одноступенчатом сепараторе давление на выходе обычно соответствует атмосферному, в двухступенчатом давление на выходе первой ступени обычно равно атмосферному, на выходе второй ступени создается форвакуум.

Мембранные сепараторы весьма удобны для использования в ГХ-МС. Так как давление в области мембраны равно атмосферному, времена удерживания не искажаются из-за несбалансированного потока, как это может иметь место при капиллярном ограничителе. Мембранный сепаратор может работать в большом интервале скоростей потока: как при низких (8–10 мл/мин), так и при высоких (60–80 мл/мин) скоростях. Основная проблема при работе с мембранным сепаратором – оптимизация рабочей температуры. Нижний предел рабочих температур 75–80 °С; верхний 225–230 °С.

Идеального интерфейса, который удовлетворял бы всем требованиям, пока не существует. В каждом конкретном случае необходимо подбирать интерфейс, наиболее подходящий для решения конкретной задачи. Выбор сепаратора определяется обычно его стоимостью, удобством конструкции, эффективностью удаления газа-носителя, гибкостью и рабочими характеристиками.

12.2.4.4. Система жидкостный хроматограф-масс-спектрометр

Непосредственное соединение ЖХ с МС обеспечивает значительное сокращение времени анализа, позволяет осуществлять количественный анализ и селективное детектирование полученных ионов. Однако при непосредственном соединении ЖХ с МС возникали определенные трудности.

Сочетание **жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием** длительное время было затруднено тем, что введение потока жидкости в вакуум масс-спектрометра требовало подходящего интерфейса. Для решения этой проблемы было предложено несколько различных интерфейсов.

Соединение ЖХ и МС предъявляет серьезные требования к основным компонентам системы: хроматографу, масс-спектрометру и интерфейсу.

Для нормальной работы жидкостного хроматографа желательно, чтобы соединение его с масс-спектрометром не накладывало слишком сильных ограничений на виды растворителей, применяемых для элюирования, на величину потока растворителя, не препятствовало возможности градиентного элюирования и применения летучих и нелетучих буферов, а также реагентов в виде ионных пар.

Интерфейс должен обеспечивать высокую степень обогащения образца по отношению к растворителю, высокую эффективность переноса образца из колонки в ионный источник, отсутствие расширения хроматографических пиков, возможность испарения малолетучих образцов.

Ниже будут рассмотрены основные конструкции интерфейсов для ЖХ-МС.

В системе ЖХ-МС-ИАД (**источник ионизации при атмосферном давлении**) элюат из хроматографической колонки (рис. 12.13) поступает в нагреваемую испарительную трубку и в потоке подогретого газаносителя (азот или гелий) переносится в ионную плазму. Ионизация происходит в коронном разряде при атмосферном давлении в результате ряда ионно-молекулярных реакций. Часть ионов из плазмы отбирается в квадрупольный масс-спектрометр через диафрагму. При непосредственном соединении колонки с источником ИАД предел обнаружения при анализе дибензальацетона составляет около 1 нг. Высокое давление газа в ионном источнике способствует образованию кластерных ионов из молекул полярных растворителей. Эти ионы включают до пяти и более молекул растворителя и сильно затрудняют анализ низкомолекулярных полярных веществ. Этому недостатка лишен **интерфейс с распылительной каплеобразующей системой** ввода образца в ионный источник с ИАД и специальной камерой диссоциации кластерных ионов.

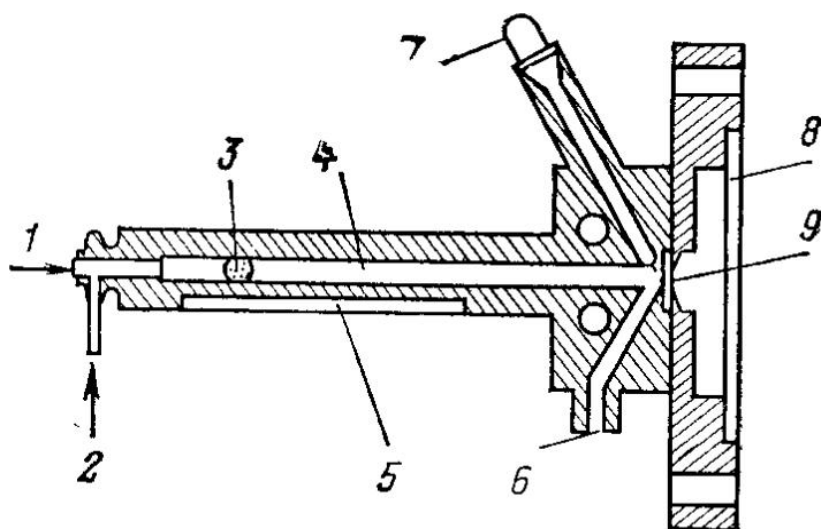


Рис. 12.13. Ионный источник с ионизацией в коронном разряде при атмосферном давлении: 1 – поток из хроматографа; 2 – поток газа-носителя; 3 – фильтр; 4 – испарительная стеклянная трубка; 5 – нагреватель; 6 – выход паров растворителя; 7 – электрод; 8 – фланец с вакуумным уплотнением; 9 – диафрагма для пропускания паров образца.

С помощью этой системы были получены масс-спектры различных нелетучих соединений: аминокислот, олигопептидов, антибиотиков, нуклеозидов, витаминов, гликозидов, алкалоидов и показана возможность получения для них молекулярных или квазимолекулярных ионов. В качестве растворителей могут использоваться вода, метанол, ацетон.

Интерфейс с непосредственным вводом жидкости (НВЖ) – наиболее простой путь соединения жидкостного хроматографа и масс-спектрометра. К достоинствам этой системы относится возможность анализа элюатов, содержащих большое количество воды (до 70%). Увеличение эффективности на 1–2 порядка может быть достигнуто при использовании химической ионизации, когда газ-носитель служит газом-реагентом.

Изучение ряда растворителей, обычных для ВЭЖХ, показало, что они вполне приемлемы для использования в ЖХ-МС-ХИ с интерфейсом НВЖ. В число этих растворителей входят *n*-пентан, изооктан, бензол, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетонитрил, метанол, вода, буферные растворы.

В первых моделях интерфейсов НВЖ ограничителем потока служил длинный узкий капилляр из стекла или металла с малым отверстием со стороны ионного источника или тонкая металлическая проволока, введенная внутрь капилляра для уменьшения потока жидкости. Эффек-

тивность при этом улучшается, если капиллярную трубку заменить на диафрагму с регулируемой температурой.

НВЖ-интерфейсы были в дальнейшем усовершенствованы следующим образом: образец в ионный источник вводится в виде струи, состоящей из отдельных капель жидкости. Распыление струи жидкости на отдельные капли осуществляется при пропускании ее с большой скоростью через капилляр и отверстие в диафрагме, отстоящей на некотором расстоянии от конца капилляра. Испарение растворителя из капель струи происходит в специальной камере, откуда газовая смесь поступает в ионный источник (ХИ). Такой интерфейс имеет следующие недостатки: чувствительность детектирования положительных ионов достаточно высока только для веществ с молекулярными массами более 150; он сочетается только с химической ионизацией; для анализа используется только 1–4% элюата. Однако этот интерфейс прост по устройству, позволяет работать с любыми летучими, а также с труднолетучими и термически нестабильными веществами и с растворителями с высоким содержанием воды.

Струйный интерфейс был предложен для обогащения элюата и удаления избытка растворителя перед вводом в ионный источник с тем, чтобы исправить один из самых серьезных недостатков НВЖ-интерфейсов – низкую эффективность использования образца. Струйный сепаратор для ЖХ-МС аналогичен применяемому в ГХ-МС.

В первом варианте этого устройства осуществлялась химическая ионизация пучка в области относительно высокого давления между соплом и расширителем с помощью электронной пушки с дифференциальной откачкой, однако чувствительность была низкой из-за неэффективного переноса ионов в анализатор. В более совершенном варианте источник ХИ соединен с распылителем обогреваемой трубкой. Все пары, проходящие через распылитель, поступают в ионный источник при давлении около 133 Па.

Струйный интерфейс чаще используют для определения неполярных и среднеполярных веществ.

Интерфейсы с выпариванием растворителя, основанные на преимущественном испарении более легкокипящего растворителя, обеспечивают более высокую степень обогащения элюата, который целиком поступает в масс-спектрометр.

Одним из основных типов интерфейсов, используемых в ВЭЖХ-МС, является **интерфейс с движущимся транспортером** (рис. 12.14). Элюат из ЖХ колонки или после прохождения через предварительный детектор наносится на транспортер непосредственно или через делитель потока. Транспортер представляет собой ленту шириной около 0,3 см из металла (обычно нержавеющей стали) или полиимидного полимера — каптона. Транспортер из нержавеющей стали имеет большую емкость, но каптон используется чаще, так как обеспечивает испарение нестабильных соединений при более низкой температуре.

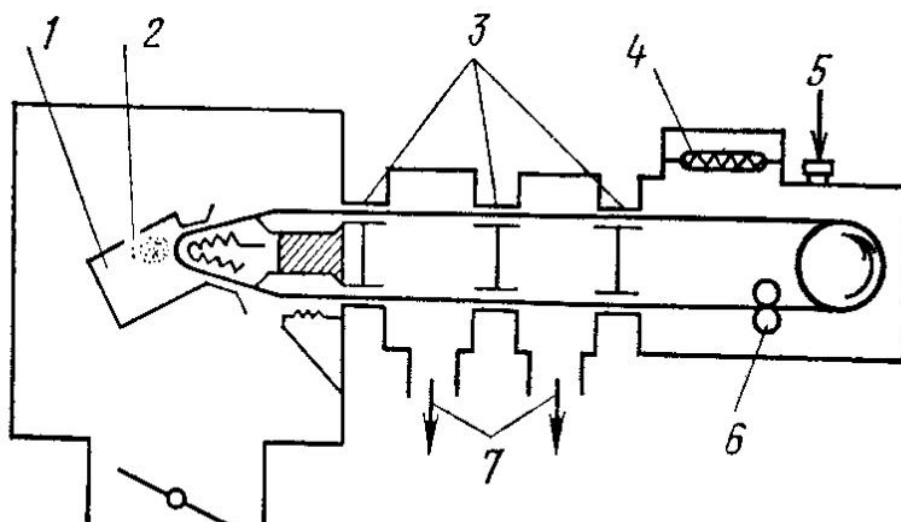


Рис. 12.14. Транспортерный интерфейс для ВЭЖХ-МС: 1 – ионизационная камера; 2 – область электронного пучка; 3 – вакуумные уплотнения; 4 – ИК-испаритель; 5 – поток из колонки; 6 – привод транспортера; 7 – откачка.

Скорость потока растворителя, который может принять транспортер, зависит от вида растворителя и может достигать до 1,5 мл/мин для летучих неполярных растворителей, а для воды или водных растворов до 0,1–0,2 мл/мин.

Интерфейс с ленточным транспортером вызывает минимальное изменение разрешения и формы хроматографических пиков. Так, если высота минимума между двумя соседними пиками, зарегистрированными УФ-детектором, равна 5–7 % от высоты пиков, то при использовании интерфейса с ленточным транспортером она увеличивается до 8–12 %. Применимость этого интерфейса для широкого круга термически нестабильных и нелетучих веществ показана на примерах анализа различных микотоксинов, триглицеридов, восков, порфиринов, антибиотиков, пестицидов, простагландинов, желчных кислот, нуклеозидов, нуклеотидов, дисахаридов и др.

Большим достоинством этой системы является возможность соединить ее с методами ионизации, эффективными для нелетучих веществ, такими, как полевая и лазерная десорбция, масс-спектрометрия вторичных ионов и др. Она может служить в этих случаях не только интерфейсом для соединения ЖХ и МС, но и удобной системой ввода нелетучих образцов в масс-спектрометр.

Многие вещества, особенно биологического происхождения, могут вызывать загрязнение ионного источника, что влияет на результаты анализа этих образцов. Вместе с тем частая очистка источника отрицательно сказывается на производительности прибора. Для предотвращения попадания в ионный источник нежелательных веществ была разра-

ботана методика переключения потоков для системы ЖХ-МС с НВЖ-интерфейсом.

Элюат из колонки подается на отдельный хроматографический детектор, а в масс-спектрометр с ХИ непрерывно подается чистый растворитель до начала выхода из колонки пика, который должен быть проанализирован на масс-спектрометре. Тогда потоки переключаются, и в ионный источник подается элюат из хроматографа. После выхода нужного пика потоки вновь переключаются, так что количество веществ, поступающих в масс-спектрометр, значительно уменьшается.

12.2.4.5. Методы хромато-масс-спектрометрии

Ионная масс-хроматография. Метод ионной масс-хроматографии (ИМХ) представляет собой метод, в котором масс-спектрометр используется для непрерывного селективного детектирования одного или нескольких ионов с заданными массами. Селективное ионное детектирование позволяет определить время удерживания каждого компонента, идентифицировать его и провести количественный анализ.

Ионная масс-хроматография осуществляется двумя способами. Первый способ состоит в том, что из всех ионов, образующихся в ионном источнике, на детектор поступают только ионы с одной или несколькими заданными массами. Этот метод получил название **селективного ионного детектирования (СИД)**, а в случае одновременной регистрации нескольких ионов – **многоионного детектирования (МИД)**. В литературе встречаются и другие термины для обозначения этого метода: «масс-фрагментография», «мониторирование выбранных ионов», «получение ионных профилей» и др.

Благодаря высокой специфичности метод СИД незаменим при анализе примесей, поскольку удается выделять их пики даже на фоне больших соседних хроматографических пиков.

Селективное ионное детектирование является наиболее чувствительным и селективным методом анализа в ХМС. Однако этот метод применим, если заранее известны характеристические пики анализируемых соединений.

Хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения. Сочетание масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР) с хроматографическим разделением является перспективным и позволяет получать информацию двоякого рода. Во-первых, это полные масс-спектры высокого разрешения за время выхода хроматографических пиков, причем точное измерение масс ионов позволяет установить элементный состав каждого иона в масс-спектре. Во-вторых, использование масс-спектрометра высокого разрешения как хроматографического детекто-

ра с очень высокой специфичностью для непрерывного детектирования заданных ионов с точной массой позволяет отделить их от других ионов с той же номинальной массой, но иным элементным составом. Это увеличивает селективность детектирования по отношению к другим веществам, элюируемым вместе с данным компонентом, по отношению к фону прибора и парам неподвижной фазы и т. п.

Масс-хроматограммы, получаемые по ионам с точными массами, более просты, чем хроматограммы по ионам с номинальными массами. Они содержат меньше пиков, которые поэтому лучше разрешены, и позволяют более точно определять времена удерживания компонентов. Для регистрации таких масс-хроматограмм задается точная масса прослеживаемого иона и окно масс, определяемое точностью измерения массы. При каждом сканировании масс-спектра интенсивность пика иона, попадающего в это окно масс, регистрируется как функция номера соответствующего масс-спектра, образуя масс-хроматограмму высокого разрешения.

Получение производных анализируемых веществ. При подготовке образца к анализу используют прием получения производных анализируемых веществ для повышения летучести и стабильности анализируемых веществ. Анализ производных обычно требует меньше времени и при этом улучшается хроматографическое разрешение.

Введение новых структурных групп в молекулы анализируемых веществ может изменить их масс-спектральные характеристики (интенсивность пиков молекулярных и характеристических осколочных ионов, направление и селективность распада, вероятность захвата электронов или сродство к протону и др.), вследствие чего повышается специфичность и чувствительность анализа.

Однако, получение производных – это дополнительная операция, усложняющая общую схему анализа. Для ХМС очень важен также правильный выбор производных и методов их получения, так как степень превращения разных компонентов может быть различной. В оптимальном случае реакция, используемая для получения производных, должна быть достаточно простой и селективной. Получаемые производные должны обладать меньшей адсорбционной способностью и большей термостабильностью по сравнению с исходными веществами, хорошей стабильностью в растворителях и устойчивостью к гидролизу.

Для получения производных в качестве реагентов используется большая группа соединений. Основные типы реакций связаны с получением следующих производных: ацильные, алкильные и силильные, производные первичных аминов, карбонильных соединений, бифункциональных соединений и др. Наиболее эффективным методом получения производных для ГХ-МС является силилирование. Широкое распространение получили триметилсилильные производные (ТМС). Вве-

дение триметилсилильных групп значительно повышает летучесть исследуемых соединений.

Одним из первых силилирующих реагентов был гексаметилдисилазан, который затем был заменен бис(триметилсилил)ацетамидом и бис(триметилсилил)трифторацетамидом, представляющими собой очень хорошие растворители. Реакции с этими реагентами, протекающие, как правило, количественно, очень часто применяются для получения ТМС-производных сложных смесей органических соединений, выделяемых из биологических объектов.

Одно из основных достоинств силилпроизводных – простота проведения реакции.

Органические функциональные группы можно расположить в следующий ряд по уменьшению «силильной акцепторной способности»: спирты > фенолы > карбоновые кислоты > амины > амиды.

Многие органические соединения, содержащие активный атом водорода, реагируют с соединениями, легко отщепляющими алкильную группу, в присутствии основного катализатора, образуя алкилпроизводные. В качестве метилирующего агента обычно используется diazometan, реакция с которым осуществляется с количественным выходом в мягких условиях, без нежелательного повышения температуры. Кроме того, избыток реагента легко удаляется. С помощью этого реагента получают метильные производные кислот и некоторых спиртов. Легче всего образуются эфиры кислот. При метилировании соединений, содержащих несколько функциональных групп, возможно образование набора производных. Широкое распространение получил процесс перметилирования при анализе углеводов, пептидов, пуринов и пиримидинов.

Получение стабильных производных оксимов связано с блокированием кетогруппы для предотвращения ее енолизации в последующих реакциях. Получение производных осуществляется растворением кетона в подходящем растворителе и добавлением соответствующего реагента.

Амины, играющие важную роль в структурных и биохимических исследованиях, анализируют в виде ацетил-, триметилсилил-, трифторацетил-, пентафторпропионил- и гептафторбутирильных производных. Первичные амины часто анализируют в виде изотиоцианатных производных.

Предложен метод получения производных первичных и вторичных аминов при взаимодействии их с этиловыми эфирами дитиокарбаминовой кислоты. Образующиеся производные первичных аминов разлагаются при пиролизе в инжекторе хроматографа (в то время как более устойчивые производные вторичных аминов остаются без изменения) и анализируются на ГХ-колонке высокого разрешения, соединенной с масс-спектрометром.

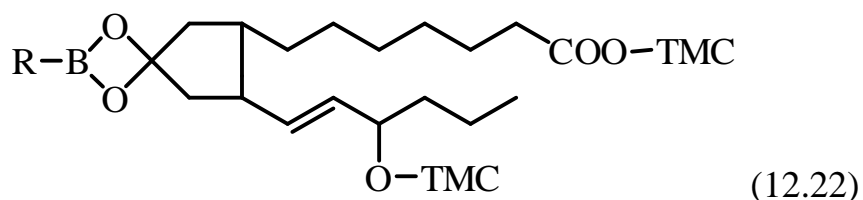
Большую роль в получении производных для ХМС играет метод смешанного блокирования различных функциональных групп разными остатками. В этом случае правильный подбор возможных блокирующих групп часто позволяет увеличить стабильность производных и повысить специфичность распада при диссоциативной ионизации. Так, при изучении биологически активных катехоламинов были предложены следующие реакции получения производных: перфторацелирование, триметилсилилирование, N-трифторацетил-O-триметилсилилирование и другие.

Масс-спектры химической ионизации боратных производных характеризуются наличием интенсивных пиков молекулярных или квази-молекулярных ионов. Атом бора оказывает определяющее влияние на направления распада, так что наиболее интенсивные пики в масс-спектрах относятся к исходной молекуле, а не к блокирующей группе. Наличие двух природных изотопов бора облегчает идентификацию даже при низком разрешении.

Производные диолов и кетонов имеют хорошие хроматографические характеристики; этот факт может быть использован при анализе алкенов, которые селективно окисляются. Последующее превращение их в фенилборатные производные и анализ с помощью ГХ-МС с электроударной или химической ионизацией позволяют установить положение двойной связи в исходных алкенах.

Боратные производные широко используются для стабилизации углеводов. Особо следует сказать о смешанных борат-ТМС-производных, дающих весьма характерные масс-спектры, на основании которых удается определять число атомов углерода (пентоза или гексоза), размер кольца (фураноза или пираноза) и стереохимию гидроксильных групп.

Для анализа таких многофункциональных соединений, как простагландины, получают тризамещенные производные, содержащие, например, циклическую боратную, ТМС-эфирную и ТМС-сложноэфирную группы:



Борные кислоты используют для получения хорошо разделяющихся полизамещенных производных простагландинов F_{1a} , F_{2a} и F_{3a} . Метод ХИ позволяет определять простагландины F_a по ионам $(M-RBO_2H_2-TMS-O)^+$, которые для разных простагландинов имеют разные

массы. ЭУ масс-спектры производных простагландинов F_{2a} характеризуются максимальным пиком иона $(M-71)^+$, имеющим такую же массу, как соответствующий ион $(M-69)^+$ в спектре F_{3a} .

Циклические боратные производные получают также для анализа липидов, гидроксиламинов, гидроксикислот, катехоламинов.

Идентификация соединений в смесях. Важнейшей целью ХМС анализа являются идентификация соединений и качественный анализ смесей. Этот метод позволяет охарактеризовать вещество, не выделяя его из смеси, часто весьма сложной.

Для **качественного анализа** и установления структуры смесей ХМС позволяет получить полные масс-спектры компонентов, являющиеся как бы «отпечатками пальцев» молекулярной структуры и характеризующие молекулярную массу и массы основных структурных фрагментов, по которым можно установить их состав и наличие определенных функциональных групп. Масс-спектры высокого разрешения позволяют с большой точностью установить элементный состав молекулярного и осколочных ионов, а значит, и структуру исходной молекулы.

Масс-хроматограммы дают возможность определить времена удерживания (или индексы удерживания) для всех разделенных компонентов, причем благодаря селективному ионному детектированию и специальным методам обработки данных степень разделения масс-хроматограмм, как правило, значительно выше, чем обычных хроматограмм, регистрируемых другими хроматографическими детекторами. Селективный характер детектирования с помощью масс-спектрометра позволяет выделить определенные классы веществ из сложной и даже неразделенной хроматограммы.

Разные методы ионизации обладают селективностью по отношению к некоторым структурным или функциональным особенностям анализируемых молекул. Выбирая соответствующий способ ионизации, можно осуществить селективный анализ определенных типов структур или удостовериться в наличии определенных функциональных групп.

Идентификация соединений по масс-спектрам осуществляется сравнением полного масс-спектра анализируемого вещества или отдельных пиков в нем с масс-спектрами эталонных соединений либо интерпретацией анализируемого масс-спектра на основании спектро-структурных корреляций. Пики ионов для анализа измеряются либо путем регистрации полных масс-спектров компонентов хроматограммы, либо непрерывной регистрацией небольшого набора пиков методом селективного ионного детектирования.

В сложных случаях анализа, когда имеет место наложение на характеристические ионы данного компонента со стороны других компонентов смеси, с целью уменьшения этого наложения используется масс-спектрометр с высокой разрешающей способностью. В этом случае мо-

гут быть разделены ионы, имеющие одинаковые номинальные массы, но разные элементные составы.

Важной задачей ХМС является определение отдельных изомеров. Так, канцерогенная активность полициклических ароматических углеводородов сильно зависит от структуры молекул: из пяти структурных изомеров тетрациклических ароматических систем с молекулярной массой 228 бенз[*a*]антрацен является сильным канцерогеном, хризен и бенз[*c*]фенантрен обладают слабой канцерогенностью, а два других соединения не обнаруживают канцерогенной активности. Анализ изомеров затруднен из-за близости их хроматографических и масс-спектральных характеристик. Естественно, подбор оптимальных условий анализа с варьированием, например, различных методов ионизации и различных условий разделения, значительно повышает вероятность разделения изомеров. Немаловажную роль играет правильный выбор производных анализируемых компонентов со специфическими направлениями диссоциативной ионизации. Так, при ХИ со смесью газов-реагентов (5–10% CH_4 в аргоне) разные изомеры полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) давали различные масс-спектры. Специфичность ХИ была использована для идентификации изомеров ПАУ, обнаруженных в воздухе. Метод позволил достаточно хорошо разделить метилантрацены и метилфенантрены, а также метилфлуорантены, метилпирены и бензфлуорены.

Сравнение результатов анализа трифторацетил-, пропилхлорид-производных амфетамина, проведенного с помощью ГХ-МС на колонках с хиральной и ахиральной неподвижными фазами, показало, что как хиральная, так и ахиральная неподвижные фазы могут быть использованы для определения энантиомеров. Преимуществом хиральной фазы является возможность разделения всех изомеров. При разделении на ахиральных фазах необходима коррекция результатов на совместное элюирование энантиомеров.

Использование разных методов ионизации дает дополнительную возможность для получения структурной информации. Чаще всего в ХМС применяется ХИ. Процессы ионизации в случае ХИ совершенно отличны от ЭУ ионизации и происходят в результате химических реакций между первичными ионами (ионами-реагентами) и молекулами исходного образца.

Предложены ионно-молекулярные реакции для идентификации разных органических функциональных групп: первичных, вторичных и третичных спиртов; первичных, вторичных и третичных аминов, циклических алканов и олефинов; ароматических соединений, содержащих и не содержащих серу; в некоторых случаях удается различать окисленное состояние гетероатомов в полиароматических соединениях и даже стереоизомеры.

При химической ионизации оксидом дейтерия D_2O все активные атомы водорода, присоединенные к атомам N, S и O в органических молекулах, обмениваются на дейтерий (D) в ионном источнике масс-спектрометра. Если молекулярная масса образца известна, то число активных атомов водорода может быть рассчитано по пикам в области молекулярных масс масс-спектра. Таким образом можно дифференцировать первичные, вторичные и третичные амины.

Масс-спектры ХИ могут быть использованы также для идентификации многих других функциональных групп. Спектры кислот, альдегидов, кетонов содержат, соответственно, характерные пики ионов, что дает возможность идентифицировать эти классы соединений.

Масс-спектры отрицательных ионов дают информацию, дополняющую масс-спектры положительных ионов, так как структурные характеристики, обуславливающие стабилизацию ионов, различны для положительных и отрицательных ионов.

При использовании в качестве газа-реагента Ar или N_2 масс-спектры ХИ положительных ионов очень похожи на спектры ЭУ. С помощью импульсной техники можно одновременно регистрировать спектры положительных ионов, похожие на спектры ЭУ, и спектры отрицательных ионов, образующихся в результате резонансного электронного захвата. Это позволяет получать взаимно дополняющую структурную информацию.

Количественный анализ требует предварительной идентификации компонентов анализируемой смеси и выбора характеристических ионов. В оптимальном случае для анализа необходимо выбирать ионы, которые образуются только за счет диссоциативной ионизации анализируемых соединений. Если пики характеристических ионов не являются чистыми (т. е. имеются наложения), то добиться надежного количественного определения не удастся. Вклад в интенсивность пиков характеристических ионов фона или пиков ионов других компонентов приводит к завышенным результатам при определении концентрации анализируемого вещества. При этом необходимо учитывать, что величина наложения пиков может быть велика, если оно обусловлено компонентами, присутствующими в смеси в значительно больших количествах.

Селективность зависит от выбора характеристических ионов. Обычно считается, что ионы с более тяжелыми массами более характеристичны, чем ионы с малыми массами, которые имеют много источников образования. Ионы, представляющие целую молекулу, наиболее характеристичны, получение таких ионов может быть осуществлено ионизацией электронами низких энергий или методами «мягкой» ионизации, например ХИ. Последняя имеет дополнительное преимущество — возможность выбора газа-реагента для селективной ионизации определенных компонентов в сложной смеси. Таким образом, вместо одинаковой общей ионизации всех летучих молекул смеси, как при ЭУ,

могут быть подобраны условия для ионизации только выбранных типов соединений.

Современные масс-спектрометры могут обеспечить сканирование полного масс-спектра для количества вещества на уровне 10^{-10} г; в режиме селективного ионного детектирования (СИД) увеличивается время измерения соответствующих пиков и, следовательно, понижается теоретический предел обнаружения от 100 до 1000 раз. Благодаря этому данный метод наиболее удобен для количественного определения отдельных компонентов или ограниченного числа компонентов смесей.

Количественный анализ в ХМС обычно проводят с использованием внутреннего стандарта (или нескольких стандартов). Измеряется отношение площадей профилей пиков ионов на масс-хроматограммах анализируемого соединения и стандарта. Путем анализа искусственных смесей получают зависимость этого отношения от концентрации анализируемого соединения. Иногда при расчете используют не отношение площадей, а отношение интенсивностей пиков на масс-хроматограммах ионов анализируемого вещества и эталона.

При количественном анализе соединений обычно используют три типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами; гомологи, характеризующиеся ионами с тем же составом, что и анализируемые соединения, но с другим временем удерживания; соединения, которые распадаются с образованием иных ионов, но обладающие сходными хроматографическими характеристиками. Основное преимущество меченых соединений – их сходство с анализируемыми соединениями, они дают ионы того же состава, но с другой массой, что обеспечивает наибольшую чувствительность регистрации этих ионов.

Применение в качестве внутреннего стандарта гомолога, образующего такой же ион, как и анализируемое вещество, но имеющего другое время удерживания, имеет то преимущество, что этот метод может быть реализован на любом масс-спектрометре.

Синтезируемые меченые соединения, используемые в качестве внутренних стандартов, не всегда имеют высокую изотопную чистоту, что может приводить к ошибкам при количественном анализе. Эти ошибки вызываются двумя причинами: 1) наложением пиков образца на пики характеристических ионов стандарта; 2) наложением пиков стандарта на пики характеристических ионов анализируемых соединений.

12.2.4.6. Применение хромато-масс-спектрометрии в химико-токсикологическом анализе

Лекарственные, наркотические вещества и их метаболиты.

Метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС) используется в химико-токсикологическом анализе как высокочувствительный, высокоспецифичный и достаточно быстрый метод идентификации и количественного определения лекарственных и наркотических веществ. Надежность идентификации значительно повышается в связи с использованием такой специфической характеристики, как масс-спектр в дополнение к хроматографическим параметрам удерживания.

В газовом хроматографе используется кварцевая капиллярная колонка с пленкой привитой стационарной фазы. В качестве стационарных фаз используют как неполярные (например, диметилполисилоксан, дифенилполисилоксан), так и полярные (полиэтиленгликоль) фазы в зависимости от структуры и свойств определяемых веществ.

Определяемое вещество из колонки через интерфейс (соединительное устройство) поступает в масс-спектральный детектор (МСД). В интерфейсе создается градиент давления от почти атмосферного на выходе из колонки до высокого вакуума с МСД.

Ионизация нейтральных молекул происходит под действием потока электронов, образующихся в ионном источнике. Для ионизации большинства органических молекул достаточна энергия электронов 70 эВ. При этом образуется возбужденный молекулярный ион M^+ и происходит его дальнейшая фрагментация.

С помощью системы фокусирующих линз образовавшиеся ионы направляются в анализатор масс, где происходит их разделение по отношению массы к заряду. С помощью анализатора масс осуществляется сканирование всех ионов в заданном интервале масс.

В связи с необходимостью определения нанограммовых количеств токсикантов на фоне эндогенных веществ к стадии пробоподготовки пробы предъявляются определенные требования:

- более полное извлечение определяемых веществ и их метаболитов;
- минимальное извлечение эндогенных веществ (белков, липидов и др.);
- отсутствие загрязнений пробы примесями растворителя, материала посуды и др. Чистота посуды, реактивов, лабораторных помещений могут стать источниками неконтролируемых загрязнений анализируемых проб.

Основными методами выделения определяемых веществ после гидролиза являются жидкость-жидкостная и твердофазная экстракция.

Основным недостатком ЖЖЭ является соэкстракция различных эндогенных соединений. В случае применения ТФЭ лучше отделяются эндогенные соединения, которые влияют как на результаты анализа, так и на свойства хроматографической системы.

При определении наногаммовых количеств веществ проводят концентрирование получаемых экстрактов. Наиболее часто концентрирование проводится методом упаривания досуха или до 10–15 мкл при 40–60 °С под слабым током азота или воздуха. Применение легколетучих экстрагентов на стадии пробоподготовки уменьшает продолжительность теплового воздействия на экстракт.

Хромато-масс-спектрометрическое определение малолетучих и полярных соединений невозможно без предварительной дериватизации, которая состоит в преобразовании полярных групп (COOH, OH, NH₂, и др.) в неполярные. В результате дериватизации снижаются потери за счет низкой летучести, повышаются чувствительность и точность определения.

С целью дериватизации проводят следующие реакции:

- получение метиловых эфиров органических кислот;
- получение триметилсилилпроизводных с фторалкилангидридами кислот или фторацетиламидами;
- получение ацетилпроизводных по реакции с уксусным ангидридом в безводном пиридине;
- получение смешанных производных для веществ с различными функциональными группами.

Основными критериями выбора реакции дериватизации являются хорошее разделение дериватов, наличие интенсивных пиков в масс-спектре, стабильность деривата во времени и отсутствие расщепления пиков дериватов на хроматограмме.

Реагенты, используемые в процессе дериватизации, влияют на хроматографическую систему. Поэтому избыток фторсодержащих ангидридов необходимо удалить перед ГХ-МС-анализом. Силирующие агенты не удаляют, однако их избыток ухудшает рабочие характеристики МСД.

Результаты ГХ-МС-анализа в значительной степени зависят от фоновых соединений биожидкостей. Поэтому одновременно проводят анализ холостых образцов биожидкостей, не содержащих определяемых (лекарственных, наркотических) веществ. Эндогенные и экзогенные соединения, содержащиеся в холостой пробе, образуют фон и могут давать на хроматограмме интенсивные пики, сравнимые с анализируемыми. Холостые образцы подвергаются всем операциям аналогично анализируемой пробе.

К основным фоновым компонентам относятся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая кислоты, холестерин, кофеин, никотин, котинин (метаболит никотина).

При хромато-масс-спектрометрическом определении лекарственных и наркотических веществ возможны нежелательные побочные процессы: термическое разложение в инжекторе или в колонке (декарбокислирование кислот, деацетилирование героина, разложение производных 1,4-бензодиазепина); адсорбция полярных соединений в инжекторе и колонке; потери веществ в результате не оптимальных условий ГХ-МС-анализа.

Применение внутреннего стандарта в ГХ-МС-методе позволяет снизить влияние многих факторов на результаты анализа. Внутренний стандарт вводят в пробу биожидкости и подвергается всем операциям, которые производятся с определяемым веществом, что позволяет контролировать как процесс пробоподготовки, так и процесс ГХ-МС-анализа.

К основным требованиям, предъявляемым к внутреннему стандарту относятся: летучесть, стабильность, близкие времена удерживания стандарта и определяемого вещества, симметричный пик, близкие концентрации стандарта и определяемого вещества. Таким требованиям удовлетворяют аналоги, меченные стабильными изотопами (дейтерированные соединения), или применяют родственные соединения, изомеры, гомологи.

При приготовлении градуировочных растворов следует иметь в виду, что область концентраций лекарственных и наркотических веществ в организме изменяется в широких пределах (от пг/мл до десятков мкг/мл). Наиболее часто рабочим диапазоном является область 1 нг/мл – 10 мкг/мл. Обычно метчики вводят в биожидкость и оставляют на 15–60 минут до установления равновесия, а затем проводят пробоподготовку в соответствии с методикой анализа. Оптимальным считают 5–7 значений концентраций градуировочного графика. Растворы градуировочного графика и пробы готовятся в трех повторностях. За величину предела обнаружения в ГХ-МС-методе принимают величину, превышающую в 3–4 раза уровень шумов.

Используются, главным образом, два типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами, и структурные аналоги. Меченные соединения в качестве внутренних стандартов применялись при исследовании баклофена, amitриптилина и его основных метаболитов, берберина и др.

Структурные аналоги в качестве внутреннего стандарта в ХМС методе использовались при определении лидокаина и его дезэтилированных метаболитов, амфетамина, лоразепама и оксазепама, карбамазепина, имипрамина, никотина, виразола, галоперидола, преднизолона и др.

Метод ХМС широко применяется для идентификации примесей лекарственных веществ. Известно, что многие лекарственные вещества

содержат довольно значительные количества примесей, которые могут быть ошибочно приняты за метаболиты и могут появиться как при синтезе ЛВ, так и в процессе разложения во время хранения. Например, при исследовании образцов кокаина, применяемого в медицине, и кокаина, продающегося в США на черном рынке, обнаружено, что второй содержит значительную примесь другого вещества, которое, согласно его масс-спектру, было идентифицировано, как лигнокаин. Хроматографический количественный анализ примеси показал, что в этом кокаине содержится до 37% лигнокаина.

Методы ГХ и ЖХ оказались недостаточно чувствительными для определения метимазола (1-метилимидазол-2-тиол) в моче и плазме крови. Метод, включающий экстракцию, бензилирование метимазола и последующий анализ ГХ-МС с ЭУ ионизацией, позволил значительно повысить чувствительность определения.

Для выявления антидепрессанта имипрамина и его метаболитов в различных биологических жидкостях метод ГХ-МС оказался достаточно селективным и чувствительным.

Основным фактором, ограничивающим чувствительность определения, являются мешающие эндогенные соединения, обладающие сходными экстрактивными и аналитическими характеристиками, вследствие чего пределы обнаружения лекарственного вещества в плазме крови на несколько порядков выше предела обнаружения индивидуального соединения.

При исследовании метаболизма хлорпромазина в организме человека методом ХМС были идентифицированы (по временам удерживания и относительной интенсивности пиков) два метаболита хлорпромазина: десметил- и дидесметилхлорпромазин. Селективность определения удалось увеличить при переходе к регистрации ионов, характеризующих трифторацетильные боковые цепи десметил- и дидесметилхлорпромазина (массы 168 и 154), а также молекулярных ионов, содержащих изотоп ^{37}Cl .

Для определения карбамазепина был использован метод ВЭЖХ с обращенной фазой для выделения и разделения метаболитов карбамазепина из мочи с последующим ГХ и ГХ-МС анализом. Было идентифицировано два метаболита карбамазепина – его *цис*-10,11-дигидродиол- и *О*-метилкатехин-производные.

В качестве примера исследования биологического объекта с применением хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) можно рассмотреть определение барбитуратов в крови после их выделения методом ЖЖЭ. В полученной хроматограмме кислого экстракта из крови идентифицирован пик, совпадающий по времени удерживания с пиком фенобарбитала в хроматограмме модельной смеси (рис. 12.15).

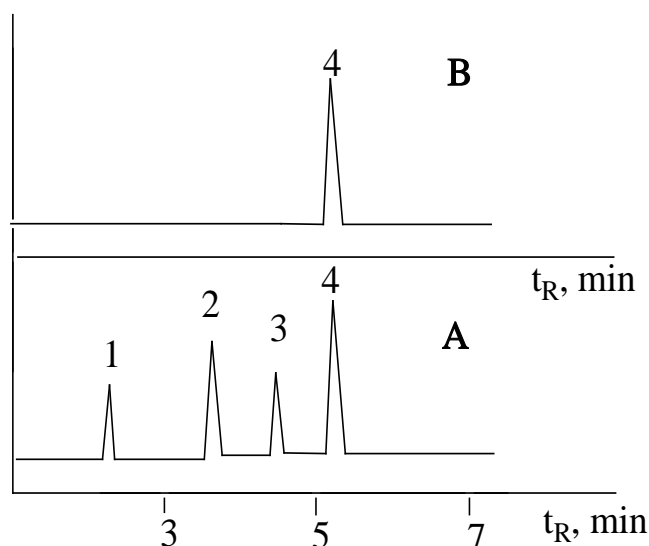


Рис. 12.15. Хроматограммы модельной смеси (А) и экстракта из крови (В). 1 - барбитал, 2 – этаминал натрия, 3 – гексобарбитал, 4 – фенобарбитал.

Масс-спектр пика, идентифицированного как фенобарбитал, представлен на рис. 12.16 и соответствует масс-спектру фенобарбитала-стандарта.

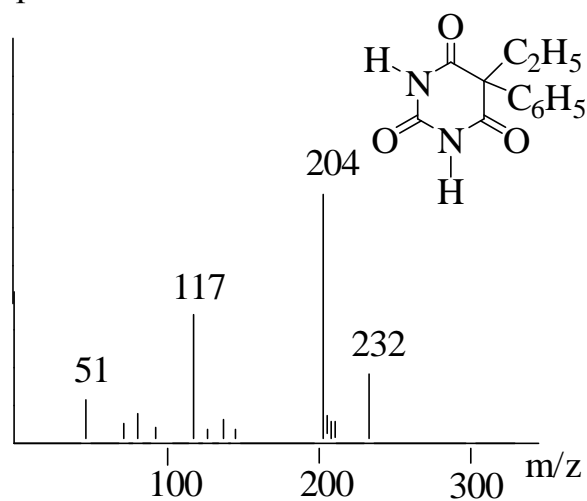


Рис. 12.16. Масс-спектр пика, идентифицированного как фенобарбитал.

Единственным серьезным недостатком ГХ-МС метода при определении ЛВ и их метаболитов является невозможность анализа труднолетучих соединений. Один из путей преодоления этого недостатка связан с введением в аналитическую схему пиролитической установки.

12.2.4.7. Определение токсикантов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды

Метод ХМС позволяет проводить идентификацию и количественное определение токсичных компонентов в пищевых продуктах. Наибольшую ценность этот метод представляет при идентификации и количественном определении N-нитрозаминов в рыбных и мясных продуктах.

Необходимость идентификации N-нитрозаминов и измерения их концентраций в пищевых продуктах диктуется двумя факторами. Во-первых, из всех изученных нитрозаминов только N-нитроамины обладают канцерогенной активностью по отношению к живым существам. Во-вторых, N-нитроамины образуются при взаимодействии соответствующих вторичных аминов и нитрит-ионов. В настоящее время установлено, что N-нитрозосоединения образуются также, хотя и с меньшей легкостью, из первичных и третичных аминов и даже из четвертичных аммониевых солей. При определении N-нитрозодиметиламина в рыбе методом ХМС был достигнут предел обнаружения 10 нг на 1 мкл введенного материала. Методика была распространена на определение гетероциклических N-нитрозаминов и N-нитрозодиалкиламинов в мясных продуктах.

Для определения N-нитрозо-3-гидроксипирролидина (НГП), который образуется в пищевых продуктах при их термической обработке применяется метод ГХ-МСВР.

Методы ХМС занимают ведущее место среди аналитических методов при изучении окружающей среды. В наиболее распространенных объектах окружающей среды актуальным является определение таких соединений как хлорсодержащие углеводороды и их метаболиты, полихлорбифенилы, гексахлорциклогексан, гексахлорбензол, хлорированные дибензодиоксины и дибензофураны, пластификаторы, добавки к медицинским и пищевым препаратам и металлорганические соединения.

Эффективное концентрирование органических компонентов атмосферных загрязнений было достигнуто с помощью сорбента Тенакс GC. Этот сорбент гидрофобен, так что концентрирование водяных паров минимально. Патроны с сорбентом после отбора образцов могут храниться при температуре 0°C в течение 4 недель без значительных изменений. Сорбированные соединения вводят в хроматографическую колонку путем термической десорбции.

Для определения альдегидов в образцах воздуха в присутствии углеводородов после их улавливания получают о-бензоил-оксипроизводные и анализируют методом ГХ-МС-ХИ (газ-реагент NH₃).

Большое внимание уделяется определению в различных объектах полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), обладающих канцерогенной активностью. Идентификация осуществляется по пикам молекулярных ионов, которые в спектрах ПАУ очень интенсивны.

Большое значение имеют ХМС-методы при изучении природных и синтетических органических соединений в водах, особенно в питьевых. Методы количественного определения основаны, как правило, на многоионном детектировании и получении масс-хроматограмм по полному ионному току и отдельным пикам, а также на использовании внутренних стандартов. С помощью ХМС достигается предел обнаружения углеводородов в образцах воды 1 нг/л для каждого соединения.

Для определения в питьевой воде органических примесей успешно используется также метод ЖХ-МС, в частности, при количественном анализе пестицида ротенона, применяемого для контроля размножения рыб. Метод ЖХ-МС обеспечивает быстрое, селективное и количественное определение ротенона.

Одним из компонентов загрязнений окружающей среды являются алкилбензолсульфонаты, входящие в состав синтетических моющих средств. ГХ-МС успешно используется для установления присутствия линейных алкилбензолсульфонатов в образцах природных вод.

Особенно полезная информация получена с использованием метода ХМС о структуре продуктов метаболизма пестицидов различной химической природы.

12.2.5. Сверхкритическая флюидная хроматография

12.2.5.1. Общая характеристика и возможности СФХ

Газовая и жидкостная хроматографии имеют определенные достоинства и недостатки и применяются для решения конкретных аналитических задач. Известно много веществ, которые не могут быть определены ни методом газовой (нелетучи), ни методом жидкостной хроматографии (отсутствует способ детектирования). В таких случаях возможно применение метода сверхкритической (субкритической) флюидной хроматографии (СФХ), в котором подвижной фазой является флюид (флюидная фаза).

Известно, что для любого вещества существует некоторая критическая температура и соответствующее ей критическое давление, при которых вещество не может существовать в жидком состоянии, т.е. критическая точка. Вещество вблизи критических температуры и давления находится в сверхкритическом (флюидном) состоянии. В таком состоянии вещества обладают свойствами, отличающимися от свойств газа и жидкости, т.е. занимают промежуточное положение. К основным свойствам вещества в сверхкритическом состоянии относятся вязкость,

плотность и коэффициенты диффузии. Например, сверхкритические флюиды имеют достаточно высокую плотность ($0,2-0,5 \text{ г/см}^3$), что позволяет использовать их для растворения некоторых нелетучих веществ большой молекулярной массы (нормальные алканы, имеющие от 5 до 40 атомов углерода, полициклические ароматические углеводороды).

В таблице 12.10 приведены характеристики некоторых сверхкритических флюидов, используемых в качестве подвижных фаз в СФХ.

Таблица 12.10

Критические величины некоторых подвижных фаз в СФХ

Флюид	Темп. $T_k, ^\circ\text{C}$	Давл. $P_k, \text{МПа}$	Плотн. $d_k, \text{г}\cdot\text{см}^{-3}$
CO_2	31,3	7,39	0,468
N_2O	36,5	7,27	0,457
NH_3	132,5	11,40	0,235
Метанол	239,4	8,10	0,272
н-бутан	152	3,80	0,228
Дихлордифторметан	111,8	4,12	0,558
Диэтиловый эфир	195,6	3,64	0,265

Из таблицы 12.10 видно, что величины критических температур и давлений находятся в пределах рабочих диапазонов для газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, что не требует значительных изменений в конструкции хроматографов.

Особенности свойств сверхкритических флюидов используют и для сверхкритической флюидной экстракции в процессе пробоподготовки. Например, в промышленности для извлечения кофеина из кофе и никотина из табака используется сверхкритическая флюидная экстракция.

Прибор для СФХ состоит из насосной системы, инжектора, хроматографической колонки, детектора, регулятора давления и регистрирующего устройства. В колонках флюидного хроматографа должны поддерживаться достаточные температура и давление, соответствующие сверхкритическому состоянию подвижной фазы. Необходимость высокой точности контроля давления в системе связана с тем, что плотность флюида в значительной степени зависит от величины давления. С повышением давления в колонке увеличивается плотность и элюирующая способность флюида, что и является причиной уменьшения времени удерживания. Например, повышение давления флюида CO_2 от 7 до 9 МПа приводит к уменьшению времени удерживания с 25 до 5 мин.

Постоянное давление поддерживается с помощью специальных устройств поддержания давления (рестрикторы). Для сброса давления служат устройства, называемые дросселями.

Из перечисленных в таблице флюидов наиболее часто применяется диоксид углерода, так как он не токсичен, не поглощает в УФ-области до 190 нм, не имеет запаха, не воспламеняется. Изменение свойств подвижной фазы возможно при добавлении некоторых модификаторов (метанол, диоксан, 2-пропанол, ацетонитрил и др.). Состав, давление, температура и скорость подвижной фазы могут быть как постоянными (изократическое, изотермическое элюирование), так и изменяться (градиентное элюирование модификатора, давления, температуры или скорости потока).

Неподвижная фаза может находиться в набивной или в капиллярной колонках. Набивные колонки имеют внутренний диаметр от 0,5 до 4,6 мм, длину до 25 см и содержат частицы размером от 3 до 10 мкм.

В капиллярных колонках, изготовленных из плавленого кварца, на внутренней поверхности находится тонкая жидкая пленка. Размер колонок: длина – 10–20 м, внутренний диаметр – до 10 мм, толщина слоя неподвижной фазы – от 0,05 до 1 мкм.

В СФХ в качестве детекторов применяются пламенно-ионизационные, фотометрические в УФ- и ИК-области, флуоресцентные, детекторы электронного захвата, катарометры и др. Условием применимости ПИД является низкая величина фонового сигнала, что характерно при использовании в качестве подвижной фазы CO_2 , N_2O или NH_3 . Масс-спектрометрическое детектирование в СФХ применяется более широко, чем в жидкостной, так как в СФХ технически проще реализовать сочетание хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования.

В СФХ достигаются более высокие скорости потоков подвижной фазы по сравнению с ВЭЖХ, так как вязкость и плотность флюидов меньше, чем жидкостей. Это приводит к сокращению времени анализа. Высокая чистота флюида позволяет получать методом СФХ более чистые фракции, чем в ВЭЖХ.

Сравнение зависимостей ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы (диоксид углерода) для ВЭЖХ и СФХ показывает, что при одной и той же скорости потока ВЭТТ для СФХ в 3 раза меньше, чем для ВЭЖХ. Чем меньше ВЭТТ, тем выше эффективность колонки и может быть достигнуто лучшее разделение. При одинаковых условиях хроматографические пики в СФХ в 3 раза уже, чем в ВЭЖХ.

Подвижная фаза в СФХ в отличие от газовой хроматографии не является инертной средой и взаимодействует с определяемым веществом. Для целенаправленного изменения величин коэффициентов селективности изменяют состав подвижной фазы.

Методом СФХ возможно определение веществ при более низких температурах, чем температуры испарения, так как в сверхкритических фазах вещества имеют более высокую растворимость. Этот факт позволяет методом СФХ определять синтетические и биологические полимеры, различные термически нестабильные соединения.

Сверхкритическая флюидная хроматография находит применение при анализе различных типов соединений: лекарственных средств, продуктов питания, взрывчатых веществ, нефти и др. Низкая вязкость сверхкритических флюидов позволяет проводить разделения методом СФХ значительно быстрее, чем методом жидкостной хроматографии.

12.3. Электрофорез

Электрофорез относится к электрохимическим методам разделения и основан на способности ионизированных частиц перемещаться под воздействием электрического тока.

12.3.1. Характеристика и применение электрофореза

Заряженные частицы под действием постоянного электрического тока двигаются к противоположно заряженному электроду. Скорость движения частиц выражается формулой:

$$u = zV / 6\pi r \eta \quad (12.23)$$

где u – скорость движения частицы; z – заряд частицы; V – напряженность электрического поля; r – радиус частицы; η – вязкость.

Скорость движения частиц не может служить характеристикой данного вида частиц, так как зависит от напряженности электрического поля. Поэтому введено понятие **электрофоретической подвижности** u_0 , которая равна отношению скорости движения частицы к напряженности электрического поля:

$$u_0 = u / V = z / 6 \pi r \eta \quad (12.24)$$

Электрофоретическая подвижность – это скорость перемещения вещества, измеряемая в сантиметрах в секунду, под влиянием градиента потенциала. Выражается в $\text{см}^2/\text{В}\cdot\text{с}$. Значимый результат измерения величины электрофоретической подвижности получается только в том случае, когда экспериментальные условия точно определены. Электрофоретическая подвижность зависит от природы вещества и проводящей жидкости, концентрации, рН и присутствия дополнительных растворителей.

Электрофоретическая подвижность частиц обратно пропорциональна вязкости среды. С повышением температуры вязкость среды уменьшается, поэтому подвижность частиц увеличивается. Значительное влияние на подвижность частиц оказывают ионная сила раствора (с повышением ионной силы подвижность частиц уменьшается).

Электрофоретическая подвижность может измеряться непосредственно или сравниваться с подвижностью стандартного образца.

Электрофоретическое разделение компонентов смеси происходит в жидкофазной среде, и такой метод похож на оформление плоскостных хроматографических методов, а также колоночной жидкостной хроматографии.

Неподвижная фаза – это растворитель (буферный раствор), а растворенное вещество мигрирует под действием электрического тока. Буферный раствор поддерживает постоянное значение pH и обеспечивает транспортный поток.

По технике выполнения различают **простой электрофорез** и **электрофорез на носителе**. Метод простого электрофореза предложен А. Тизелиусом (Нобелевская премия, 1948 г.) и основан на миграции ионов в буферном растворе. При работе по методу простого электрофореза в U-образную трубку помещают анализируемый и буферный растворы (рис. 12.17).

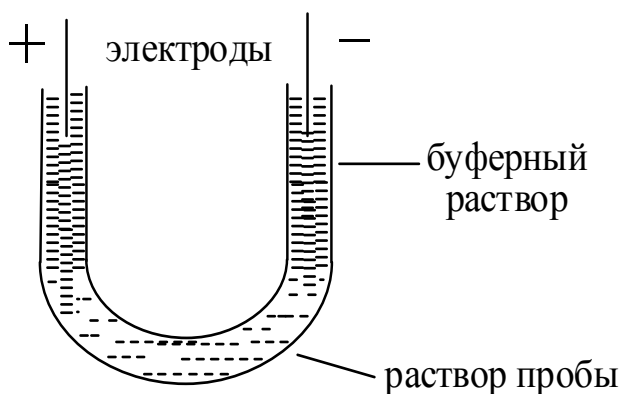


Рис. 12.17. Схема устройства для простого электрофореза

Буферный раствор имеет меньшую плотность и находится сверху. Разделяемые ионы разной химической природы при наложении постоянного электрического тока концентрируются вблизи поверхности раздела растворов (**электрофорез на границе раздела фаз**). Такой метод ещё называют фронтальным электрофорезом, применяется главным образом для анализа смесей белков и дает представление об истинной подвижности мигрирующих частиц.

Более полное разделение ионов происходит в методе электрофореза на носителе (рис. 12.18). Слой носителя (бумага, гель) пропитывают раствором инертного электролита. Вблизи одного из концов слоя носителя наносят исследуемый раствор в виде узкой полоски. Два конца носителя помещают в буферные растворы, в которые погружены электроды. При электролизе образуются зоны, соответствующие различным ионам исследуемого раствора. Такой метод известен как **метод зонного электрофореза**.

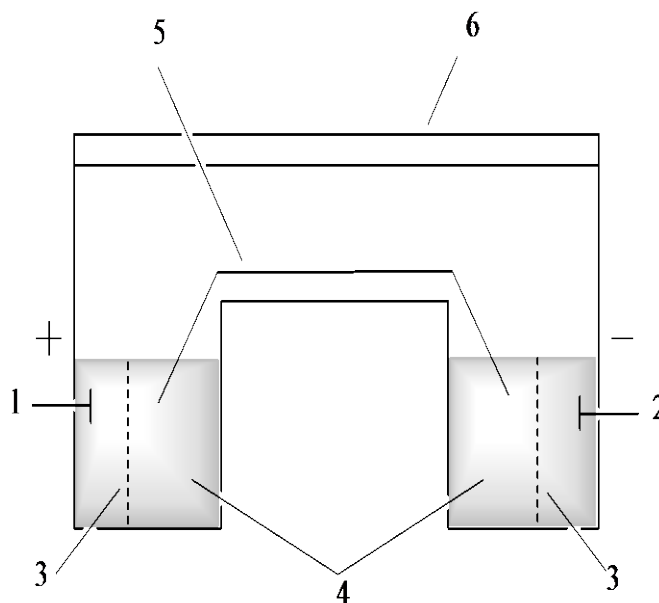


Рис. 12.18. Схема устройства для электрофореза на носителе: 1, 2 – электроды; 3 – диафрагма; 4 – буферные растворы; 5 – фильтровальная бумага; 6 – крышка

Скорость миграции ионов зависит от многих факторов: заряд и размер ионов, напряженность поля, вязкость среды. Напряженность возрастает с увеличением плотности тока, уменьшением площади сечения электрофоретической ячейки и электропроводности.

В методе зонного электрофореза миграция ионов осуществляется по поверхности или через объем неподвижного носителя (бумага, диски, колонки и др.). Процессы разделения проводят также в различных гелях (гель-электрофорез) на основе крахмала, агарозы, полиамидов.

Различают **низковольтный** (<1000 В) и **высоковольтный** (1000-10000 В) электрофорез. Высоковольтный электрофорез чаще проводят на бумаге, он дает хорошие результаты при анализе небольших молекул, например аминокислот.

В **методе изоэлектрического фокусирования** при определении амфолитов (аминокислоты, пептиды) буферной смесью создается градиент рН. Амфолиты при значении рН, соответствующем изоэлектри-

ческой точке, в электрическом поле не движутся. В этом методе достигается хорошее разделение для амфолитов, так как они мигрируют к изоэлектрической точке и концентрируются.

В методе **изотахофореза** («изос» – равный, «тахос» – скорость) скорость движения различных ионов в электрическом поле одинаковая. Разделение основано на использовании двух электролитов: один электролит содержит ион с максимальной (ведущий электролит), а второй – с минимальной (замыкающий электролит) электрофоретической активностью по сравнению с подвижностью ионов анализируемой смеси. Смесь разделяется на зоны индивидуальных компонентов, которые выходят в порядке понижения их электрофоретической активности. Для разделения и определения иммуноглобулина используют морфолинэтансульфонат с рН 9 в качестве ведущего раствора, а раствор аминокaproата с рН 10,8 – в качестве замыкающего.

Разделение смеси заряженных макромолекул, основанное на различии их зарядов, размеров, скорости миграции через гель, находящийся в электрическом поле, проводят методом геля-электрофореза. Селективное разделение молекул по размерам определяется свойствами матрицы геля. Макропористые гели агара и агарозы применяют в методе **иммуноэлектрофореза**. После электрофоретического разделения смеси белков обрабатывают раствором антисыворотки. Специфические антитела, содержащиеся в антисыворотке, взаимодействуют с индивидуальными компонентами белков с образованием линий осаждения, соответствующих определенному белку.

При введении радиоактивной метки в антигены повышается чувствительность метода, который получил название **радиоиммуноэлектрофорез**.

Тонкослойный электрофорез (ТСЭ) проводят на тонких слоях высокодисперсных сорбентов. В этом методе (аналогично ТСХ) применяются универсальные реагенты для обнаружения разделенных веществ. В качестве сорбентов для получения незакрепленного слоя используют тонкодисперсный силикагель, тонкогранулированную целлюлозу с добавкой небольшого количества сефадекса или крахмала для усиления гидрофильных свойств, что важно для сохранения влажности и улучшения прилипания слоя к подложке. Длительность разделения в зависимости от вида разделяемых смесей составляет от 20 до 120 мин.

Капиллярный электрофорез (КЭ) – это современный вариант электрофореза. По аналогии с ВЭЖХ его называют высокоэффективным капиллярным электрофорезом (ВЭКЭ). Этот метод сочетает в себе лучшие качества электрофореза и хроматографических методов.

Метод капиллярного электрофореза в отличие от классического электрофореза имеет особенность, связанную с наличием **электроосмотического (электроэндоосмотического) потока**, который возникает

ет в результате образования двойного электрического слоя между раствором и внутренней поверхностью капилляра.

При диссоциации силанольных групп, находящихся на внутренней поверхности кварцевого капилляра, внутренняя поверхность капилляра заряжается отрицательно и притягивает положительно заряженные противоионы. При наложении напряжения весь объем жидкости, находящейся в капилляре, двигается к отрицательно заряженному электроду (катоду). Такое движение и называется электроосмотическим потоком (ЭП). Электроосмотический поток вызывает дополнительное перемещение всего объема раствора к катоду. При этом положительно заряженные ионы двигаются к катоду с большей скоростью. Вместе с электроосмотическим потоком к катоду перемещаются и все незаряженные частицы. Относительно направления движения отрицательно заряженных частиц нет однозначного ответа. Направление движения таких ионов зависит от соотношения скоростей движения отрицательно заряженных ионов и электроосмотического потока. Если собственная скорость движения иона превышает скорость ЭП, то такой ион будет двигаться к аноду. В противном случае ион будет перемещаться к катоду вместе с электроосмотическим потоком, хотя и с меньшей скоростью. Детектор, установленный вблизи катода, будет регистрировать сначала катионы, затем нейтральные частицы и, наконец, некоторые анионы.

Скорость ЭП можно изменить (уменьшить, подавить, повернуть в противоположном направлении) путем соответствующей химической модификации внутренней поверхности капилляра. Применение алкилсилоксановых, фторалкильных, полиакриламидных покрытий уменьшает адсорбцию компонентов на поверхности капилляра и улучшает воспроизводимость результатов. Скорость электроосмотического потока в значительной степени зависит от величины рН раствора. Чем выше рН, тем больше скорость ЭП.

Разделение смеси ионов или нейтральных молекул в этом методе основано на их различной электрофоретической подвижности и распределении между раствором и движущимися заряженными частицами. Сущность метода состоит в том, что пробу (от 5 до 50 нл) обычно вводят на анодном конце кварцевого капилляра (длина 10–100 см, внутренний диаметр 25–100 мкм) и подают напряжение от 10 до 30 кВ (рис. 12.19).

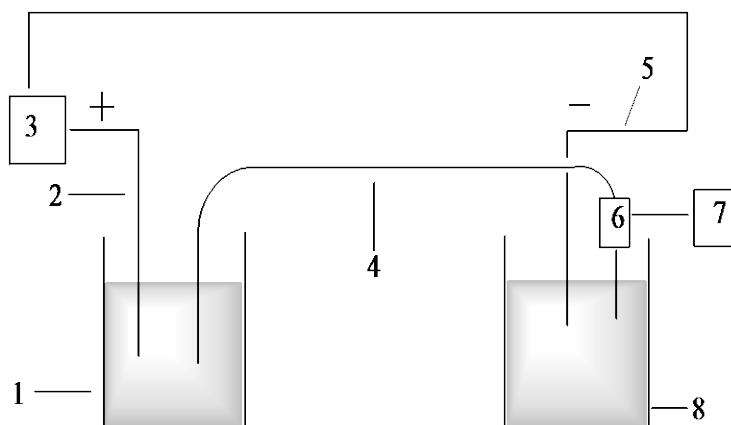


Рис. 12.19. Схема устройства для капиллярного электрофореза: 1 – сосуд для буферного раствора и пробы; 2, 5 – электроды; 3 – источник напряжения; 4 – капилляр; 6 – детектор; 7 – система регистрации данных; 8 – сосуд для буферного раствора.

Капилляр содержит буферный раствор, гель или раствор полимера. Положительно заряженные частицы анализируемых соединений передвигаются к катоду. Нейтральные и отрицательно заряженные частицы также передвигаются вместе с потоком жидкости, но значительно медленнее. При введении большого объема пробы наблюдается искажение пика и ухудшение разделения.

Введение пробы проводится двумя способами: гидродинамический и электрокинетический. В основе гидродинамического способа лежит создание разницы давлений между сосудом, в котором находится проба, и концом капилляра, т.е. либо повышают давление в сосуде, либо снижают давление на конце капилляра. В электрокинетическом способе сосуд соединяется с источником напряжения и под действием короткого импульса напряжения компоненты пробы перемещаются в капилляр.

Скорость передвижения компонентов пробы в электрическом поле по капилляру зависит от заряда, структуры, молекулярной массы разделяемых компонентов. Разделение заряженных ионов происходит благодаря их различной электрофоретической подвижности.

Детектор расположен вблизи противоположного конца капилляра. Детекция разделенных компонентов пробы осуществляется различными детекторами (спектрофотометрический, кондуктометрический, амперометрический, потенциометрический, масс-спектральный, флуоресцентный и др). Стандартным детектором является УФ-спектрофотометрический.

Метод детектирования выбирают в зависимости от химической природы и свойств определяемых веществ: потенциметрия – ионы щелочных и щелочно-земельных металлов, амперометрия – легкоокис-

ляемые и восстанавливаемые соединения, флуоресценция – аминокислоты, ДНК, производные аминокислот и др.

Идентификацию и количественное определение компонентов пробы производят с помощью полученной электрофореграммы, состоящей из последовательных пиков (рис. 12.20).

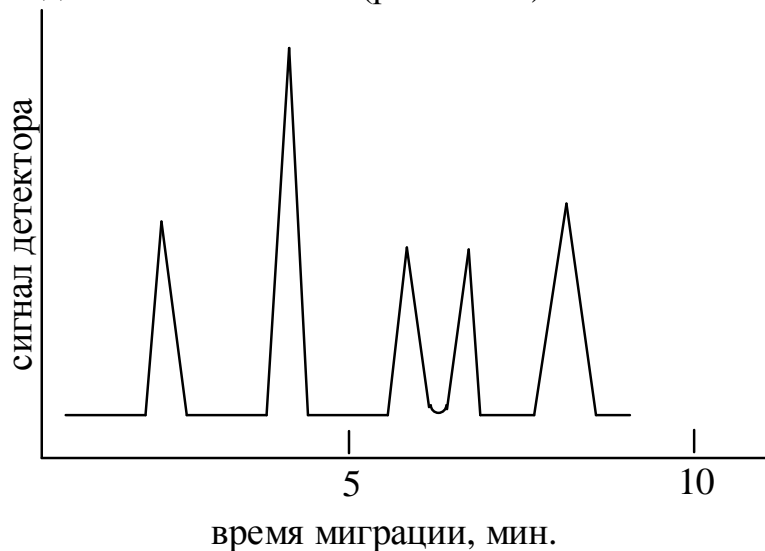


Рис. 12.20 Электрофореграмма

Расчет подвижности (u) частиц разделяемой смеси в капиллярном электрофорезе проводят по формуле:

$$U = (I/t)/(V/L) \quad (12.25)$$

где I – длина аналитического сегмента капилляра или эффективная длина капилляра (длина капилляра до детектора); L – общая длина капилляра; t – время движения частиц; V – напряжение.

Эффективность электрофоретического разделения методом КЭ выражается числом N (число теоретических тарелок) и зависит от приложенного напряжения:

$$N = (u_{эф}V)/2D \quad (12.26)$$

где $u_{эф}$ – сумма подвижности частиц смеси и подвижности за счет электроосмотического потока; D – коэффициент диффузии.

С повышением напряжения разделение происходит быстрее и пики становятся уже.

Основные достоинства капиллярного электрофореза: можно анализировать малые пробы, высокая эффективность разделения (число теоретических тарелок достигает 1000000), не требуются насосы высокого давления и происходит меньший расход высокочистых раствори-

телей по сравнению с ВЭЖХ. Однако метод КЭ менее чувствителен по сравнению с ВЭЖХ.

Разновидностями капиллярного электрофореза являются капиллярный ионный электрофорез (разделение ионных частиц в водных растворах), капиллярный гель-электрофорез (капилляр заполнен гелем), капиллярный просеивающий электрофорез (разделение происходит через полупроницаемую мембрану (сито) за счет разницы в размерах молекул (частиц)).

Дальнейший прогресс в развитии капиллярного электрофореза состоит в применении и сочетании с ним сверхчувствительных лазериндуцированных флуоресцентных детекторов, так как диаметры лазерного луча и кварцевого капилляра соизмеримы. Это позволяет определять следовые количества веществ в водных растворах.

Методом электрофореза можно разделять и незаряженные молекулы (**метод мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии – МЭКХ**). Такое название неслучайно. В этом методе разделение основано на распределении вещества между мицеллярной фазой (аналог подвижной фазы в хроматографии) и фазой раствора (неподвижная фаза в хроматографии). Метод МЭКХ, модифицированный добавлением сульфатированного β -циклодекстрина, применяется для анализа биологических жидкостей. Сущность метода состоит в том, что к буферному раствору добавляют детергент (например, додецилсульфат) и нейтральные молекулы распределяются между буфером и мицеллами в зависимости от их гидрофобности. Ядро мицеллы в водных растворах гидрофобно и может захватывать нейтральные молекулы. В связи с тем, что внешний слой мицелл заряжен в большинстве случаев отрицательно, поэтому мицелла в электрическом поле перемещается вместе с нейтральной молекулой анализируемого вещества.

Капиллярный электрофорез широко применяется для определения аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, лекарственных и наркотических веществ, пестицидов. Возможно определение лекарственных и наркотических веществ в плазме, сыворотке без предварительной подготовки с применением метода МЭКХ. Использование додецилсульфата в этом методе способствует разрушению белков и препятствует их налипанию на стенку капилляра.

12.4. Методы молекулярной спектроскопии

Методы молекулярной спектроскопии делят на молекулярно-абсорбционные и молекулярно-эмиссионные методы.

К важнейшим молекулярно-абсорбционным методам относятся спектрометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях, инфракрасная спектрометрия. Молекулярная флуоресценция, фосфоресцен-

ция и хемилюминесценция относятся к молекулярно-эмиссионным методам.

12.4.1. Молекулярно-абсорбционные методы

При комнатной температуре большинство молекул органических и неорганических веществ находится в основном электронном и колебательном состоянии. Взаимодействия веществ с электромагнитным излучением приводит к возникновению характеристических электронных, колебательных и вращательных переходов. Переход из возбужденных состояний в основное осуществляется испусканием фотонов либо путем безызлучательной релаксации.

Молекулярные спектры поглощения или испускания можно получить для веществ в различном состоянии (твердое, жидкое или газообразное).

Для идентификации веществ методами молекулярной спектроскопии требуются чистые вещества, поэтому эти методы комбинируют с методами разделения или хроматографическими методами.

12.4.1.1. Спектрометрия в видимой и ультрафиолетовой области спектра

Интенсивность светового луча (I_0) прошедшего через раствор уменьшается за счет поглощения образцом, отражения от стенок кюветы, а также за счет рассеяния на взвешенных частицах (рис. 12.21).

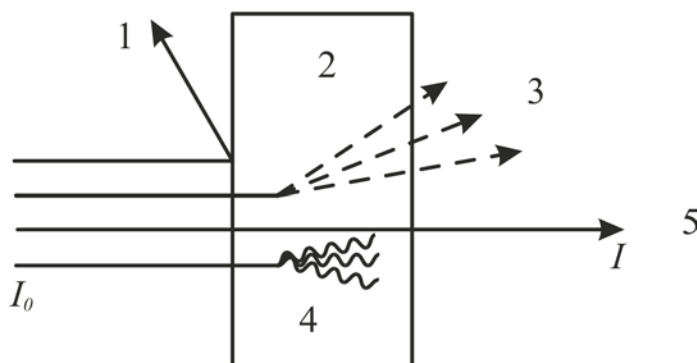


Рис. 12.21. Изменение начальной интенсивности (I_0) светового потока при прохождении через раствор.

1 – отражение; 2 – образец; 3 – рассеяние; 4 – поглощение; 5 – детектор.

Коэффициент пропускания (или просто «пропускание») T рассчитывается по формуле:

$$T = I/I_0 \quad \text{или} \quad T\% = I/I_0 \cdot 100\% \quad (12.27)$$

Оптическая плотность A (интенсивность полосы поглощения, поглощение, светопоглощение) пропорциональна числу поглощающих частиц в растворе и определяется по формуле:

$$A = -\lg T = \lg 1/T = \lg I/I_0 = \epsilon c l \quad (12.28)$$

где ϵ – коэффициент пропорциональности или молярный коэффициент поглощения (л/моль·см), зависит от природы вещества; c – концентрация (моль/л), l – толщина поглощающего слоя раствора в кювете (см).

Эту зависимость называют законом Бугера – Ламберта – Бера (Бугер и Ламберт обнаружили прямо пропорциональную зависимость оптической плотности от толщины слоя кюветы, а Бер установил зависимость оптической плотности раствора поглощающего вещества от его молярной концентрации).

Закон Бугера – Ламберта – Бера связывает уменьшение интенсивности светового потока, прошедшего через слой анализируемого вещества, с концентрацией вещества и толщиной слоя.

Закон Бугера – Ламберта – Бера является единой теоретической базой всех разновидностей спектрофотометрии.

Молярный коэффициент поглощения не зависит от концентрации и толщины слоя поглощающего раствора, может служить объективным критерием чувствительности фотометрического определения.

Распределение значений молярного коэффициента поглощения или оптической плотности по длинам волн (или частотам) называется спектром поглощения. По оси ординат откладывают оптическую плотность, логарифм оптической плотности, пропускание (в долях или в процентах), по оси абсцисс – длину волны, частоту, волновое число.

Например, в качественном анализе удобно представить спектр в координатах «молярный коэффициент поглощения – длина волны».

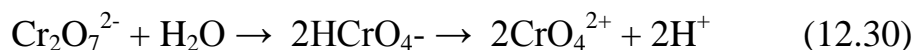
Появление полос поглощения обусловлено квантовой природой электромагнитного излучения и дискретностью энергетических состояний поглощающих частиц. При поглощении квантов света происходит увеличение внутренней энергии частицы, которая складывается из вращательной энергии частицы ($E_{вр}$), энергии колебания атомов ($E_{кол}$) и движения электронов ($E_{эл}$):

$$E = E_{вр} + E_{кол} + E_{эл} \quad (12.29)$$

Раствор, который не поглощает света, имеет пропускание, равное 100%, а оптическая плотность равна нулю. При полном поглощении света пропускание равно нулю, а оптическая плотность – бесконечности.

Линейная зависимость A от концентрации вещества в растворе выполняется в разбавленных растворах ($c \leq 0,1$ моль/л), так как при высокой концентрации поглощающих частиц между частицами происходят электростатические взаимодействия, что является причиной отклонения от закона Бугера – Ламберта – Бера. В разбавленных растворах электростатические взаимодействия незначительны. Вторая причина отклонения от закона Бугера – Ламберта – Бера при повышении концентрации связана с изменением коэффициента преломления среды. При высоких концентрациях значительно изменяется коэффициент преломления среды. Причины отклонения, связанные с изменением в окружении поглощающих частиц при повышении концентрации, относят к истинным причинам.

Причинами отклонения от основного закона светопоглощения могут быть и побочные реакции определяемого вещества как между собой (ассоциация, диссоциация), так и с растворителем. Такие отклонения относят к химическим отклонениям. Например, при разбавлении раствора дихромата калия не только уменьшается концентрация дихромат-ионов, но и происходят химические реакции:



В растворе появляются гидрохромат- и хромат-ионы, которые имеют различные молярные коэффициенты поглощения и соответственно зависимость оптической плотности от общей концентрации хрома в растворе будет отклоняться от линейной.

При использовании немонахроматического света также могут наблюдаться отклонения концентрационной зависимости оптической плотности от линейности.

Обычно немонахроматичность приводит к отрицательным отклонениям.

УФ-спектрометрия: при облучении УФ-светом изменяются все три вида энергии молекулы (энергия электронной оболочки, колебательная и вращательная энергии). Поэтому электронные спектры многоатомных молекул весьма сложны и представляют собой широкие перекрывающиеся полосы поглощения. Форма и интенсивность полос поглощения являются дополнительными тестами при идентификации органических соединений в химико-токсикологическом анализе. Для проведения идентификации веществ по УФ-спектрам необходима предварительная очистка анализируемых веществ (ТСХ, рекстракция). В зависимости от поведения органических веществ в УФ-области различают 3 группы:

- 1) не имеющие характерного поглощения в области 200–400 нм;

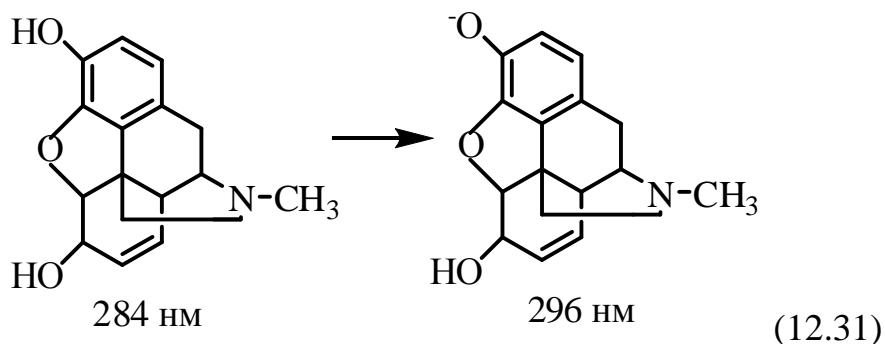
2) имеющие характерные полосы поглощения, которые не изменяются при разных значениях рН;

3) имеющие характерные полосы поглощения, которые изменяются в зависимости от рН.

К первой группе относятся органические соединения, в молекулах которых все связи одинарные и возможны переходы типа $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Такие переходы осуществляются в вакуумной УФ-области (менее 180 нм). К таким соединениям относятся пахикарпин, кониин и др. Например, пахикарпин в УФ-области не имеет характерных полос поглощения, так как молекула пахикарпина содержит только одинарные σ -связи. Электронный переход с σ -связывающей на σ -разрыхляющую орбиталь ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) требует большой затраты энергии и находится вне рабочей УФ-области.

В молекулах органических веществ второй группы имеются хромофоры, не сопряженные с ауксохромными группами. Среди веществ этой группы можно отметить стероиды, соединения с бензольным кольцом. Электронный спектр бензола имеет три максимума малой интенсивности (252, 258, 263 нм), которые не изменяются при разных значениях рН. К этой группе относятся атропин, эфедрин и др. Интенсивность полос поглощения этих соединений в УФ-области незначительная (удельный показатель поглощения не превышает 10). По характеру поглощения в УФ-области спектра кодеин и героин относится ко второй группе (специфическое поглощение в УФ-области не изменяется в зависимости от рН), а морфин относится к третьей группе (УФ-спектр изменяется в зависимости от рН раствора).

Молекулы соединений третьей группы содержат хромофоры и сопряженные с ними ауксохромы. При ионизации таких молекул полосы поглощения смещаются батохромно или гипсохромно. Например, при подщелачивании раствора морфина наблюдается батохромное смещение максимума спектра (от 284 нм до 296 нм):



Анализируя структуру морфина, можно отметить, что в молекуле морфина имеются σ - и π -связи, а также ауксохромная группа $-\text{OH}$ (фенольный гидроксил), содержащий неподеленную пару электронов.

Поэтому в такой молекуле возможны электронные переходы – $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$, что и обуславливает поглощение морфина в УФ-области, которое изменяется в зависимости от рН среды.

В качестве примера соединений, изменяющих поглощение в зависимости от рН раствора, можно отметить барбитураты, производные 1,4-бензодиазепина. Отсутствие специфического поглощения кислых растворов барбитуратов и наличие характерных полос поглощения щелочных растворов позволяет проводить идентификацию и количественное определение барбитуратов методом УФ-спектрометрии.

В УФ-области светопоглощение молекул связано с возбуждением электронов, находящихся в различных состояниях: n -, σ -, π - электронов (в органических веществах), d -, f - электронов в ионах металлов, а также с электронными переходами с переносом заряда (в комплексах).

$\sigma\rightarrow\sigma^*$ – переходы характеризуются большими изменениями энергии и наблюдаются в основном в вакуумной УФ-области. Применение вакуумных спектрометров не представляет значительного интереса.

$n\rightarrow\sigma^*$ – переходы происходят в более длинноволновой области спектра по сравнению с $\sigma\rightarrow\sigma^*$ – переходами.

Наибольшее значение для аналитических целей имеют $n\rightarrow\pi^*$ и $\pi\rightarrow\pi^*$ – переходы. Они имеют наибольшую интенсивность и находятся в наиболее длинноволновой области по сравнению с переходами других типов.

Соединения, имеющие полосы переноса заряда (ППЗ), также имеют практическое значение. ППЗ возникают при взаимодействии атомов-донора и акцептора электронов. Примерами могут служить многие комплексы ионов металлов с органическими реагентами.

При введении различных заместителей в молекулу или изменении условий (растворитель) проведения реакции наблюдается сдвиг полосы поглощения. Если полоса поглощения смещается в сторону более длинных волн, то говорят о батохромном смещении, а если полоса поглощения смещается в сторону более коротких волн – это гипсохромный сдвиг.

Для получения спектров в УФ(190–400 нм) и видимом (400–750 нм) диапазоне применяют спектрофотометры (спектрометры), включающие полихроматический широкополосный источник спектра, монохроматор (дифракционные решетки), кювета с исследуемым образцом, детектор, электронные устройства и компьютер. В качестве источника сплошного спектра в диапазоне 200–400 нм обычно используют дейтериевые лампы, а в области 400–2500 нм – вольфрамовые или галогеновые лампы. Стеклокюветы прозрачны в видимой области, кварцевые кюветы прозрачны для работы в УФ – видимом диапазоне. Кюветы бывают прямоугольные и цилиндрические.

В качестве детектора используют фотоумножители или фотоэлементы (сурьмяно-цезиевые в диапазоне 180–650 нм и кислородно-цезиевые в диапазоне 600–1100 нм). В спектрометрах с быстрой регистрацией применяют массивы фотоэлементов или фотодиодов (диодные линейки).

Приборы, в которых для монохроматизации используют монохроматоры, – спектрофотометры. Если для выделения необходимого интервала длин волн используют светофильтр, то такие приборы называют фотоэлектроколориметрами. С помощью спектрофотометров получают спектры поглощения, измеряют оптическую плотность растворов веществ с узкой полосой поглощения или веществ с близкими длинами волн поглощения. В методах молекулярной спектрометрии измеряют разность оптических плотностей анализируемого раствора и раствора сравнения. Раствором сравнения может быть растворитель или раствор определяемого вещества с известной концентрацией (дифференциальный метод).

Спектрофотометрическое определение вещества можно проводить как непосредственно, так и после обработки пробы специальным реагентом. Многие органические вещества имеют в УФ-области полосы поглощения с высокими значениями молярных коэффициентов поглощения. Без реагентов спектрофотометрическим методом определяют различные окрашенные органические и неорганические вещества (перманганаты, дихроматы и др.).

Спектрофотометрическое определение бесцветных неорганических и органических веществ основано на переведении их в окрашенные соединения. Для этого используют как неорганические, так и органические реагенты, применяемые также и в качественном анализе.

Органические реагенты находят более широкое применение. Окраска комплексных соединений ионов металлов с органическими реагентами обусловлена как электронными, $n \rightarrow \pi^*$ или $\pi \rightarrow \pi^*$ – переходами в молекулах реагентов, так и переходами с переносом заряда.

Чувствительность спектрометрических определений зависит как от молярного коэффициента поглощения определяемого вещества, так и от величины фонового сигнала.

Спектрофотометрический метод по сравнению с методами атомной спектрометрии менее селективен. Улучшить селективность спектрометрических определений можно применением маскирующих веществ, выбором оптимального значения рН, сочетанием спектрометрического анализа с методами разделения (экстракция и ионообменная хроматография).

Основными недостатками метода УФ-спектрометрии являются отсутствие у некоторых соединений максимума поглощения в УФ-области, значительное влияние природы растворителя на характер спектра поглощения.

Предложенные математические методы, позволяющие проводить одновременное определение нескольких компонентов, образующих с реактивом комплексы, спектры поглощения которых перекрываются. Эти методы основаны на измерении оптической плотности смеси при нескольких длинах волн и решении системы уравнений, составленных на основании закона Бугера – Ламберта – Бера. Величины всех входящих в эту систему молярных коэффициентов поглощения должны быть известны. Наиболее известным математическим методом анализа многокомпонентных систем является метод Фирордта.

12.4.1.2. ИК-спектрометрия

Из методов молекулярно-абсорбционной спектрометрии в качественном анализе преимущественно используется ИК-спектрометрия.

ИК-спектрометрия основана на регистрации поглощения излучения вследствие колебания и вращения молекул. Колебательное движение молекул принимают равным сумме колебаний отдельных атомов в молекуле или группе. Если составляющие амплитуды не слишком велики, то такие простые колебания называют нормальными.

Нормальные колебания атомов делят на валентные и деформационные. Возникновение валентных колебаний происходит вследствие изменения межатомного расстояния в направлении химической связи между атомами. Деформационные колебания связаны с изменением величины валентных углов, при этом межатомные колебания не изменяются. Валентные и деформационные колебания осуществляются в симметричном и несимметричном вариантах.

В ИК-спектрометрии выделяют три спектральных диапазона (таблица 12.11).

Таблица 12.11
Спектральные диапазоны, используемые в ИК-спектрометрии

Диапазон	Длина волны, нм	Волновое число, см ⁻¹
Ближний ИК	800-2500	12500-4000
Средний ИК	2500-25000	4000-400
Дальний ИК	2500-100000	400-10

Главная особенность ближнего ИК-диапазона – отсутствие перекрывания полос и выполнение закона Бугера – Ламберта – Бера для слабых обертонов. Ближняя ИК-область применяется главным образом для количественного анализа. В этой области определяют основные компоненты пищевых продуктов (белки, крахмал, жиры), при этом не

требуется сложная пробоподготовка. Спектры в ближней ИК-области в отличие от средней не позволяют делать полных выводов о строении вещества.

Большинство групповых колебаний и «отпечатки пальцев» проявляются в среднем ИК-диапазоне. Для количественного анализа эта область редко применяется (небольшая чувствительность детекторов, нелинейная связь между оптической плотностью и концентрацией и др.)

При анализе органических соединений наиболее часто используется средний ИК-диапазон, в котором располагаются длины волн большинства нормальных колебаний (характеристические частоты и «отпечатки пальцев»). В среднем ИК-диапазоне выделяют четыре области:

3700–2900 см^{-1} (проявляются валентные колебания связей атомов водорода с атомами O, N, S и C);

2500–1900 см^{-1} (область тройных связей, например, полосы поглощения групп $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$);

1900–1300 см^{-1} (область двойных связей: проявляются валентные колебания связей $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{N}$);

менее 1300 см^{-1} (область «отпечатков пальцев»). Спектр поглощения в области «отпечатков пальцев» является индивидуальной характеристикой соединения.

Исследование структуры хелатов металлов и других соединений, содержащих тяжелые или слабосвязанные атомы проводят в дальнем ИК-диапазоне. Дальний ИК-диапазон используют также для изучения колебаний кристаллической решетки неорганических соединений ионной структуры, а также для исследования скелетной структуры органических молекул.

Колебательные переходы возбуждаются ИК-излучением, при этом время жизни возбужденных состояний примерно 10^{-6} с.

Схема обычного спектрометра не отличается от общей схемы оптического спектрометра.

В качестве источника для среднего диапазона ИК-области в основном используют штифты Нернста, изготовленные из оксидов иттрия и циркония, и стержни из карбида кремния («глобары») при нагревании электрическим током до 1100 °С.

В среднем диапазоне (1100–900 см^{-1}) эффективно применение лазерных источников (CO_2 -лазер и перестраиваемый диодный лазер на PbS). ИК-лазеры имеют в 100 раз большую интенсивность по сравнению с обычными излучателями, что позволяет определять с низким пределом обнаружения экологически важные соединения (например, хлорированные углеводороды).

Для работы в дальней ИК-области используют ртутные дуговые источники, а в ближнем ИК-диапазоне используют вольфрамовые лампы накаливания.

Колебательно-вращательные спектры весьма характерны, так как полосы при некоторых частотах соответствуют колебаниям отдельных групп атомов или отдельным атомам в молекуле. Такие частоты называют характеристическими. По характеристическим частотам можно установить наличие определенных групп атомов в молекуле, что позволяет судить о качественном составе вещества. Например, обнаружение характеристических полос в области $3000\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ указывает на наличие ОН- и NH-групп в молекуле анализируемого вещества.

В таблице 12.12 представлены характеристические частоты некоторых групп. Наличие атомов тяжелых элементов (Cl, Br, I) снижает характеристические частоты. Для групп, содержащих легкие ($-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $=\text{C}=\text{O}$ и др.) элементы, характерны высокие частоты.

Таблица 12.12

Характеристические частоты валентных колебаний некоторых функциональных групп

Функциональная группа	Диапазон частот, см^{-1}	Функциональная группа	Диапазон частот, см^{-1}
$-\text{OH}$	3200-3650	$-\text{COO}^-$	1590-1600
$>\text{N}-\text{H}$	3300-3500	$>\text{C}=\text{C}<$	1500-1660
$-\text{SH}$	2550-2600	$>\text{C}=\text{N}-$	1520-1690
$-\text{NH}_2$	3400	$>\text{C}=\text{O}$	1690-1760
$\equiv\text{C}-\text{H}$	3300	$\equiv\text{C}-\text{F}$	1050
$=\text{CH}_2$	3030	$\text{>C}-\text{Cl}$	725
$-\text{CH}_3$	2870-2970	$\text{>C}-\text{Br}$	650
$-\text{C}\equiv\text{N}$	2250	$\text{>C}-\text{I}$	550
$-\text{NO}_2$	1300-1370		

ИК-спектры более сложные, чем электронные. Электронный спектр состоит обычно из одной или нескольких широких полос в УФ или видимой области спектра.

Имеются атласы и таблицы инфракрасных спектров. Возможно также сопоставление ИК-спектров анализируемого вещества и стандартного («подозреваемого») вещества.

ИК-спектрометрия находит применение и в качественном анализе неорганических веществ. Например, характеристические частоты SO_4^{2-} , NO_3^- , $-\text{CO}_3^{2-}$ и NH_4^+ соответственно составляют 1130, 1380, 1450 и 3300 см^{-1} .

Основными правилами идентификации органических и неорганических веществ по характеристическим частотам отдельных групп являются:

- использование чистых веществ для регистрации ИК-спектров;
- отсутствие характеристической полосы является надежным доказательством отсутствия искомой атомной группы;
- результаты, полученные методом ИК-спектроскопии, необходимо сравнивать с данными других методов;
- в ИК-спектре не все полосы можно интерпретировать.

Значительно реже в качественном анализе применяются электронные спектры, так как они обычно состоят из небольшого числа широких полос поглощения, которые к тому же полностью или частично перекрываются. Идентификация веществ на основании их спектров в видимой и УФ-областях практически невозможно, хотя каждое соединение и обладает достаточно характерным спектром поглощения. Поглощение квантов излучения видимой и УФ-областей связано с наличием в молекулах органических соединений определенных групп атомов. Например, карбоксильная (-COOH), азо-(-N=N-) , нитрозо-(-N=O), нитро-(-NO₂) и другие группы.

В качестве детекторов применяют пироэлектрические детекторы на основе триглицеринсульфата (ТГС) и детекторы по фотопроводимости на основе теллуридов кадмия и ртути (КРТ). ТГС-детекторы применяют в среднем и дальнем диапазонах, а КРТ-детекторы – в нескольких областях среднего диапазона. Наибольшей чувствительностью обладают германиевые болометры при работе в дальней ИК-области, при работе в дальней ИК-области используют и протонные детекторы на основе сульфата свинца.

Основные отличия ИК-спектрометров от спектрометров в УФ/видимой области состоит в том, что ячейка с образцом помещается перед монохроматором.

Методами ИК-спектрометрии можно анализировать твердые, жидкие и газообразные образцы.

При работе в среднем ИК-диапазоне используют окна, изготовленные из KCl и NaBr, в дальнем ИК-диапазоне – окна из CsCl и полиэтилена, а в ближнем ИК-диапазоне – кварцевые или стеклянные кюветы.

В качестве растворителей для получения анализируемых растворов используют растворители с максимальными диапазонами прозрачности – тетрахлорметан, сероуглерод, хлороформ.

При подготовке твердых образцов наиболее распространенным способом является приготовление таблеток из бромиды калия (1 мг образца смешивают с 200 мг бромиды калия, смесь измельчают и прессуют).

Спектры в обычных ИК-спектрометрах регистрируются последовательно (сначала излучение фокусируется на щель, а затем изображение этой щели проектируется на детектор). Фурье-спектрометры позволяют получать всю информацию о спектре в форме интерферограммы. С помощью метода Фурье-спектроскопии можно быстро записать весь спектр в ИК-, микроволновой и даже радиочастотной областях. Кроме того, чувствительность Фурье-спектрометрии значительно выше.

12.4.1.3. Метрологические характеристики молекулярно-абсорбционных методов

Основными метрологическими характеристиками спектрофотометрического метода являются правильность, воспроизводимость, чувствительность, предел обнаружения, селективность, диапазон определяемых концентраций.

Правильность характеризуется систематическими погрешностями, которые бывают методические и инструментальные.

Методические погрешности возникают на стадиях пробоотбора и пробоподготовки, а также при выполнении методик анализа.

Причинами инструментальных погрешностей могут быть погрешности регистрирующей системы прибора; недостаточная монохроматизация излучения, которая чаще всего проявляется при работе на фотоэлектроколориметрах.

Используют различные способы проверки правильности: способ «введено-найдено», анализ стандартных образцов, анализ образца другими методами, которые дают заведомо правильные результаты.

Воспроизводимость оценивают с помощью относительного стандартного отклонения (хорошая воспроизводимость характеризуется малой величиной S_r).

Воспроизводимость обуславливают случайные погрешности, причиной которых в спектрометрии могут быть погрешности при подготовке анализируемых растворов, влияние посторонних компонентов, кюветная погрешность (чистота кювет, различия в их толщине, невозможные их положения в кюветодержателе), погрешности настройки регистрирующей системы и др.

Следует иметь в виду, что не все значения оптической плотности можно измерить с одинаковой погрешностью. Минимальная погрешность наблюдается при $A = 0,4343$ ($T = 36,8\%$). Поэтому для практических целей рекомендуется оптимальный диапазон измерения светопоглощения ($0,1 \leq A \leq 1,0$ при работе на спектрофотометрах и $0,1 \leq A \leq 0,7$ – на фотоколориметрах).

Чувствительность характеризуется коэффициентом чувствительности, который соответствует углу наклона линейного градуиро-

вочного графика. Более чувствительной является та методика, для которой значение первой производной градуировочной функции выше.

Предел обнаружения – это наименьшая концентрация, которую можно отличить от сигнала контрольного опыта и которая соответствует оптической плотности, равной трем стандартным отклонениям оптической плотности контрольного опыта.

$$C_{\min} = 3S_{\text{к.о.}} / \epsilon l$$

Предел обнаружения является качественной характеристикой. В количественном анализе обычно используется предел определения, который рассчитывается как и предел обнаружения, но с более высокой надежностью регистрации аналитического сигнала ($10 S_{\text{к.о.}}$).

В количественном анализе важной характеристикой является **диапазон определяемых содержаний**: нижняя (c_n) и верхняя (c_v) границы определяемых содержаний. Считают, что нижняя граница определяемых содержаний – это минимальное содержание, которое может быть определено с погрешностью, не превышающей заданную ($S_N \leq 0,33$).

Верхняя граница определяемых содержаний ограничена возможностями прибора (современные приборы регистрируют A до значения 2,5). Если допустить, что c_n соответствует $A = 0,01$, а толщина кюветы изменяется в пределах 0,1–10 см, то диапазон определяемых содержаний охватывает 3–4 порядка.

Для оценки **селективности** фотометрического определения исследуют зависимость $A = f(c_{\text{примеси}})$ для трех концентраций вещества (крайние и среднее значения концентраций динамического диапазона). Соотношение концентраций примесей и определяемого вещества изменяется в широких пределах (от 0,1 до 1000). Предельной концентрацией примеси является концентрация, при которой наблюдается относительное изменение оптической плотности, не превышающее 5%.

12.4.1.4. Количественный анализ

Из закона Бугера – Ламберта – Бера следует, что основными параметрами молекулярно-абсорбционной спектроскопии являются длина волны, оптическая плотность, толщина кюветы и ионизация анализируемого раствора. При количественном определении учитывают и химические факторы, связанные с концентрацией реагентов, полнотой и условиями протекания фотометрической реакции и т.д.

Измерение оптической плотности обычно проводят при длине волны, соответствующей максимуму полосы поглощения.

При значении оптической плотности 0,435 достигается наибольшая точность измерений. Фотометрическое исследование растворов, имеющих $0,03 \geq A > 1,8$ характеризуется большими погрешностями.

Особое внимание уделяется постоянству рН в растворах, анализ которых основан на образовании комплексных соединений с органическими и неорганическими реагентами. Например, салициловая кислота с ионами железа (III) способна образовывать комплексы различного состава и окраски: при рН 2–3 образуется фиолетовый моносалицилат FeSal^+ , при рН 4–7 – красный дисалицилат FeSal^{2-} , а при рН 8–11 – желтый трисалицилат FeSal_3^{2-} . Поэтому для максимального выхода определенного комплекса необходимо создать определенное значение рН раствора.

Точность фотометрических определений зависит от особенностей фотометрической реакции, характеристик прибора и др. факторов. Погрешность спектрометрических методов обычно составляет 3–5%, уменьшаясь в благоприятных случаях до 1–2%.

Основными способами определения концентрации по оптической плотности являются градуировочный график, метод добавок, дифференциальный метод. Выбор метода зависит от многих факторов: свойства определяемого вещества, наличие примесей, возможности прибора и др.

В **дифференциальной фотометрии** поглощение исследуемого и стандартного растворов измеряют относительно раствора сравнения, содержащего точно известное количество определяемого вещества. При этом концентрация поглощающего вещества в растворе сравнения должна быть близка к концентрации вещества в анализируемом растворе. Известно несколько разновидностей дифференциальной фотометрии: метод отношения пропусканий (метод высокого поглощения), метод предельной точности и метод анализа следов (метод низкого поглощения).

При использовании дифференциального метода определения значительно (~ в 2–5 раз) повышается воспроизводимость результатов фотометрического определения.

Значительно улучшаются возможности фотометрического метода при анализе смесей поглощающих компонентов с применением метода **производной спектрометрии**. Если в смеси находятся два компонента оптические характеристики которых различаются незначительно, то по суммарному эффекту невозможно сделать адекватный вывод. Построение «производного» спектра в координатах « $d^2A/d\lambda^2 - \lambda$ » позволяет разрешить искомые полосы компонентов смеси и в определенных условиях амплитуды сигналов находятся в линейной зависимости от содержания компонентов в смеси. Такой анализ возможен на современных спектрофотометрах, в которых дифференцирование функций, описывающих спектры поглощения, выполняет компьютер. Современные высококласные спектрофотометры позволяют получать производные спектров до 8–9 порядков.

12.4.2. Молекулярно-эмиссионные методы

К молекулярно-эмиссионным методам относятся люминесцентные, основанные на флуоресценции, фосфоресценции и хемилюминесценции. Объединяет эти методы общий принцип, на котором они основаны: измерение эмиссионных спектров в результате перехода молекул из возбужденных в основные состояния.

Свойство веществ излучать свет под действием различных возбуждающих факторов называется **люминесценцией**. Существуют различные классификации люминесценции. В зависимости от способа возбуждения различают такие виды люминесценции: флуоресценция (возбуждение молекул ультрафиолетовым или видимым светом); катодлюминесценция (катодные лучи); рентгенолюминесценция (рентгеновские лучи); хемилюминесценция (энергия химической реакции); биолюминесценция – это хемилюминесценция в живом организме; электролюминесценция (электрический ток). Примером радиолюминесценции может быть светящийся циферблат часов, свечение возникает под действием частиц высоких энергий – продуктов распада радиоактивных примесей к фосфору.

Наиболее полно процессы люминесценции отражены в классификации по механизму возникновения свечения: свечение дискретных центров и рекомбинационное свечение. Под свечением понимают свечение, когда поглощают и излучают свет одни и те же частицы (атомы, ионы или молекулы). В рекомбинационных процессах свечения акты поглощения и излучения разделены не только по времени, но и пространственно. Этот вид свечения является основным для кристаллофосфоров (сложные кристаллические вещества с дефектной структурой). Возникновение дефектной структуры связано с присутствием примесных атомов (активаторов).

12.4.2.1. Флуоресценция и фосфоресценция

На рис. 12.22 показана схема возникновения люминесценции.

При поглощении энергии молекулы переходят в возбужденные состояния. Затем в течение 10^{-6} – 10^{-9} с электроны перераспределяются по колебательным подуровням и излучаются кванты света в результате перехода электронов с наиболее вероятного возбужденного уровня на нормальные уровни основного состояния. Такой процесс излучательно-го перехода с низшего возбужденного синглетного состояния в основное ($S_1 \rightarrow S_0$) называют флуоресценцией.

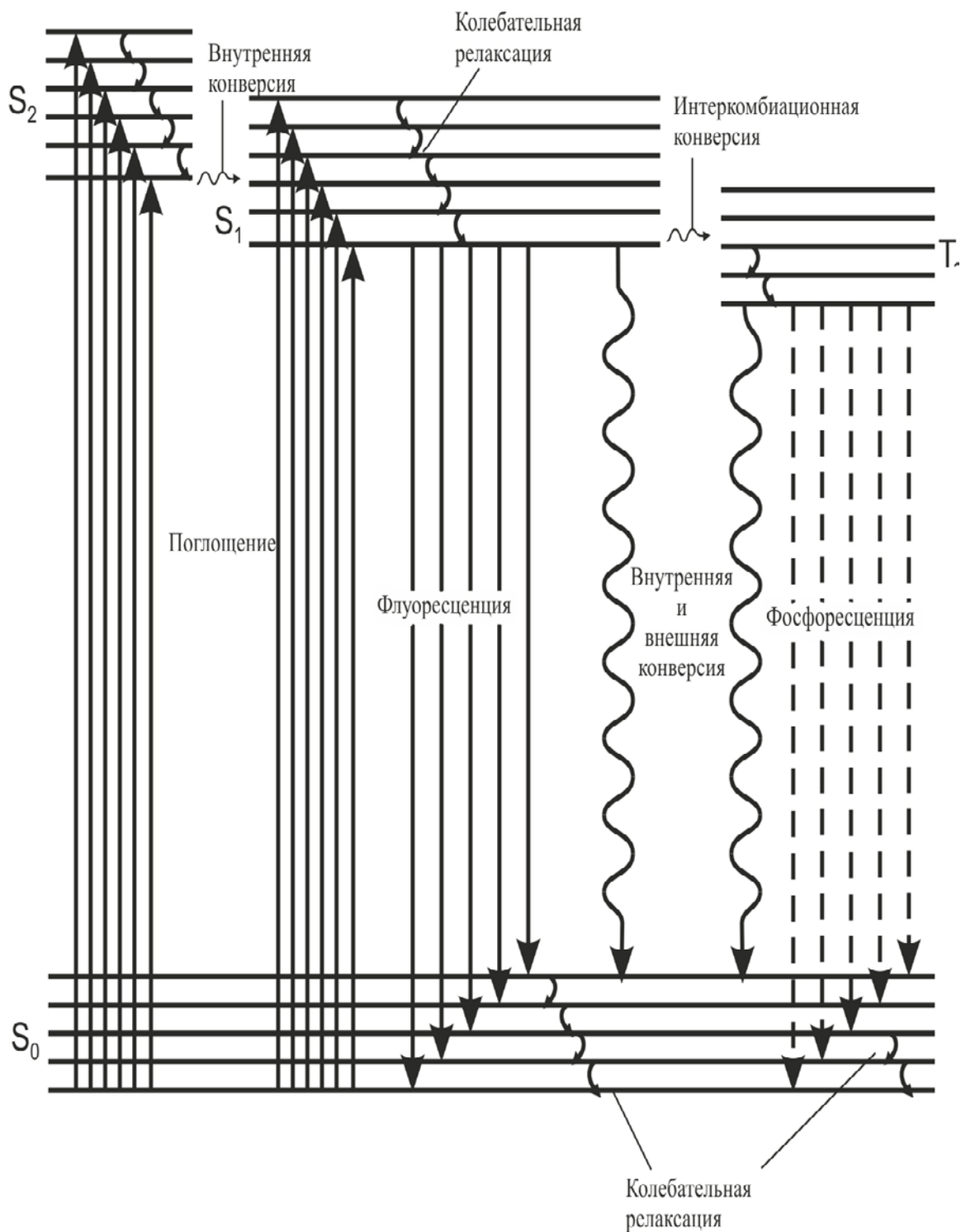


Рис.12.22 Диаграмма молекулярных энергетических уровней.

Если два электронных уровня близки по энергии, то возможна внутренняя конверсия ($S_2 \rightarrow S_1$).

При столкновении возбужденных молекул с молекулами газов может наблюдаться **тушение** (уменьшение) флуоресценции, т.е. безызлучательный перенос энергии (внешняя конверсия).

В некоторых случаях путем интеркомбинационной конверсии (изменение спина при изменении электронного состояния) происходит заселение триплетных состояний (т.е. переход $S_1 \rightarrow T_1$). Дезактивация молекул в этих случаях происходит либо в результате колебательной релаксации, либо путем фосфоресценции ($T_1 \rightarrow S_0$, от 10^{-4} до 10 с). Для осуществления фосфоресценции необходима предварительная интеркомбинационная конверсия.

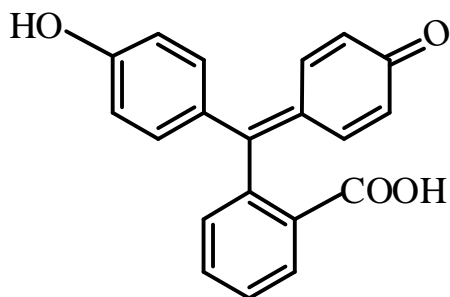
Спектр фосфоресценции лежит в области больших длин волн, чем флуоресценции. Переход из триплетного состояния в основное синглетное возможен при столкновении возбужденной частицы с окружающими молекулами за счет безызлучательных переходов внутренней конверсии. Вероятность такого перехода очень велика. Поэтому в аналитических целях для наблюдения фосфоресценции пробу замораживают при температуре жидкого азота (77 К), что сводит до минимума вероятность безызлучательных переходов.

Фосфоресцентный спектрометр в отличие от флуоресцентного спектрометра включает в себя устройство для охлаждения пробы до температуры жидкого азота. Поэтому фосфоресценция в количественном анализе используется редко. Предложены методики фосфоресцентного определения пестицидов, аминокислот, нуклеиновых кислот.

При люминесценции часть энергии выделяется в виде тепла. Поэтому энергия излучаемых квантов будет меньше энергии возбуждающего света и соответственно длина волны люминесценции больше, чем длина волны возбуждающего света. Эта зависимость известна как правило Стокса – Ломмеля: спектр люминесценции всегда смещен в сторону более длинных волн по сравнению со спектром поглощения.

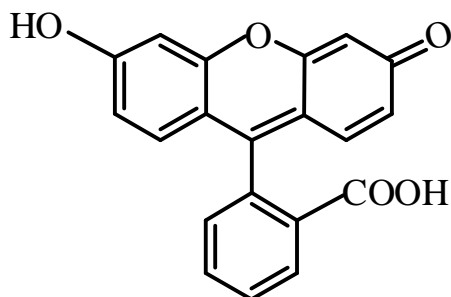
При переходе молекул в возбужденное состояние силы внутримолекулярного взаимодействия и относительное расположение уровней энергии основного и возбужденного состояний не изменяются. Поэтому имеет место зеркальная симметрия спектров поглощения и флуоресценции, изображенных в функции частот, относительно прямой, проходящей перпендикулярно оси частот через точку пересечения обоих спектров (правило Левшина).

Способность флуоресцировать связана со структурой органических соединений. Флуоресценция отсутствует во всех случаях, если две части молекулы с цепочкой конъюгированных связей не жестко связаны друг с другом. Например, сравним структурные формулы не флуоресцирующих при комнатной температуре фенолфталеина и малахитового зеленого с формулами ярко флуоресцирующих молекул флуоресцеина и родамина С.



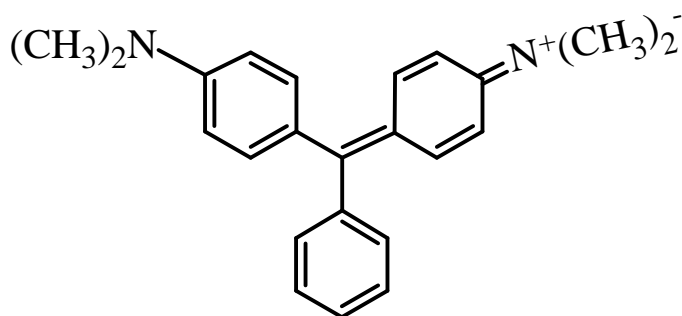
фенолфталеин

(12.32)



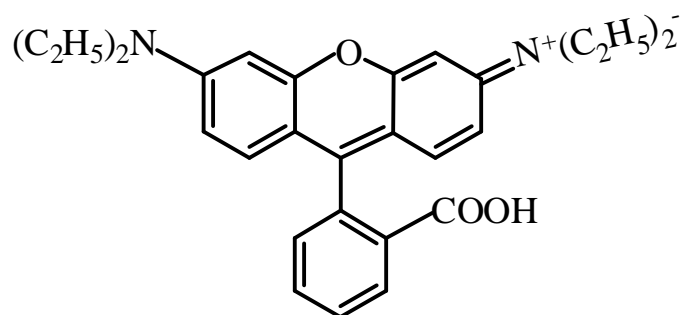
флуоресцеин

(12.33)



малахитовый зеленый

(12.34)



родамин С

(12.35)

Обнаружено возникновение яркой флуоресценции в твердых растворах у красителей трифенилметанового ряда (фуксин, малахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый). Появление способности флуоресцировать таких красителей обусловлено тем, что в твердых растворах становится невозможным относительно вращение бензольных и хинолиновых колец вокруг соединяющей их цепочки конъюгированных двойных связей.

Спектры люминесценции большинства веществ представляют собой широкие полосы. При исследовании веществ в условиях глубо-

кого охлаждения (77 К) спектры люминесценции становятся квазилинейчатыми с разрешенной колебательной структурой (эффект Шпольского).

Между интенсивностями возбуждающего света и люминесценции имеется зависимость, которая характеризуется энергетическим и квантовым выходами. Энергетический выход ($B_{\text{эн}}$) – это отношение излучаемой энергии люминесценции ($E_{\text{л}}$) к энергии поглощенного света ($E_{\text{п}}$), а квантовый выход – это отношение числа излученных квантов ($N_{\text{л}}$) к числу поглощенных квантов ($N_{\text{п}}$):

$$B_{\text{эн}} = \frac{E_{\text{л}}}{E_{\text{п}}}; \quad B_{\text{кв}} = \frac{N_{\text{л}}}{N_{\text{п}}} \quad (12.36)$$

Учитывая, что энергия кванта $E = h\nu$, легко найти соотношение между $B_{\text{эн}}$ и $B_{\text{кв}}$:

$$B_{\text{эн}} = \frac{h \cdot \nu_{\text{л}} \cdot N_{\text{л}}}{h \cdot \nu_{\text{п}} \cdot N_{\text{п}}} = \frac{\nu_{\text{л}}}{\nu_{\text{п}}} \cdot B_{\text{кв}} = \frac{\lambda_{\text{п}}}{\lambda_{\text{л}}} \cdot B_{\text{кв}} \quad (12.37)$$

В соответствии с законом Вавилова энергетический выход люминесценции с увеличением длины волны возбуждающего света сначала растет пропорционально длине волны, затем остается постоянным и после достижения некоторой длины волны резко падает.

Квантовый выход характеризует предел обнаружения вещества люминесцентным методом. Чем больше квантовый выход, тем меньше количества вещества можно обнаружить.

Прямолинейная зависимость интенсивности люминесценции от концентрации вещества сохраняется при постоянстве квантового выхода, интенсивности возбуждающего света, низкой концентрации и т.д. При повышении концентрации интенсивность люминесценции отклоняется от линейной, а при больших концентрациях интенсивность люминесценции может уменьшаться (концентрационное тушение люминесценции). В люминесцентном анализе верхний предел концентрации растворов не превышает $10^{-3} - 10^{-4}$ моль/л.

Люминесцентный метод по сравнению с молекулярно-абсорбционной спектрометрией характеризуется более широким динамическим диапазоном концентраций (от 10^{-7} до 10^{-4} М).

Кроме концентрационного может происходить и температурное тушение (уменьшение выхода люминесценции с повышением температуры). Температурное тушение объясняется тем, что с повышением температуры увеличивается вероятность безызлучательных переходов

в связи с увеличением колебательной энергии молекул, а также происходит диссоциация возбужденных частиц.

Тушение люминесценции наблюдается и при добавлении некоторых веществ к люминесцирующим растворам. Активными тушителями являются элементарный иод, ионы Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ag^+ и другие. Тушение люминесценции носит избирательный характер. Анилин является активным тушителем свечения флуоресцеина, но практически не тушит свечения хинина-сульфата. Гваякол, наоборот, активно тушит свечение хинин-сульфата и мало влияет на свечение флуоресцеина.

12.4.2.2. Аппаратура в люминесцентном анализе

К основным узлам приборов для люминесцентного анализа относятся: источник возбуждения (лампа), монохроматоры возбуждающего и испускаемого излучений, кювета с образцом, фотоумножитель и регистрирующее устройство.

Источник возбуждающего света и фотоумножитель могут располагаться под прямым углом, в линию и фронтально. Наиболее широко используется первый метод, так как в этом методе на фотоумножитель падает незначительное количество постороннего света. Применяется этот метод для слабопоглощающих растворов. Для сильнопоглощающих растворов используется третий метод, так как спектры возбуждения и люминесценции сильно искажаются за счет эффектов внутреннего фильтра и перепоглощения растворов. Эффект внутреннего фильтра обусловлен тем, что в результате частичного поглощения света раствором интенсивность возбуждающего света возле задней стенки меньше, чем у передней. Перепоглощение излучения обусловлено перекрыванием спектров флуоресценции и поглощения. Метод фронтального расположения освещения и регистрации используется при анализе твердых образцов и замороженных растворов. Метод освещения в линию используется редко.

Для регистрации фосфоресценции необходимы дополнительные устройства. Для облучения пробы очень короткими импульсами необходим механический или электронный прерыватель, который позволяет отделить длительное фосфоресцентное свечение от кратковременного флуоресцентного. Вторым дополнительным устройством является устройство для охлаждения пробы.

12.4.2.3. Аналитическое применение люминесцентных методов

Качественное обнаружение веществ люминесцентным методом основано на их способности люминесцировать (например, хинин-

сульфат) или, реже, гасить люминесценцию. Методы, основанные на собственной люминесценции, веществ обладают высокой селективностью. Однако таких веществ небольшое количество. Вещества, не обладающие собственной люминесценцией, в определенных условиях могут быть переведены в люминесцирующие соединения. В качестве реагентов для люминесцентного определения некоторых ионов металлов применяют 8-оксихинолин, 3-оксифлавоин, морин, кверцетин, родаминовые красители и др. Родаминовые красители являются высокочувствительными и селективными флуоресцентными реагентами для определения ртути, индия, галлия и других элементов. Ионные ассоциаты родаминовых красителей с галогенидными ацидокомплексами металлов обладают большей растворимостью в органической фазе (бензол, хлороформ) по сравнению с растворимостью солей родаминовых красителей.

Достоинством люминесцентных реакций является низкий предел обнаружения. Например, предел флуориметрического обнаружения алюминия по реакции с морином составляет 0,03 нг/мл.

Количественный люминесцентный анализ основан на использовании линейной зависимости интенсивности люминесценции от концентрации флуоресцирующего вещества. Для определения количественного вещества в пробе применяют обычно метод градуировочного графика.

Одним из путей повышения чувствительности и избирательности люминесцентного метода является измерение интенсивности флуоресценции при замораживании растворов. При этом значительно увеличивается интенсивность люминесценции, а также появляется флуоресценция веществ, которые при комнатной температуре не флуоресцируют. Примером низкотемпературной собственной люминесценции является люминесценция галогенидных комплексов ртутеподобных ионов (галлия, олова, свинца, мышьяка, сурьмы, висмута), электронная структура которых подобна структуре атома ртути.

Люминесцентный анализ применяется при контроле качества лекарственных средств, анализе биологически активных веществ, нефтепродуктов, канцерогенных веществ, в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Погрешность метода составляет 5–7%.

12.4.2.4. Хемилюминесценция

Люминесценция, возникающая в результате электронного перехода возбужденной частицы в нормальное состояние при химической реакции, – это хемилюминесценция. Источником света является реакционная ячейка.

Хемилюминесценция наблюдается в случае, если в растворе происходят элементарные экзотермические акты, энергия которых больше

179 кДж/моль. Квантовый выход некоторых биохимических реакций близок к единице, однако в большинстве хемилюминесцентных реакций квантовый выход редко достигает нескольких процентов. Хемилюминесцентные реакции используют в технологических схемах для автоматического контроля производства, в биологии, медицине, криминалистике.

Хемилюминесцентный анализ, с одной стороны, является разделом каталитических (кинетических) методов анализа, а с другой – разделом люминесцентных методов анализа. В отличие от других каталитических методов в каталитической хемилюминесцентной реакции главным «продуктом» является свет, количество и интенсивность которого измеряется с помощью фотоэлементов или фотоумножителей.

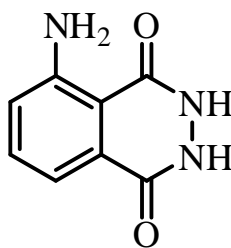
В аналитической практике хемилюминесцентные реакции используют для определения микроколичеств ионов металлов, которые являются катализаторами или ингибиторами хемилюминесцентных реакций, а также для определения органических веществ, которые являются ингибиторами хемилюминесцентных реакций. Хемилюминесцентный анализ основан на измерении интенсивности или суммы выделенного света в химической реакции. Градуировочный график представляет собой прямопропорциональную зависимость интенсивности выделившегося света от количества определяемого вещества-катализатора или обратнопропорциональную зависимость выделившегося света от количества вещества-ингибитора. В хемилюминесцентном анализе не требуется источник возбуждения, поэтому более простая аппаратура метода по сравнению с флуоресцентным методом. Влияние фона незначительно.

Основное преимущество метода – низкие пределы обнаружения (10^{-10} – 10^{-6} г/мл), достаточная точность определения, экспрессность, простота аппаратуры. Недостаток метода – малая селективность хемилюминесцентных реакций, однако этот недостаток частично устраняют применением маскирующих веществ, подбором оптимальных условий определения.

Особое внимание уделяется чистоте реактивов, посуды, растворителей.

В качестве хемилюминесцентных реактивов наиболее широко применяют люминол, люцигенин, силоксен и др.

При реакции **люминола** (гидразид 3-аминофталевой кислоты) с пероксидом водорода (хлорной, бромной водой, NaBiO_3 и др.) в щелочной среде ($\text{pH} > 8,5$) возникает голубое свечение.



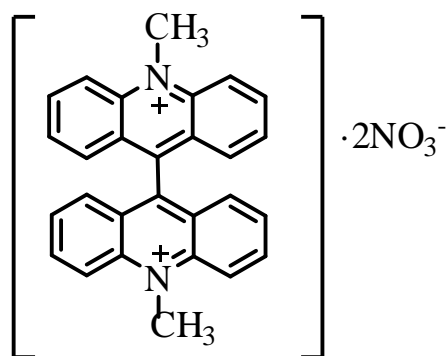
(12.38)

Люминол

При окислении сильными окислителями (персульфат, хромат, хлорамин и др.) свет не выделяется. Этот факт указывает на то, что выделение света при окислении зависит не только от структуры люминола, но и от природы окислителя.

Ионы металлов по-разному влияют на свечение. Усиливают свечение ионы меди, кобальта в системе «люминол–H₂O₂»; ионы титана, циркония гасят свечение системы «люминол–Cu(II)–H₂O₂». По реакции с люминолом определяют неорганические и органические сульфиды, аминокислоты, аминфенолы и др.

Люцигенин (N,N'-диметилбиакридилнитрат) под действием H₂O₂ при pH > 9 излучает голубое свечение. Свечение люцигенина возникает только в присутствии пероксида водорода. Другие окислители (гипохлорит, гипобромит, перманганат калия, феррицианид) не вызывают свечения. Катализаторами хемилюминесцентной реакции люцигенина с пероксидом водорода являются ионы серебра, свинца, марганца, хрома, кобальта, никеля и др. Применяют для определения ионов висмута, свинца, меди, кобальта и др. ионов, а также различных восстановителей.

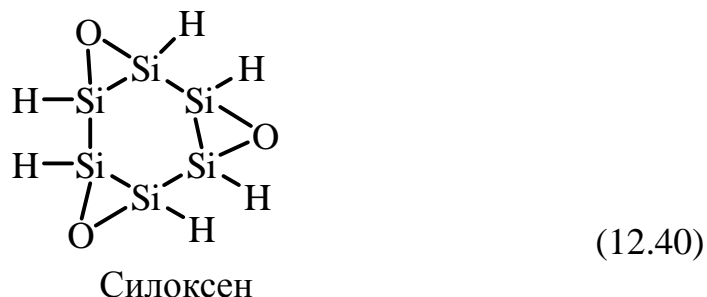


(12.39)

Люцигенин

Силоксен (циклогексасилтриоксен) в кислой среде (pH < 5) при действии окислителей излучает розовое свечение. Впервые сильная хемилюминесценция силоксена наблюдалась с дихроматом и перманганатом калия в кислой среде, менее сильная в присутствии азотной кислоты, пероксида водорода, персульфата и др. Способность излучать свет в кислой среде отличает силоксен от других хемилюминесцентных

веществ, которые излучают свет только в щелочной среде. Применяют для определения микроколичеств церия, ванадия, марганца и др.



Для определения суммы света, выделяющегося при хемилюминесцентной реакции, раньше применяли фотографический метод. Кюветы с прозрачным дном устанавливали на фотографическую пластинку и через определенное время пластинку обрабатывали, высушивали и измеряли почернение пятен на микрофотометре. В настоящее время для измерения интенсивности свечения и суммы выделившегося света за определенное время применяют фотоэлектрические установки с фотомножителями и самописцем.

12.5. Иммунохимические методы анализа

Инструментальные методы анализа (хроматографические, электрохимические, спектрометрические), применяемые для обнаружения и количественного определения лекарственных и наркотических веществ в биожидкостях, как правило, требуют предварительной пробоподготовки образцов.

Использование специфических взаимодействий антиген-антитело позволяет проводить идентификацию и количественное определение лекарственных и наркотических веществ в биологических жидкостях. Поскольку реакция проводится непосредственно в биожидкости, то не требуется дополнительное применение методов изолирования и очистки. Методы иммунохимического анализа позволяют анализировать большое число проб без предварительной подготовки. Для иммунохимических методов (ИХМ) характерны также высокая чувствительность, групповая специфичность и простота исполнения. Чувствительность и специфичность ИХМ в значительной степени определяют антитела, содержащиеся в своей структуре специфические антигенсвязывающие центры. Антитела связывают не только вещества, похожие на антигены, но и структурно родственные вещества.

Классические методы иммунохимического анализа, в которых иммунная реакция обнаруживалась по визуальному изменению состояния реагентов (агломинация, преципитация) или по характерному изменению биообъектов, добавляемых к реакционной смеси, имеют ряд

недостатков: для визуальной регистрации аналитического сигнала реакции антиген-антитело (Аг-Ат) требуются высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции.

Введение метки в компоненты реакционной смеси увеличивает чувствительность ИХМ. Применяют ферментные, флуоресцентные, радионуклидные, парамагнитные и другие метки. Методы иммунохимического анализа, основанные на применении меченных реагентов, находят широкое применение для определения биологически активных соединений разнообразной структуры (от низкомолекулярных гормонов до высокомолекулярных вирусов).

Классифицируют иммунохимические методы по разным признакам (характеристики антител, тип применяемой метки, техника выполнения, способ детектирования и др.).

В таблице 12.13 приведена классификация основных современных методов иммунохимического анализа по способу детектирования.

Таблица 12.13

Классификация иммунохимических методов анализа

Метод анализа	Способ детектирования
Радиоиммунный анализ (РИА)	Радиоактивность
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Ферментативная активность
Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА)	Поляризация флуоресценции
Иммунохроматографический иммуноанализ (ИХМА)	Образование окрашенного комплекса в тест-зоне
Иммуносенсорные методы (ИСМ)	Электрический сигнал
Рефрактометрический иммуноанализ (РМИА)	Преломление света
Металлоиммуноанализ (МИА)	Атомные спектры поглощения
Люминесцентный иммуноанализ (ЛИА)	Интенсивность люминесценции
Спин-иммунологический анализ (СИА)	Электронный спин-резонанс свободных радикалов

Наиболее широко для определения лекарственных и наркотических веществ в биологических объектах применяются иммуноферментный, радиоиммунный методы и поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Основные объекты исследования для скрининговых иммунотестов – моча и кровь. В моче меньше протеинов и продуктов распада эндогенных веществ. Матричный эффект, кросс-реактивность сильнее сказываются при исследовании крови. Для осаж-

дения белков используют ацетонитрил и другие органические растворители.

12.5.1. Иммуноферментный метод анализа

Для определения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов в биологических объектах широко используются методы иммуноферментного анализа. Иммуноферментные методы анализа основаны на использовании иммунологических реакций для определения биологически активных соединений.

При поступлении чужеродных веществ в организм происходят иммунологические реакции с образованием специфических белков крови – иммуноглобулинов. Иммуноглобулины – это сложные белки (гликопротеины), содержащие углеводный компонент. К веществам, способным вызывать биосинтез иммуноглобулинов (*антител*), относятся *антигены* (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты и др.). Образование прочных иммунных комплексов антиген-антитело имеет биологическое значение, так как позволяет удалять из организма соответствующие антигены. В иммунологических реакциях могут участвовать и низкомолекулярные вещества с молекулярной массой более 100, которые после конъюгирования с высокомолекулярными носителями приобретают иммуногенные свойства (стимулируют синтез антител). Такие соединения получили название *гаптенов* (лекарственные и наркотические вещества, гормоны, пестициды, различные аллергены и др.).

Иммунологический метод количественного определения инсулина в плазме крови человека предложили в 1959 г. Р. С. Ялоу и С. А. Берсон. Метод основан на конкуренции между немеченым инсулином и меченым ^{131}I , за число мест связывания на антителах к инсулину. Количество инсулина в плазме обратно пропорционально количеству меченого инсулина, связавшегося с антителами. Легкость измерения низких уровней радиоактивности, высокая специфичность связывания определяемого вещества антителами были положены в основу нового метода, названного иммунологическим. За разработку радиоиммунологического метода анализа Р. С. Ялоу и С. А. Берсон были удостоены Нобелевской премии.

В 1971 году Е. Энгвалл, Р. Пэлманн, В.К. ван Вемен и А. Н. Шууре предложили другой тип чувствительных и универсальных методов для иммуноанализа – ферменты. Этот метод был назван «фермент-зависимый иммуносорбционный анализ» (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Предложены различные классификации методов иммуноферментного анализа:

- по типу реагентов, используемых на первой стадии анализа (конкурентный и неконкурентный методы);
- по типу проводимых реакций (гомогенный и гетерогенный методы);
- по реагенту, иммобилизованному на твердой фазе, и др.

Активность метки в фракции измеряют после отделения меченых и немеченых антигенов, связавшихся с антителами, от свободных антигенов. Такой метод относят к иммуноанализу с разделением компонентов и часто называют **гетерогенным** иммуноанализом.

Разработанный К. Е. Рубенштейном и др. в 1972 г. метод иммуноферментного анализа не требует разделения связанных с антителами и свободных антигенов. В этом методе измеряют удельную активность фермента при связывании антител с мечеными антигенами. Этот метод называют **гомогенным** иммуноанализом, так как при таком анализе все компоненты реакции образуют гомогенную фазу и находятся в растворе, гетерогенные фазы для разделения связанных и свободных антигенов не требуются. Более подходящим термином для такого метода является «иммуноанализ без разделения компонентов».

К ферментно-зависимым меткам относятся вещества, которые можно количественно определять с помощью ферментативных реакций (субстраты, кофакторы, фрагменты ферментов, ферменты, модуляторы ферментов и др.).

Ферментные метки наиболее чувствительны и универсальны, так как являются белковыми молекулами с мощным каталитическим действием. Большинство ферментных меток способны за 1 мин превращать в продукты 10 молекул субстрата в расчете на 1 молекулу фермента. Каталитическая активность фермента значительно зависит от его трехмерной структуры (конфигурации). Другое преимущество ферментных меток обусловлено наличием в их молекулах многочисленных функциональных групп (аминогрупп, карбоксильных, сульфгидрильных, остатков тирозина), через которые можно присоединять молекулы лигандов.

Иммуноферментный анализ без разделения компонентов с использованием в качестве ферментной метки лизоцима был предложен для определения морфина. В этом методе нет необходимости разделять формы меченого ферментом антигена (свободная форма антигена и связанная с антителами), что значительно сокращает продолжительность анализа.

Антиген (например, морфин) в образце конкурирует с антигеном, связанным с ферментом, за образование комплекса с антителами. Образующийся комплекс Ат-Аг-Ф обладает низкой ферментативной активностью, так как активность фермента в реакции с хромогенным субстратом снижается вследствие затруднения доступа субстрата к ферментным центрам. При наличии антигена в пробе образуется комплекс

Аг-Аг, часть Аг-Ф остается в несвязанном состоянии и катализирует превращение субстратов в продукты. В этом варианте ИФА ферментативная активность прямо пропорциональна количеству свободного антигена в пробе.

Принцип такого анализа показан на рис. 12.23.

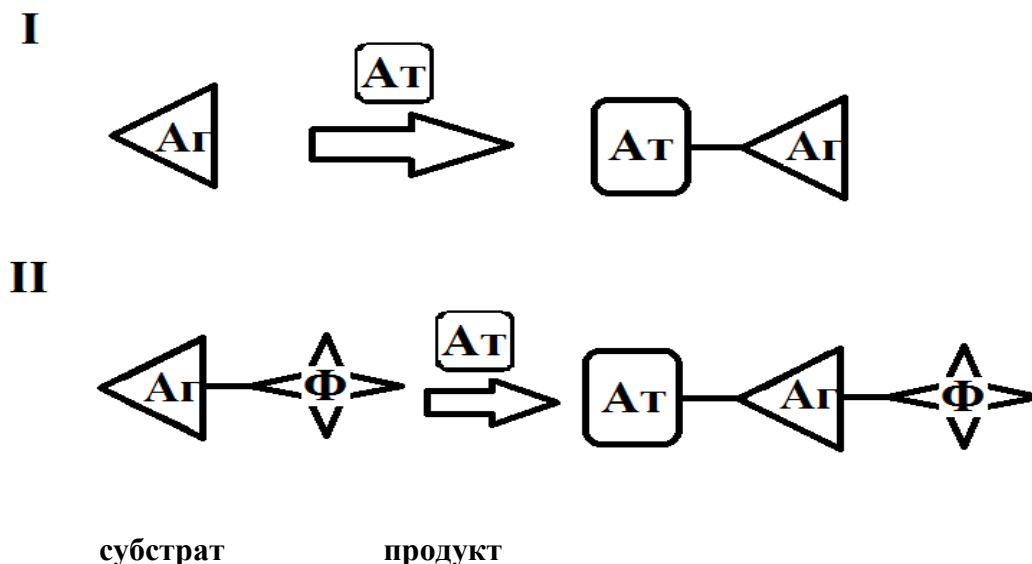


Рис. 12.23. Принцип иммуноферментного анализа без разделения компонентов с использованием в качестве метки антигена (Аг), меченого ферментом (Ф).

Имуноферментный анализ с разделением компонентов (гетерогенный анализ) отличается тем, что меченный ферментом антиген (Аг-Ф) конкурирует с антигеном анализируемого образца за ограниченное число антител, иммобилизованных на твердом носителе (пробирки, бусы, полистирольные планшеты). После инкубирования (определенная температура и продолжительность) отделяют комплекс Аг-Ф-Аг от свободного Аг-Ф и анализируют фракцию, связанную с антителами.

Чем больше определяемого антигена содержится в пробе, тем меньше конъюгата Аг-фермент свяжется с антителами и тем меньше ферментативная активность твердой фазы. Концентрация Аг в пробе обратно пропорциональна оптической плотности.

ИФА с разделением компонентов обладает высокой чувствительностью. Например, ИФА с разделением компонентов позволяет определять ферритин с чувствительностью до $2 \cdot 10^{-19}$ М.

Выделяют два типа иммуноферментных гетерогенных методов – **конкурентный** и **неконкурентный** (последовательный) анализ.

Последовательный гетерогенный анализ состоит из двух стадий. На первой стадии антитела, адсорбированные на твердом носителе,

взаимодействуют с антигеном или каким-либо другим анализируемым белком. Отмывают несвязавшиеся компоненты и прибавляют раствор, содержащий антитела, конъюгированные с ферментом. Затем отмывают (вторая стадия) несвязавшиеся компоненты и в систему вводят соответствующий субстрат для осуществления ферментативной реакции (рис. 12.24).

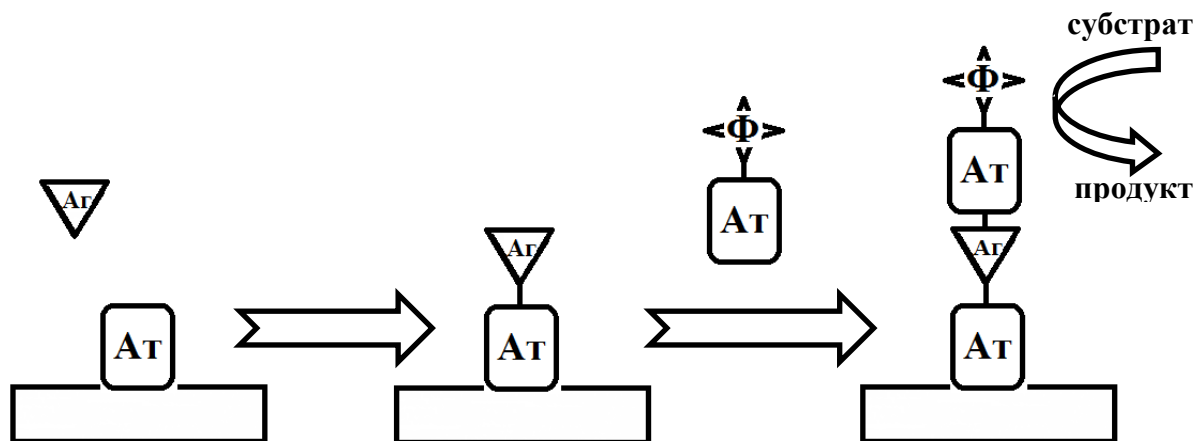


Рис.12.24. Неконкурентный вариант иммуноферментного гетерогенного метода анализа.

В конкурентном гетерогенном анализе связанные и несвязанные с ферментативной меткой антигены вступают в конкурентное взаимодействие с антителами, иммобилизованными на твердом носителе (рис. 12.25).

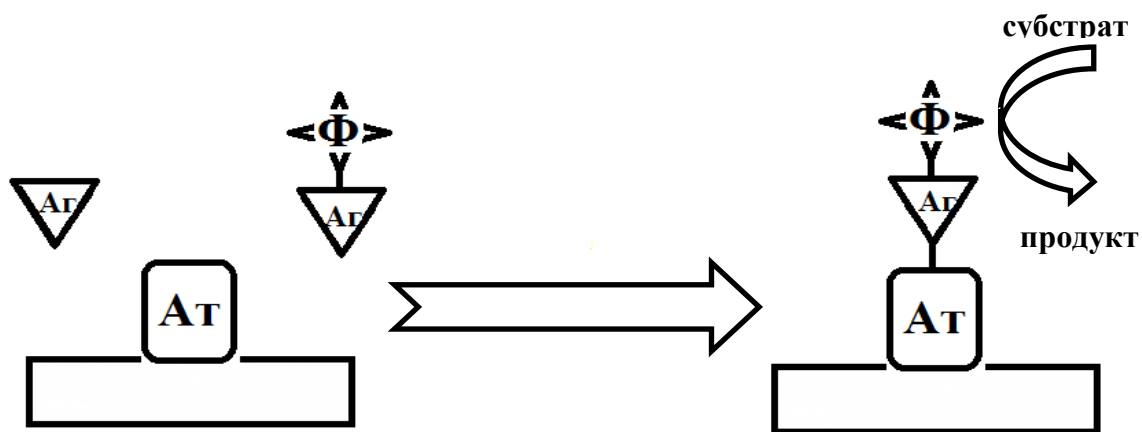


Рис.12.25. Конкурентный вариант иммуноферментного гетерогенного метода анализа.

После инкубации отмывают избыток несвязавшихся компонентов и в систему вводят соответствующий субстрат.

При проведении иммуноферментного анализ необходимо учитывать влияние ряда факторов: природа и способ подготовки носителя, тип и содержание конъюгированного фермента, последовательность реакций, время инкубации, возможность проявления «матричных эффектов».

Разработаны различные технологии ИФА, которые объединяют использование ферментов в качестве меток и возможность их детектирования с помощью соответствующих ферментных систем. Современные работы, посвященные ИФА, рассматривают различные аспекты структуры иммуногенов (дизайн гаптена, выбор белка-носителя), тип получаемых антител (поликлональные, моноклональные) и формат ИФА.

Получение и очистка антител. Основным этапом разработки любой методики иммуноанализа – получение специфических антител к определяемому антигену. От качества антител в значительной степени зависит чувствительность и специфичность методики анализа. В иммунологических исследованиях часто возникает необходимость в получении очищенных препаратов антител, т.е. антигенспецифичных либо неспецифичных иммуноглобулинов.

Антитела получают путем иммунизации разных животных (мыши, морские свинки, кролики) соответствующим антигеном.

Выделение неспецифичных иммуноглобулинов из сыворотки обычно проводят путем последовательного фракционирования белков, которое включает следующие этапы: осаждение гамма-глобулинов в 30–50% растворе сульфата аммония, гель-фильтрация для получения молекул соответствующего размера, ионообменная хроматография с целью выделения молекул, несущих суммарный положительный заряд при нейтральном рН, аффинная хроматография с использованием естественных лигандов иммуноглобулинов.

Выделение антигенспецифичных иммуноглобулинов осуществляют методом аффинной хроматографии. Антиген «пришивают» к частицам сефарозы и связавшиеся с ним «чистые» антитела элюируют с иммуносорбента буферным раствором (глицин-HCl) или раствором тиоцианата натрия. Метод аффинной хроматографии применяют и для получения очищенных препаратов антигенов. Один цикл аффинной хроматографии позволяет очистить белки в 1000 раз и более.

Однако даже такой способ очистки не позволяет полностью избавиться от гетерогенности препарата антител. Выход из этого затруднения – получение антител с одной специфичностью, реагирующих с единственной антигенной детерминантой. Такие антитела называются моноклональными. Их получают методами клеточной инженерии путем гибридизации иммунокомпетентных В-лимфоцитов и клеток миеломных опухолей, способных к быстрому размножению, неограниченному числом делений (в отличие от большинства неопухолевых клеток,

у которых число делений ограничено). Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с "чужими" антигенами. Это высокотехнологичный продукт. Его недостаток – часто сравнительно низкое сродство к субстрату, низкая аффинность.

Синтез иммуногенов. Иммунный ответ возникает в организме только при введении соединения, молекулярная масса которого превышает 3000. Поэтому получение антител к низкомолекулярным антигенам осложнено тем, что они сами по себе не индуцируют образование антител. Чтобы перевести небольшие молекулы в иммуногенное состояние, можно агрегировать их в частицы большего размера или присоединить к белку-носителю (т.е. синтезировать иммуноген).

Белком-носителем чаще всего служит человеческий или бычий альбумин. На рис. 12.26 приведен пример синтеза иммуногена посредством реакций по аминным группам. Сначала аминогруппы гаптена и белка связывают с карбонильными группами глутарового альдегида с образованием двойного шиффова основания. Затем продукт реакции восстанавливают.

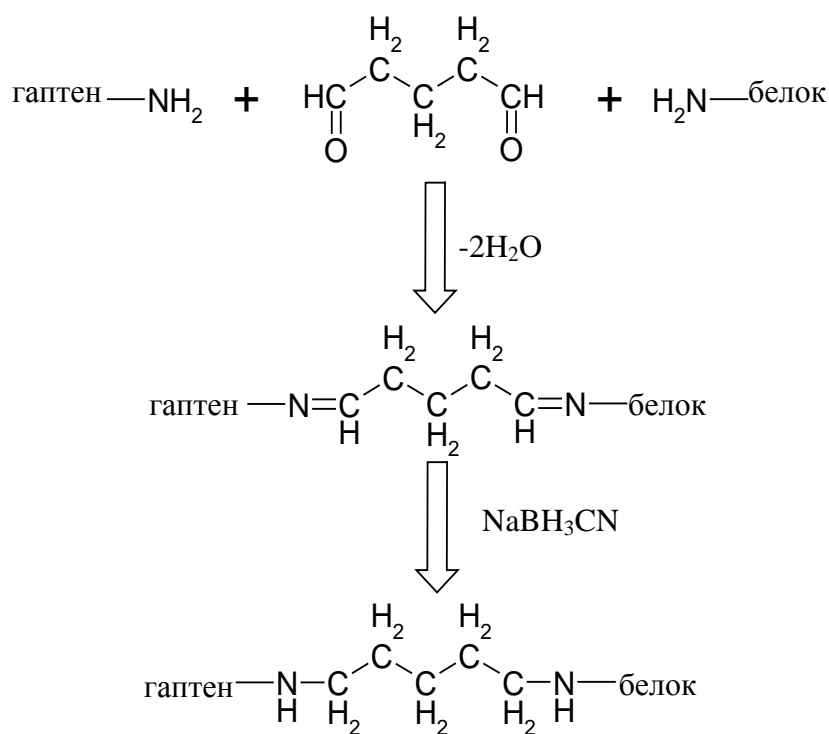


Рис. 12.26. Схема синтеза иммуногена по реакции глутарового альдегида с аминогруппами гаптена и белка.

Получение ферментных конъюгатов. Наиболее часто используемые в ИФА ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, ацетилхолинэстераза, каталаза, уреаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа и др. (табл. 12.14).

Таблица 12.14

Ферменты, используемые в ИФА

Фермент	Индикаторная система	Метод определения активности фермента
Пероксидаза хрена	H ₂ O ₂ /хромоген (о-фенилендиамин, 5-аминосалициловая кислота)	Фотометрический, флуориметрический, хемилюминесцентный, электрохимический
Щелочная фосфатаза	4-нитрофенилфосфат	Фотометрический, флуориметрический
В-галактозидаза	2-нитро-β-D-галактозид	Фотометрический
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин/5,5'-дителиобис(2-нитробензойная кислота)	Фотометрический
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	NADP ⁺ /NADPH	Фотометрический, флуориметрический
Глюкозооксидаза	H ₂ O ₂ /хромоген	Фотометрический

Ферменты, используемые в ИФА должны соответствовать ряду общих требований:

- высокая специфичность и удельная каталитическая активность фермента, позволяющая обнаруживать ферментативную метку в низких концентрациях;
- доступность ферментов, возможность получения достаточно чистых ферментных препаратов, стабильность при хранении и после модификации;
- фермент не должен содержаться в анализируемой биожидкости;
- простота и чувствительность метода определения продуктов ферментативной реакции.

Активность ферментов детектируют по изменению оптической плотности, флуориметрическим, хемилюминесцентным и электрохимическим методами.

Разработка методов ИФА связана с необходимостью получения конъюгатов ферментов-маркеров с антигенами или антителами, в которых антиген или антитело сохраняет иммунологическую активность и не происходит инактивация фермента. Однако все основные подходы, используемые для химического конъюгирования белков и гаптен, приводят к частичной инактивации ферментов и гетерогенности конъюгатов, что влияет на специфичность и чувствительность иммунофер-

ментного анализа. Методами генной инженерии можно получать рекомбинантные конъюгаты белков с антителами. Такие конъюгаты имеют ряд преимуществ – они гомогенны по составу, имеют стехиометрию 1:1, сохраняют функциональную активность как белка-маркера, так и антигена/антитела, а также воспроизводимость и относительную простоту получения.

Варианты ИФА и примеры определений. Выбор технологии ИФА зависит от конкретной задачи. Часто в химико-токсикологическом исследовании достаточно установить лишь факт наличия или отсутствия веществ в образцах. Иногда необходимо и определить концентрацию веществ в образцах с высокой точностью.

Методы ИФА не требуют высокой подготовки персонала, так как являются нетрудоемкими. Возможность автоматизации процесса определения токсикантов в биологических жидкостях позволяет значительно повысить производительность труда. К недостаткам ИФА относятся длительность реакции антиген-антитело, многостадийность, а также возможность неспецифических реакций антиген-антитело.

Гетерогенный метод более чувствительный (10^{-6} – 10^{-8} г/мл) по сравнению с гомогенным (10^{-4} – 10^{-6} г/мл). Различаются гетерогенный и гомогенный методы и по продолжительности проведения анализа (2–4 часа и 1–30 мин соответственно).

Перспективными вариантами ИФА, используемыми на практике, являются технологии ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ), EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique – ферментно-мультиплицируемый иммунный тест), CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay – клонированный ферментно-донорный иммуноанализ), KIMS (Kinetic Interaction of Microparticles in Solution – кинетическое взаимодействие микрочастиц в растворе).

ИФА используется для определения наркотических и лекарственных веществ в различных биожидкостях. Определены пределы обнаружения сульфаниламидных препаратов, лизиноприла, эналаприла, клофелина, производных барбитуровой кислоты, производных бензодиазепинов, опиатов, амфетаминов, каннабиноидов. Высокая специфичность достигается при определении основных метаболитов (бензоилэксгонин и эксгонин) кокаина методом ИФА. При определении опиатов не требуется в отличие от методов ТСХ и газовой хроматографии проводить предварительный гидролиз. Методом ИФА определяют свободный морфин и конъюгат морфина с глюкуроновой кислотой. Мешает кодеин, относительная реактивность которого выше, чем у морфина. **Относительная реактивность** – отношение чувствительности определения данного вещества к чувствительности определения другого вещества в одинаковых условиях выполнения анализа.

В настоящее время выпускаются готовые коммерческие диагностические наборы реагентов фирм Syva, Abbot (США), F. Hoffmann-La Roche Ltd (Франция) и др., позволяющие выявлять лекарственные и наркотические вещества с гарантированным пределом обнаружения 300–500 нг/мл. Коммерческие диагностические наборы преимущественно основаны на принципах твердофазного ИФА. В большинстве производимых наборов используются поликлональные антитела, поскольку их получение сопряжено с меньшими затратами средств. Реализованы наборы чаще всего на микропланшетах или в пробирках.

Возможные источники ошибок при проведении ИФА. Ошибки, возникающие при определении лекарственных и наркотических веществ методами ИФА, могут быть обусловлены рядом причин. Используемые для анализа биологические жидкости могут оказывать влияние на активность фермента-метки за счет солевого состава, изменяющего значение рН и ионную силу анализируемого образца. На результат анализа могут повлиять примесь эндогенного фермента или солевые формы метаболитов, теряющие способность конкурировать в иммунологической реакции за счет связывания с белками биожидкости.

Следует избегать возможного попадания в реакционную смесь химических ингибиторов ферментов. Многие соли тяжелых металлов, например ртутьсодержащие консерванты, являются ингибиторами ферментов. Антикоагулянты, некоторые метаболиты лекарственных веществ снижают активность ферментов.

Тесты ИФА могут давать ложноотрицательные результаты, если в пробе присутствуют консерванты (азид натрия, бензоат натрия), так как используемые консерванты блокируют активность фермента пероксидазы хрена.

Специфической проблемой определения лекарственных и наркотических веществ иммунохимическими методами анализа является перекрестная реактивность или **кросс-реакция** (связывание структурно-родственных веществ). Перекрестная реактивность для определяемых веществ должна быть подтверждена. Большинство производителей указывают потенциальные мешающие вещества, перечень которых прилагается к иммунонаборам.

Кровь умершего со временем разлагается, продуцируя биогенные амины, которые перекрестно реагируют с антителами в иммунологических исследованиях, что приводит к ложноположительным результатам. Ложноположительная реакция возможна и в присутствии ревматоидного фактора. Для избежания получения ложноположительных результатов требуется, чтобы все образцы, положительные в иммунохимических тестах, подтверждались

другими методами (ТСХ, газовая хроматография, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия).

12.5.2. Радиоиммунный анализ (RIA – RADIOIMMUNOASSAY)

Радиоиммунный метод анализа основан на конкурентном связывании определяемого вещества-антигена и меченого радиоактивной меткой антигена со специфическими антителами. Концентрацию комплекса меченый Аг-Ат определяют посредством измерения радиоактивности. Предварительно необходимо отделить комплекс от непрореагировавшего избытка меченого Аг. Концентрация комплекса меченый Аг-Ат тем выше, чем меньше концентрация определяемого Аг в пробе.

Среди большого числа изотопов наиболее подходящими радиохимическими свойствами для синтеза меченых Аг обладают изотопы ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{57}Co , ^{125}I . Чаще используют изотоп ^{125}I . Он является чистым γ -излучателем, а его препараты легко доступны и могут быть получены в виде веществ со 100%-ной изотопной чистотой.

К достоинствам метода РИА следует отнести низкий предел обнаружения (методы РИА позволяют определять концентрации Аг до нескольких пикограммов в миллилитре), специфичность, малый объем образца, необходимый для анализа. Метод РИА имеет преимущество перед другими методами при определении Аг в биологических объектах благодаря независимости получаемых результатов от матричных эффектов.

Однако метод РИА обладает и рядом недостатков. Ограниченный срок жизни радиоактивной метки (например, период полураспада изотопа ^{125}I составляет 60 суток) требует постоянной замены реактивов, излучение повреждает структуру меченых молекул. Кроме того, существует возможность радиоактивного загрязнения окружающей среды при проведении анализов, метод РИА требует высокой квалификации обслуживающего персонала и дорогостоящего оборудования для регистрации радиоактивности. Метод РИА – гетерогенный метод и его трудно автоматизировать.

Существенные недостатки методов РИА побуждают к поиску альтернативных методов, имеющих высокую чувствительность, специфичность и экспрессность.

12.5.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (PFIA – POLARIZATION FLUORESCENCE IMMUNOASSAY)

Впервые явление поляризации флуоресценции описано Перреном в 1926 г. и детально исследовано Вебером (1952–1953 гг.). Затем Дандликер предложил использовать поляризацию флуоресценции для определения различных антигенов и ввел термин «поляризационный флуоресцентный анализ» (1972 г.). В неполяризованном, т.е. «естественном», свете колебания электрического и магнитного полей, образующих световую волну, происходят во всех направлениях, перпендикулярных направлению распространения. Если пучок неполяризованного света пропустить через поляризатор, то выходящий пучок станет плоскополяризованным или прямолинейно поляризованным (колебания электрического вектора будут происходить только в одной плоскости). Поляризация флуоресценции – доля поляризованного света в испускаемом излучении. Предложенный метод длительное время не находил практического применения в связи с отсутствием доступных приборов для измерения поляризации флуоресценции.

Метод PFIA основан на конкурентном связывании анализируемого Аг и Аг, меченого флуоресцентной меткой (трейсер, трассер), со специфическими Ат с последующим измерением поляризации флуоресценции конъюгата трейсер-антитело.

Степень поляризации флуоресценции зависит от различных факторов (размер или масса флуоресцирующей частицы, температура, вязкость раствора и др.). При постоянных температуре и вязкости раствора поляризация флуоресценции зависит только от размера флуоресцирующей молекулы. Меченый флуоресцентной меткой Аг (трейсер) при возбуждении прямолинейно поляризованным светом будет флуоресцировать деполяризованным светом, так как малые молекулы трейсера в растворе ориентированы хаотично, обладают достаточно большой скоростью вращения, в результате поляризация флуоресценции свободного трейсера в растворе имеет низкое значение. При связывании трейсера со специфическими Ат вращение образующегося комплекса замедляется и увеличивается степень поляризации флуоресценции (рис. 12.27).

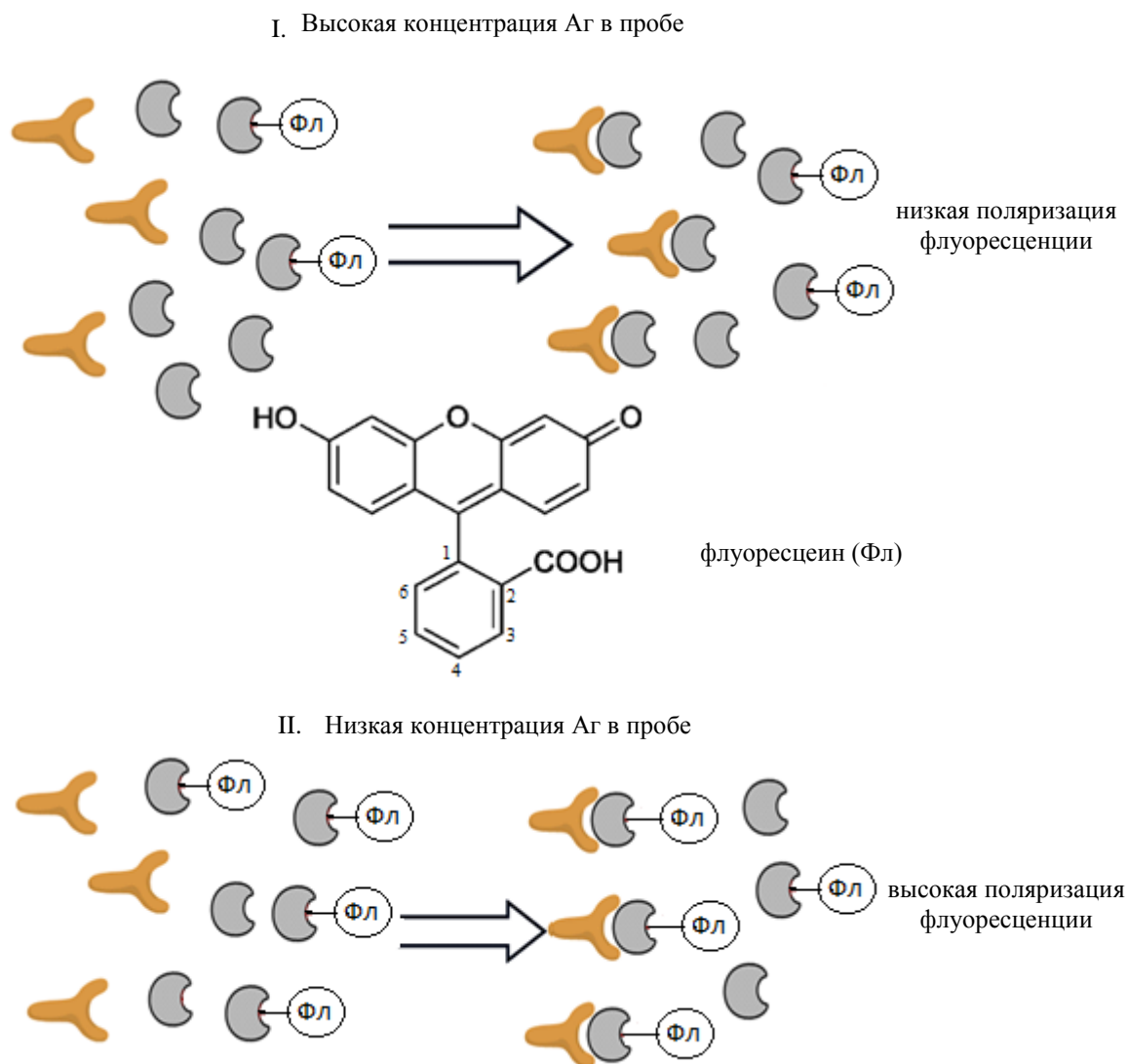


Рис. 12.27. Схема поляризационного флуоресцентного иммуноанализа

Величина поляризации флуоресценции реакционной системы отражает отношение связанной и свободной фракций трейсера и обратно пропорциональна концентрации анализируемого Ag. При высокой концентрации антигена в пробе меченный антиген в большей степени находится в свободном состоянии и поляризация флуоресценции будет минимальной.

В качестве метки для PFIA чаще используют флуоресцеин и его производные. При облучении светом с длиной волны 492 нм молекула флуоресцеина переходит в возбужденное состояние, продолжительность которого составляет 1–4 нс. Время жизни больших молекул (иммунный комплекс антитело-трейсер) в возбужденном состоянии значительно больше (100 нс). Возвращение молекулы в основное состояние

сопровождается зеленой флуоресценцией с максимумом в области 517–520 нм.

Антиген, меченный флуоресцеином, более стабильный, чем конъюгат Ag-фермент. Флуоресцеин соответствует основным требованиям, предъявляемым к меткам: высокие квантовый выход флуоресценции и коэффициент экстинкции, химическая стабильность. Однако группы –COOH и –OH в молекуле флуоресцеина неактивны и получение конъюгатов антигенов непосредственно с флуоресцеином невозможно. При введении реакционноспособных групп (–COOH, –NH₂, –NCS и др.) в положение «4» молекулы флуоресцеина получают производные флуоресцеина (флуоресцеинкарбоновая кислота, аминофлуоресцеин, флуоресцеин-изотиоцианат и др.), используемые для синтеза трейсеров. В качестве реагентов (флуоресцирующих меток) применяют также изотиоцианаты родамина В (С), антрацена и др. Если антиген не содержит активных групп для конъюгирования, то его также модифицируют (вводят карбоксильную или аминогруппу). Очистку синтезированных трейсеров от исходных веществ и побочных продуктов проводят с применением ТСХ.

Исследование методом RFIA проводится с использованием наборов реагентов как на одно вещество, так и на группу веществ (барбитураты, фенобарбитал, барбамил, бензодиазепины, опиаты, каннабиноиды, амфетамин-метамфетамин, амфетамин, метамфетамин, кокаин, метадон, фенциклидин, эфедрин и др.).

К основным достоинствам RFIA относятся: экспрессность, метод гомогенный, стабильность трейсера, низкий предел обнаружения, погрешность определения не превышает 3–5%. Однако метод RFIA имеет и недостатки: менее чувствителен других иммунохимических методов, требуется специальное дорогостоящее оборудование.

Матричный эффект в методе RFIA имеет меньшее влияние на изменение поляризации флуоресценции, чем на изменение прямой интенсивности света. Поэтому результаты анализа методом RFIA при определении наркотических веществ в биологических жидкостях, хранившихся в течение нескольких дней, более точные, чем результаты, полученные методом иммуноферментного анализа. Ложноположительные результаты могут быть обусловлены флуоресценцией солей желчи.

Количественное содержание токсиканта в образце определяют по градуировочному графику зависимости поляризации флуоресценции от концентрации вещества.

Иммунохимические методы постоянно совершенствуются и появляются новые технологии. Значительный потребительский спрос имеют гомогенные методы, так как они просты для автоматизации. К таким новым методам относятся ферментно-мультиплицируемый тест, клонированный ферментно-донорный иммуноанализ.

Особый интерес представляет иммунохроматография на полосках (стрип-тест). Иммуная реакция антиген-антитело протекает при миграции образца анализируемой жидкости по тест-полоске, образование окрашенных зон с иммунореагентами детектируется визуально. При отсутствии исследуемого антигена в биожидкости антитела связываются с меченым антигеном и появляется окраска в тест-зоне. Отсутствие окрашивания в тест-зоне указывает на положительный результат анализа. Основные достоинства метода: простота (тест-полоски погружают в образец анализируемой жидкости, реагенты находятся на полоске), экспрессность, визуальная детекция. Полученный положительный результат с применением тест-полосок требует дополнительного исследования, так как основной недостаток этого метода – кросс-реактивность.

ГЛАВА 13

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА КИСЛОТНОГО ХАРАКТЕРА. ПРОИЗВОДНЫЕ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ

К группе лекарственных веществ кислотного характера, изолируемых полярными растворителями, относятся производные барбитуровой кислоты, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота, сульфаниламидные лекарственные вещества, каннабиноиды и др. Широкое применение барбитуратов в качестве успокаивающих и снотворных средств может быть причиной отравлений. Барбитураты занимают значительное место в судебно-химической экспертизе. Исследование на наличие их является обязательным при анализе внутренних органов трупов людей, рвотных масс, мочи, крови и других объектов. Токсикологическое значение имеют 5,5-замещенные барбитуровой кислоты (барбитал, амобарбитал натрия, бутобарбитал, фенобарбитал, пентобарбитал натрия и др.), а также 1,5,5-замещенные этой кислоты (бензобарбитал, гексобарбитал натрия и др.).

13.1. Общая характеристика и токсикологическое значение барбитуратов

В настоящее время применяется 20–25 наименований барбитуратов. Международному контролю подвергается 12 барбитуратов: аллобарбитал, амобарбитал, барбитал, бутобарбитал, буталбитал, циклобарбитал, метилфенобарбитал, пентобарбитал, фенобарбитал, секбутобарбитал, секобарбитал и винилбитал.

Барбитураты относятся к производным пиримидин-2,4,6-триона, представляют собой белые кристаллические вещества, без запаха. Кислотная форма барбитуратов плохо растворяется в воде, хорошо растворима в эфирах, хлороформе, метаноле и этаноле. Барбитураты склонны к лактам-лактимной таутомерии (за счет атомов водорода имидных групп):

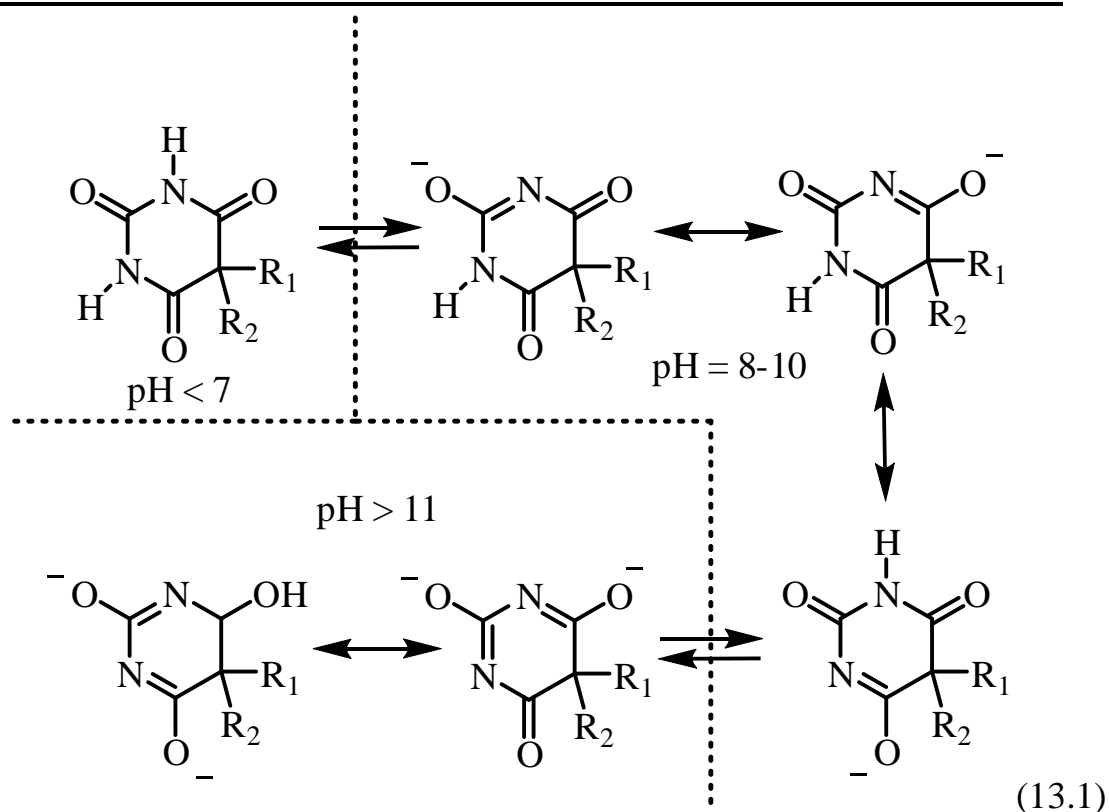
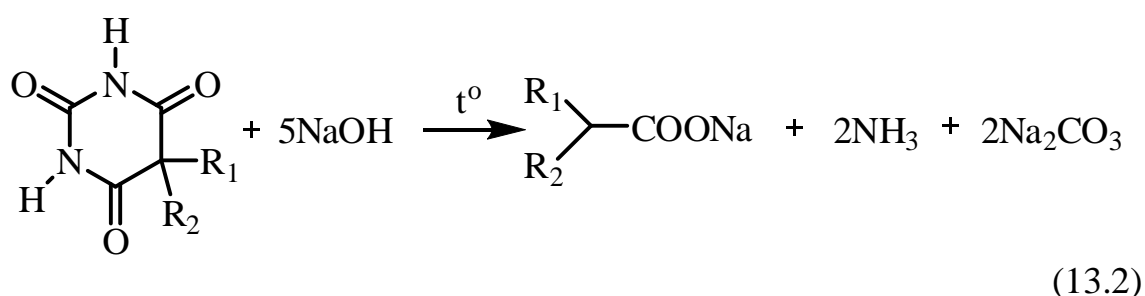


Рис. 13.1. Схема ионизации барбитуратов

Кислотные свойства барбитуратов обуславливают способность их к взаимодействию со щелочами с образованием моно- и дизамещенных солей, растворимых в воде.

При кипячении со щелочами барбитураты разрушаются с выделением аммиака, карбоната щелочного металла и соли органической кислоты:



При подкислении раствора выделяются диоксид углерода и соответствующая органическая кислота, имеющая характерный запах.

Барбитураты являются сильными снотворными и седативными средствами. В медицине наиболее часто используются фенобарбитал и тиопентал. Фенобарбитал оказывает также и противосудорожное действие. Гексобарбитал натрия и тиопентал натрия используются для наркоза при проведении несложных операций. Барбитураты также могут использоваться для эвтаназии. Известны случаи применения барби-

туратов («сыворотка правды») зарубежными спецслужбами для получения информации. Барбитал натрия используется в некоторых лабораториях для приготовления буферных растворов.

В основном встречаются отравления барбитуратами длительного и среднего действия, что обусловлено их большей доступностью для населения и способностью к кумуляции. Отравление барбитуратами короткого действия (гексобарбитал натрия, тиопентал натрия) встречается крайне редко в клиниках при проведении операций и легко устраняется присутствующим медицинским персоналом путем обеспечения гипервентиляции легких в течение острого периода отравления (10–15 мин).

При передозировках барбитуратов наблюдается расширение кровеносных сосудов, гипотензия, шок, гипотермия, судороги. Иногда может развиваться острая почечная недостаточность, что связано с расширением периферических сосудов, развитием острой сердечно-сосудистой недостаточности, снижением почечного кровообращения и, как следствие, нарушением функции почек. Смерть обычно наступает вследствие остановки дыхания, иногда в сочетании с остановкой сердца, или респираторных осложнений.

У значительного количества пациентов наблюдается угнетение дыхания, что требует оказания немедленной медицинской помощи.

Для коматозных состояний характерна определенная стадийность, когда последовательно развиваются засыпание (1 стадия отравления), поверхностная кома с повышением или снижением сухожильных рефлексов и реакции зрачков на свет (2 стадия отравления) и, наконец, глубокая кома с арефлексией и отсутствием реакции на болевое раздражение (3 стадия отравления), протекающая наиболее тяжело с выраженными нарушениями функций дыхания и кровообращения. Период выхода из коматозного состояния (4 стадия отравления) нередко характеризуется психомоторным возбуждением.

После перорального применения барбитураты быстро всасываются (биодоступность составляет 90–100%) и распределяются в органы и ткани. Наибольшая концентрация наблюдается в печени, почках, селезенке, крови и мозге. Легкость проникновения барбитуратов в органы и ткани объясняется тем, что при физиологических границах рН около 50% барбитуратов находится в молекулярной форме. Значения pK_a барбитуратов находятся в области 7–8.

Различают барбитураты длительного – 10–16 часов (фенобарбитал, барбитал, барбитал натрия); среднего – 6–8 часов (амобарбитал натрия, пентобарбитал натрия, бутобарбитал); короткого – 4–6 часов (гексобарбитал натрия) и ультракороткого (тиопентал натрия) действия. При остром отравлении важно сразу установить какое было принято лекарственное средство – длительного действия или короткого. Это связано с особенностями оказания первой помощи при отравлениях: при лечении отравлений барбитуратами длительного действия име-

ет смысл применять форсированный диурез, что ускоряет экскрецию. Барбитураты короткого и среднего действия с мочой практически не выделяются. Амобарбитал натрия, пентобарбитал натрия почти полностью разрушаются в печени и выводятся с мочой в виде следовых количеств, поэтому применять форсированный диурез не имеет смысла.

Основные фармакокинетические параметры некоторых барбитуратов представлены в таблице 13.1.

Таблица 13.1

Основные фармакокинетические параметры некоторых барбитуратов

Соединение	pK _a	T _{1/2} , часов	Выделение в неизменном виде, %
Барбитал	7,8	96	70-90
Фенобарбитал	7,3	72-75	30
Гексобарбитал	7,6	8-17	2-6
Амобарбитал натрия	7,9	8-40	1
Пентобарбитал натрия	8,0	15-48	10

Барбитураты длительного действия (барбитал, фенобарбитал) экскретируются в значительных количествах (70–90%) с мочой в неизменном виде. Барбитураты среднего действия (амобарбитал, пентобарбитал) экскретируются в основном в виде метаболитов.

В таблице 13.2 приведены терапевтические и летальные концентрации некоторых барбитуратов.

Таблица 13.2

Терапевтические и летальные концентрации некоторых барбитуратов в плазме крови

Барбитураты	Терапевтическая концентрация, мг/л		Летальная концентрация, мг/л
	минимальная	максимальная	
Амобарбитал натрия	1	5	13-96
Барбитал	10	40	>100
Гексобарбитал натрия	4	10	50
Пентобарбитал натрия	1-3	25-40	10
Секобарбитал	1	5	10-50
Тиопентал натрия	1-5	20-40	10-100
Фенобарбитал	10	20-40	100-150

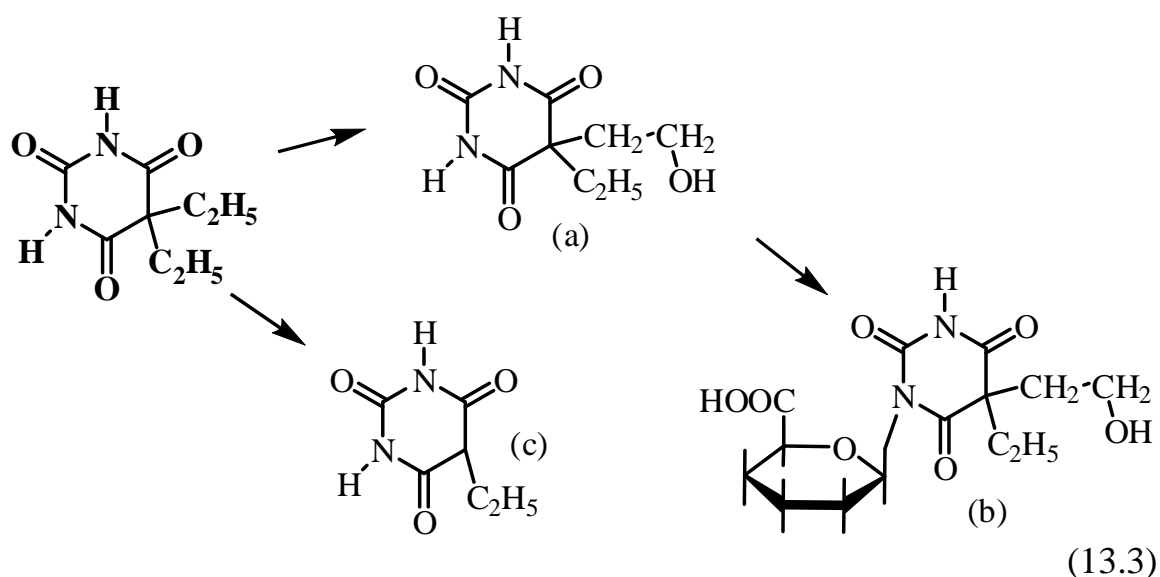
В среднем летальные концентрации для барбитуратов короткого действия соответствуют 10–15 мг/л, средней продолжительности действия – > 30 мг/л и длительного действия – > 80 мг/л.

Метаболизм барбитуратов

Основными путями метаболизма барбитуратов являются окисление (гидроксилирование) радикала в 5 положении, с образованием спиртов, фенолов, карбоновых кислот; отщепление радикала в 5 положении; О- и N-глюкуронизация, десульфирование (тиобарбитураты), окисление до кислот и кетонов. Метаболизм барбитуратов протекает преимущественно в печени.

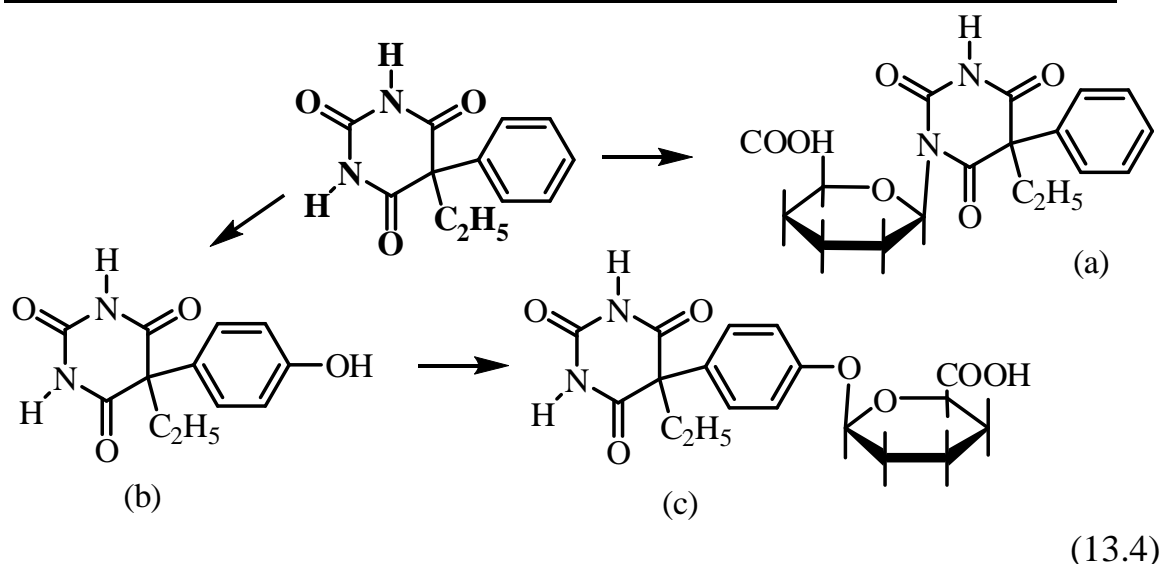
Барбитал (веронал, 5,5-диэтилбарбитуровая кислота)

Большая часть барбитала (примерно 70–90 %) выводится из организма с мочой в неизмененном виде. Незначительная часть дозы этого вещества выделяется в виде метаболитов: 5-этил-5-β-оксиэтилбарбитуровая кислота (а), ее глюкуронид (b), 5-этил-барбитуровая кислота (с).



Фенобарбитал (люминал, 5-этил-5-фенилбарбитуровая кислота)

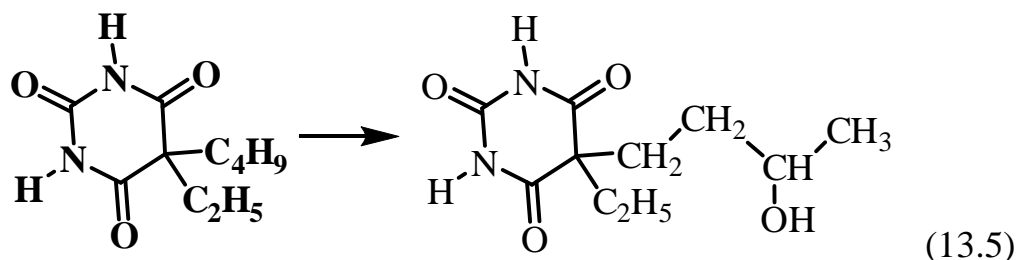
Фенобарбитал преимущественно метаболизируется до β-глюкуронида (а) *п*-гидроксифенилбарбитала (5-этил-5-*п*-гидрокси-фенилбарбитуровой кислоты) (b) и его глюкуронида (с).



При хроническом употреблении фенобарбитала около 25 % дозы экскретируется с мочой в течение 24 часов в неизменном виде, 17 % в виде 4-гидроксипроизводного, около половины которого глюкуро-нид.

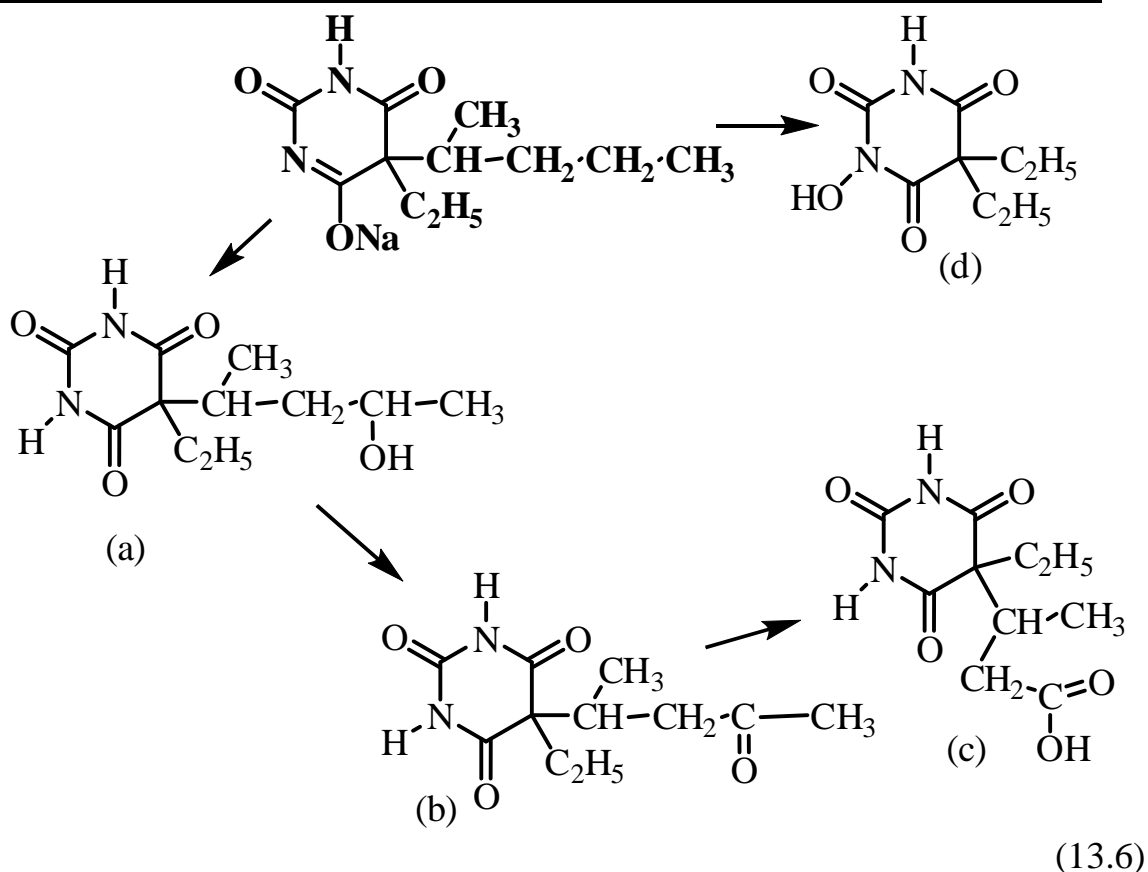
Бутобарбитал (5-этил-5-бутилбарбитуровая кислота)

Метаболитом бутобарбитала является 5-(3'-гидроксибутил)-5-этилбарбитуровая кислота.



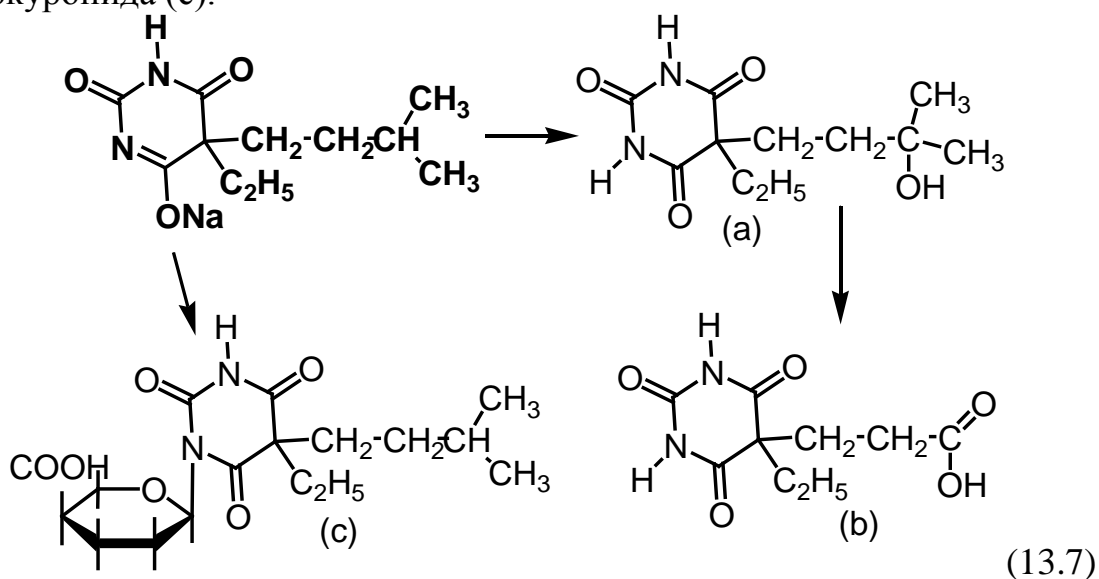
Пентобарбитал натрия (этамилал натрия, нембутал, 5-этил-5-(2-амил)-барбитурат натрия)

С мочой в неизменном виде выделяется всего около 1 % пентобарбитала. Метаболизм пентобарбитала происходит с образованием 5-этил-5-(3'-гидрокси-1'-метил-бутил)-5-барбитуровой кислоты (а), 5-этил-5-(3'-оксо-1'-метил-бутил)-5-барбитуровой кислоты (б), 5-этил-5-(2'-карбокси-1'-метил-этил)-5-барбитуровой кислоты (с), 5,5-диэтил-N-гидроксибарбитуровой кислоты (д).



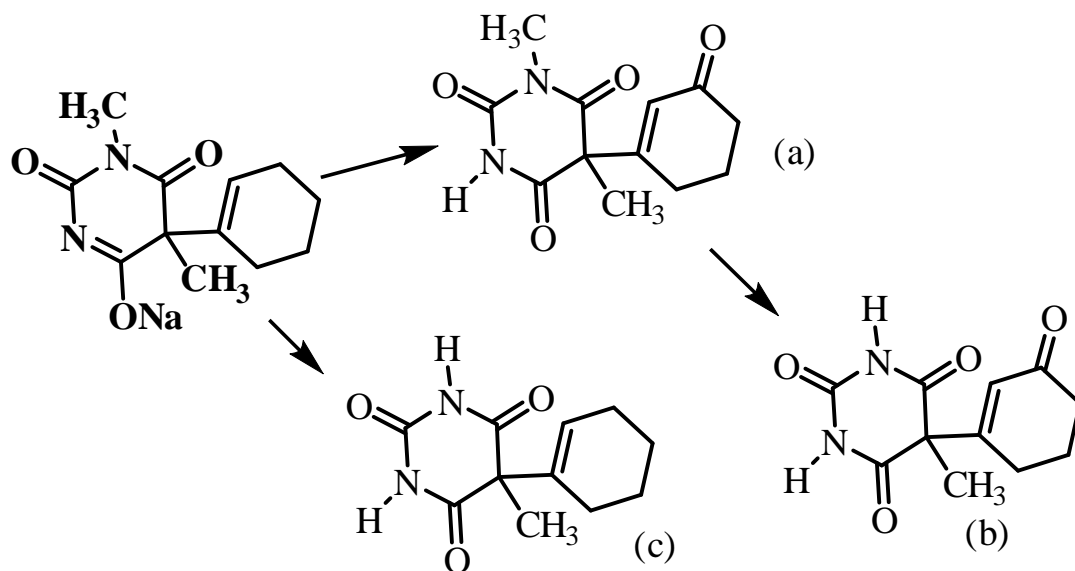
Амобарбитал натрия (барбамил, 5-изоамил-5-этилбарбитурат натрия)

Амобарбитал натрия экскретируется с мочой преимущественно в виде метаболитов: 5-этил-5-(3`-гидрокси-3`-метилбутил)-барбитуровой кислоты (а), 5-этил-5-(2`-карбоксиэтил)-барбитуровой кислоты (b) и N-глюкуронида (c).



Гексобарбитал натрия (гексенал, 1,5-диметил-5-(циклогексен-1-ил)-барбитурат натрия)

В неизменном виде с мочой выделяется не более 10% гексобарбитала натрия. Большая часть его метаболизируется до 3'-кетоциклобарбитала (3'-кетогексабарбитала) (а), который в свою очередь подвергается дальнейшему метаболизму с образованием N-дезметилпроизводного (б). Часть гексобарбитала натрия подвергается N-дезметилированию с образованием норгексобарбитала (с).



(13.8)

При легком отравлении в результате перорального приема барбитуратов назначают натрия сульфат и активированный уголь, вызывают рвоту. При тяжелых отравлениях необходимо обеспечить вентиляцию легких. Очистка организма от барбитуратов длительного и среднего действия обеспечивают форсированным диурезом и перитонеальным диализом. При отравлении барбитуратами короткого действия форсированный диурез не имеет смысла, поскольку большая часть таких барбитуратов быстро метаболизируется (10–15 мин), и помощь заключается в вентиляции легких в острый период отравления.

13.2. Изолирование барбитуратов из биоматериала

Изолирование барбитуратов из биологического материала (органы трупа) проводится частными методами (методы Швайковой, Поповой и Валова).

1. Метод изолирования водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2, предложен М. Д. Швайковой. Полученный центрифугат отделяют, создают pH 2 и экстрагируют хлороформом. Барбитураты реэкстрагируют 0,1 М NaOH, подкисляют раствором HCl до pH 2 и экстрагируют хлороформом. Исследуют хлороформные экстракты.

2. Метод изолирования водой, подкисленной серной кислотой (pH 2–3), предложила В. И. Попова. Полученное извлечение процеживают и центрифугируют. Извлечение наряду с молекулами барбитура-

тов содержит крупные молекулы белков, пептидов, нуклеиновых кислот и пр. Очистку извлечения проводят методом гель-хроматографии. Гель-хроматография основана на использовании в качестве неподвижной фазы геля (чаще всего сефадекса) – набухших полимерных частиц размером около 100 мкм с порами определенного размера, которые несколько меньше, чем размеры молекул белков и пептидов.

При пропускании элюента через колонку, заполненную гелем, мелкие частицы (в том числе и барбитураты) проникают в поры геля. Крупные частицы в поры не проникают, поэтому они проходят между частиц неподвижной фазы. Поэтому фракция элюента, содержащая крупные частицы, выходит из колонки гораздо раньше, чем фракция, содержащая мелкие частицы. За счет этого и достигается разделение.

Поскольку в процессе хроматографирования затрачиваются большие объемы элюента, концентрация производных барбитуровой кислоты в получаемых элюатах очень низкая, что не позволяет проводить качественные реакции. Поэтому после очистки извлечения проводят экстракционное концентрирование хлороформом. Затем хлороформ отгоняют при 70 °С и раствор выпаривают.

3. Метод изолирования подщелоченной водой применил П. Валов, усовершенствовала М. Д. Швайкова. Согласно этому методу биоматериал заливают 10%-ным раствором NaOH на 30 минут. Затем центрифугируют. К центрифугату прибавляют 10%-ный раствор Na₂WO₄, прибавляют 0,5 М раствор H₂SO₄ (осаждение примесей), нагревают, центрифугируют, процеживают. Затем экстрагируют эфиром, реэкстракцию проводят 10%-ным раствором NaOH, подкисляют H₂SO₄ до pH = 2 и барбитураты экстрагируют эфиром.

На исследование могут поступать и другие объекты (слюна, пот, волосы). Для отбора проб слюны и пота используют вату или марлю, а затем проводят экстракцию барбитуратов.

Анализ волос позволяет определить динамику потребления барбитуратов. Образцы волос сначала отмывают с применением воды, эфира, ацетона от потожировых выделений, а затем гомогенизируют, проводят энзиматический или кислотный гидролиз. Для выделения барбитуратов используют жидкость-жидкостную или твердофазную экстракцию.

13.3. Методы определения барбитуратов

Для обнаружения барбитуратов применяются как химические, так и инструментальные (физико-химические) методы. Химический метод основан на применении характерных цветных реакций. Различают общие и частные реакции обнаружения барбитуратов. К общим реакциям на барбитураты относятся реакции с солями кобальта в присутствии гидроксида лития или изопропиламина, с солями меди и пиридином, мурексидная проба, выделение кислотной формы барбитуратов.

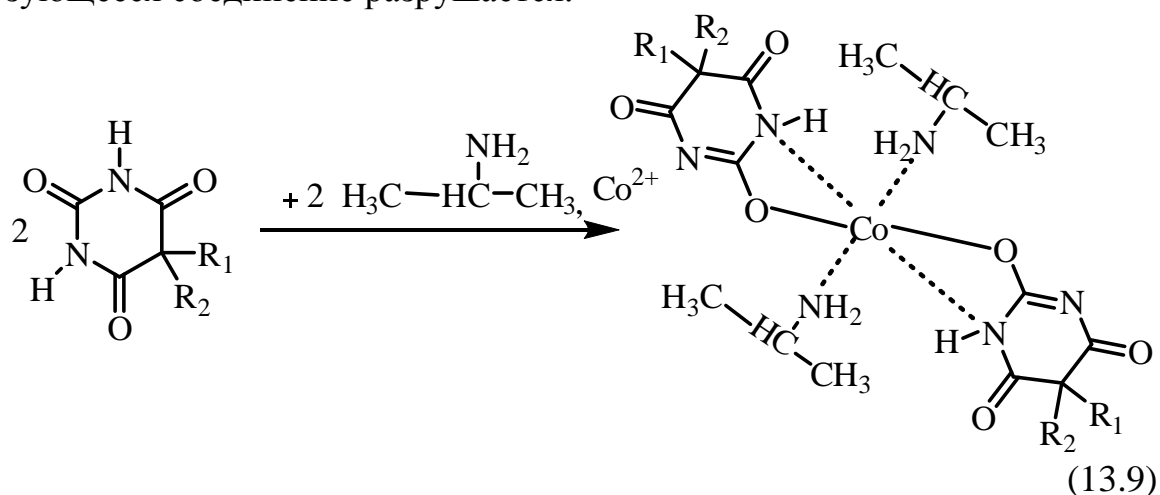
Характерные (частные) реакции барбитуратов – это микрокристаллические реакции, реакции на функциональные группы (например, фенильный радикал в молекуле фенобарбитала). Реакция образования *п*-нитрофенилбарбитуровой кислоты является специфичной на фенобарбитал. Ввиду малой чувствительности этой реакции, ее можно использовать для обнаружения фенобарбитала в таблетках, порошках.

Общие реакции обнаружения барбитуратов

Реакция с ацетатом кобальта(II) и гидроксидом лития – предварительная реакция на барбитураты для обнаружения их в моче. Для проведения реакции проводят экстракцию барбитуратов эфиром из мочи после подкисления.

Выполнение реакции: полученный эфирный экстракт из мочи упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа, прибавляют 2 капли свежеприготовленного 1% раствора ацетата кобальта(II) в метаноле, несколько капель свежеприготовленного 1% раствора гидроксида лития в метаноле и взбалтывают. При наличии барбитуратов развивается голубая окраска.

Реакция с изопропиламином и ацетатом кобальта (II) должна проводиться в безводной среде, поскольку в присутствии воды образующееся соединение разрушается.

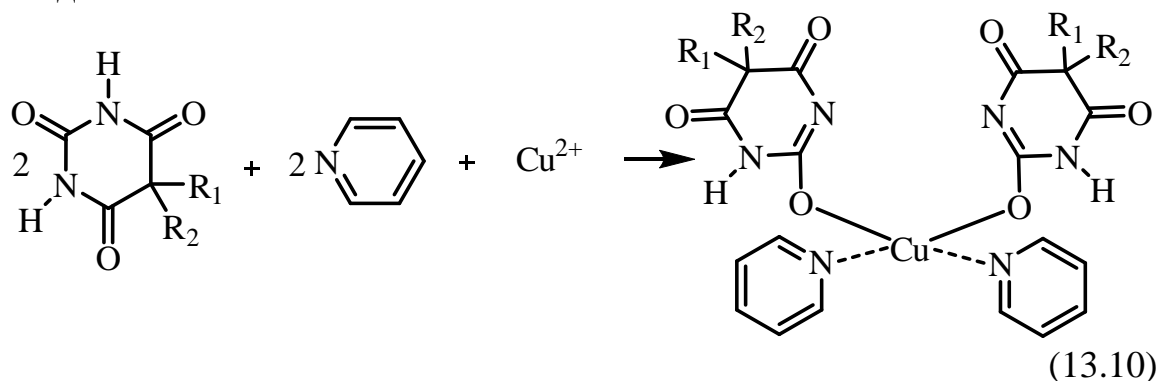


Выполнение реакции: к 1 мл хлороформного экстракта исследуемого вещества прибавляют 0,3 мл 1% раствора ацетата кобальта (II) в абсолютном этаноле и 1 мл 5% раствора изопропиламина в этаноле или метаноле. При наличии барбитуратов появляется фиолетовая окраска.

Реакции окрашивания для барбитуратов с солями кобальта мало чувствительны и неспецифичны (чувствительность – 30 мкг).

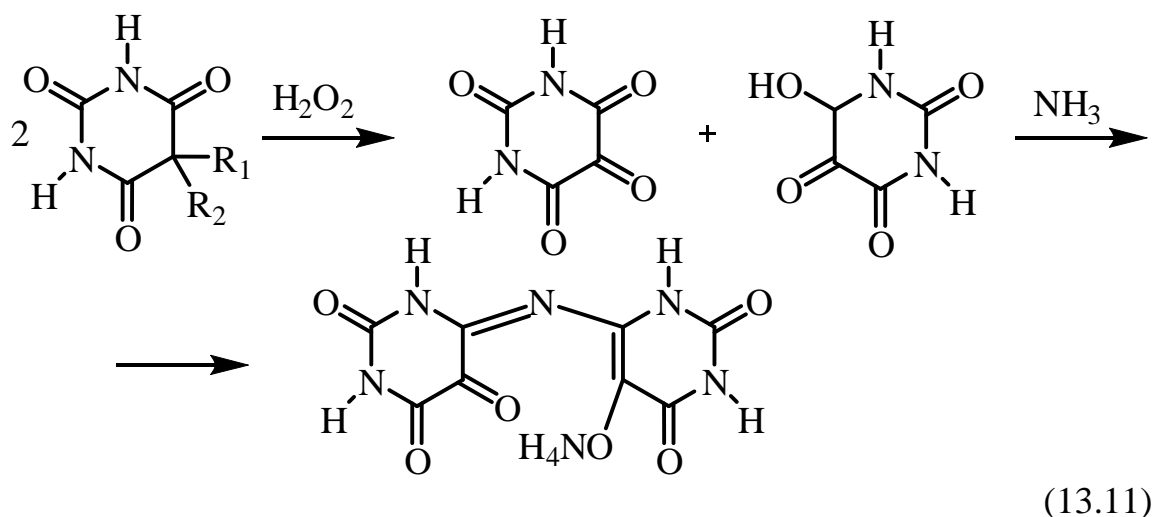
Реакция с пиридином и солями меди. В присутствии пиридина и солей меди происходит образование положительно заряженного комплексного иона $[Cu(Py)_2]^{2+}$, который, взаимодействуя с частично иони-

зированными молекулами барбитуратов, образует внутрикомплексное соединение:



Выполнение реакции: на предметное стекло наносят несколько капель раствора исследуемого вещества в хлороформе и выпаривают до суха. К сухому остатку прибавляют 2 капли 10% раствора аммиака и 1–2 капли раствора сульфата меди (II) в аммиаке и пиридине. При наличии барбитуратов в исследуемом растворе через 10–15 мин появляется кристаллический или аморфный осадок. Чувствительность реакции: 13,7 мкг (барбитал), 16,5 мкг (бутобарбитал).

Мурексидная проба. Для обнаружения барбитуратов существует несколько вариантов выполнения мурексидной реакции. Все они сводятся к использованию окислителя (пероксид водорода, бром, периодат калия и др.), а затем прибавляют раствор аммиака. Реакция характерна для барбитала, фенобарбитала, амобарбитала натрия, пентобарбитала натрия.



Методика выполнения: к сухому остатку после выпаривания исследуемого раствора прибавляют 3 капли 30% раствора пероксида водорода или несколько кристалликов периодата калия и 3 капли раствора соли Мора и хлорида аммония. Содержимое чашки нагревают до появления белых паров. После охлаждения к содержимому чашки прибавляют 3 капли 6 М раствора аммиака. При наличии барбитуратов в исследуе-

мом растворе появляется розовая окраска. Чувствительность реакции зависит от структуры барбитуратов и составляет 3–5 мг в пробе.

Выделение кислотной формы барбитуратов. На предметное стекло наносят несколько капель исследуемого хлороформного экстракта барбитурата и выпаривают при комнатной температуре. После выпаривания исследуемого раствора на то же место наносят следующую каплю этого раствора, который также выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в одной капле концентрированной серной кислоты. Через 3–5 мин после охлаждения раствора рядом с ним наносят каплю воды. Затем эти капли соединяют при помощи капилляра. Через 10–20 мин (при малых количествах барбитуратов через 1–2 часа) появляются кристаллические осадки. Для каждого барбитурата кристаллы имеют определенную форму (рис. 13.2 – 13.6).

Чувствительность реакции различна. Например, 20 мкг (амобарбитал натрия и бутобарбитал), 40 мкг (фенобарбитал), 50 мкг (пентобарбитал натрия) и 80 мкг (барбитал).

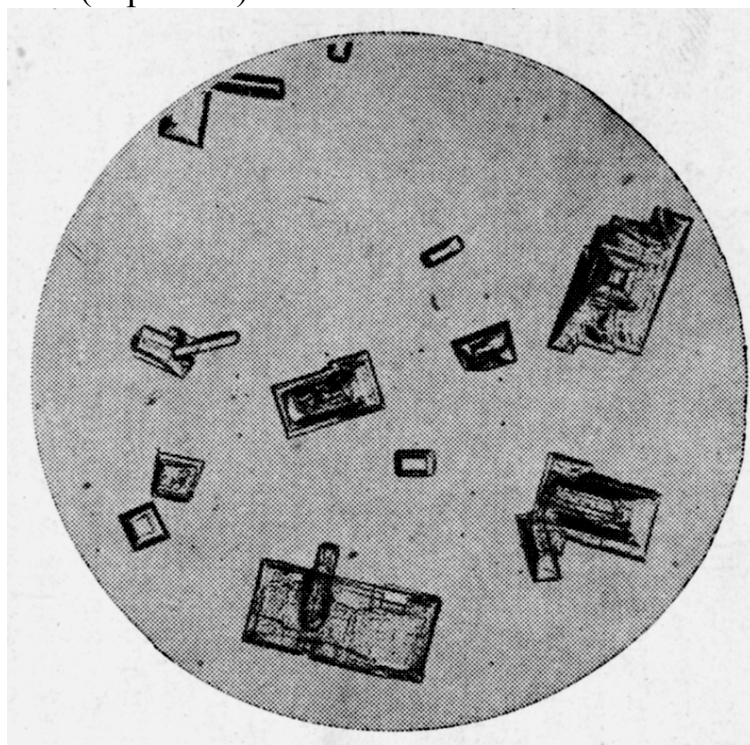


Рис. 13.2 Кристаллы кислотной формы барбитала

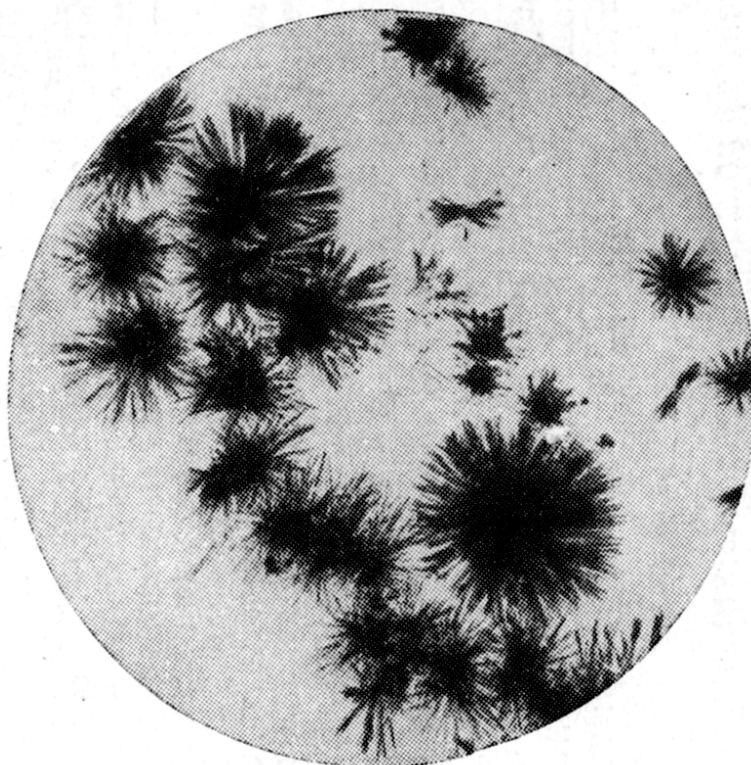


Рис. 13.3. Кристаллы кислотной формы фенобарбитала

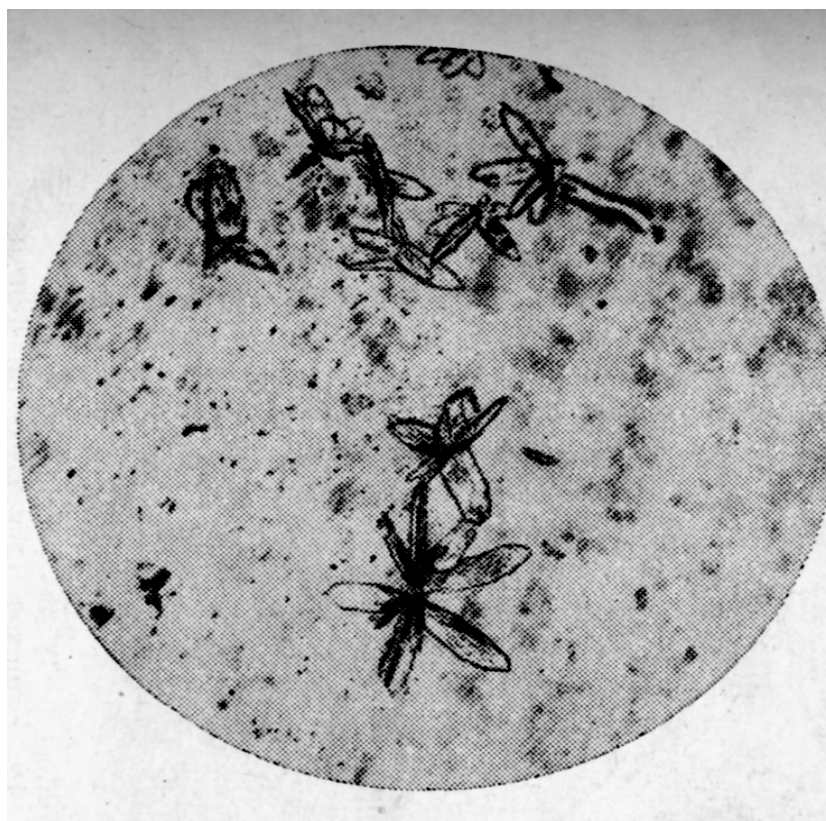


Рис. 13.4. Кристаллы кислотной формы амобарбитала натрия

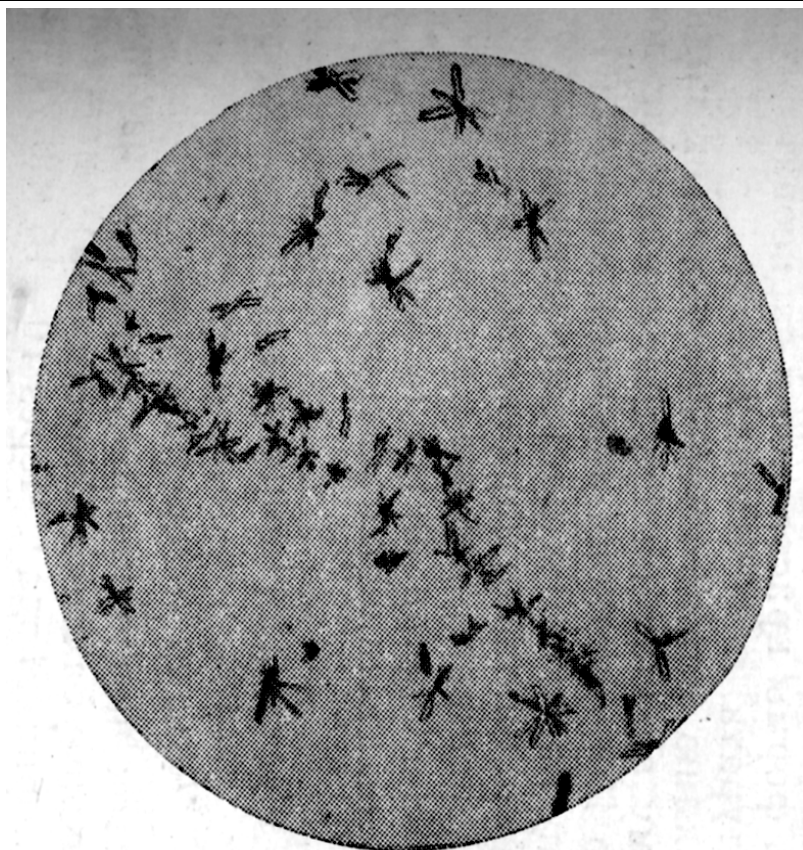


Рис. 13.5 Кристаллы кислотной формы пентобарбитала натрия

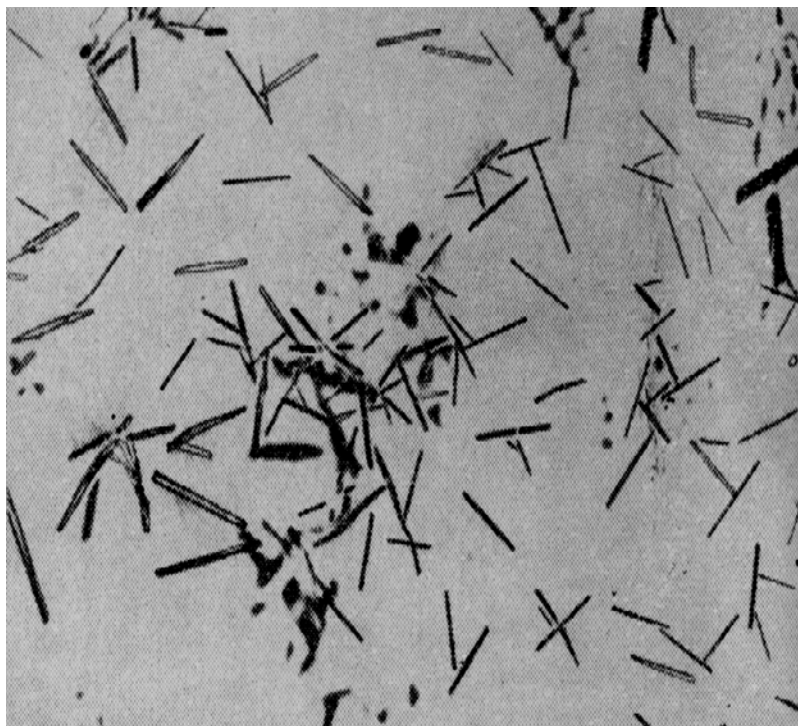


Рис. 13.6 Кристаллы кислотной формы бутобарбитала

Частные реакции обнаружения барбитуратов.

Реакция с хлорцинкиодом. На предметное стекло наносят несколько капель хлороформного экстракта исследуемого вещества и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют одну каплю раствора хлорцинкиода (смесь хлорида цинка, иода и калия иодида). Через 10–15 мин под микроскопом наблюдают кристаллы характерной формы (рис. 13.7–13.9). Чувствительность реакции – 4–6 мкг.

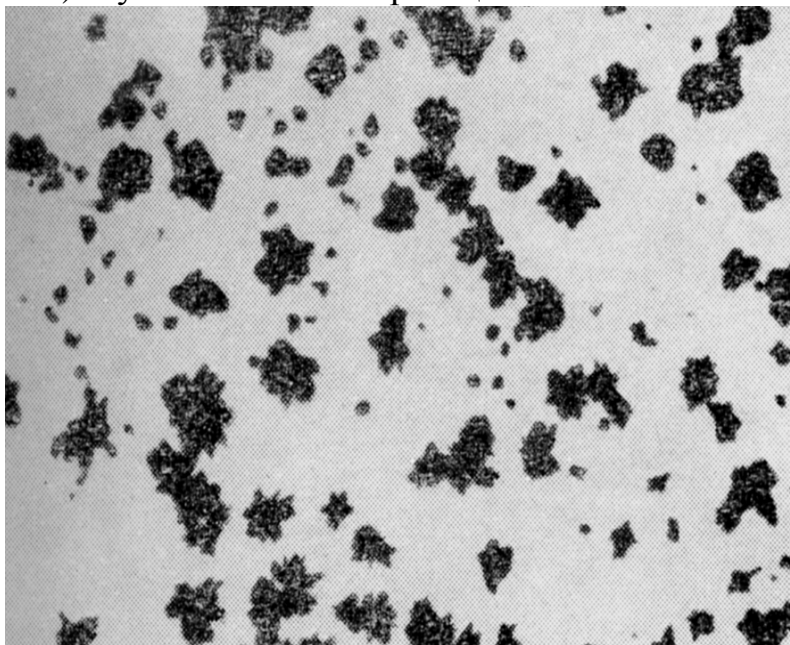


Рис. 13.7 Кристаллы продукта взаимодействия барбитала с раствором хлорцинкиода

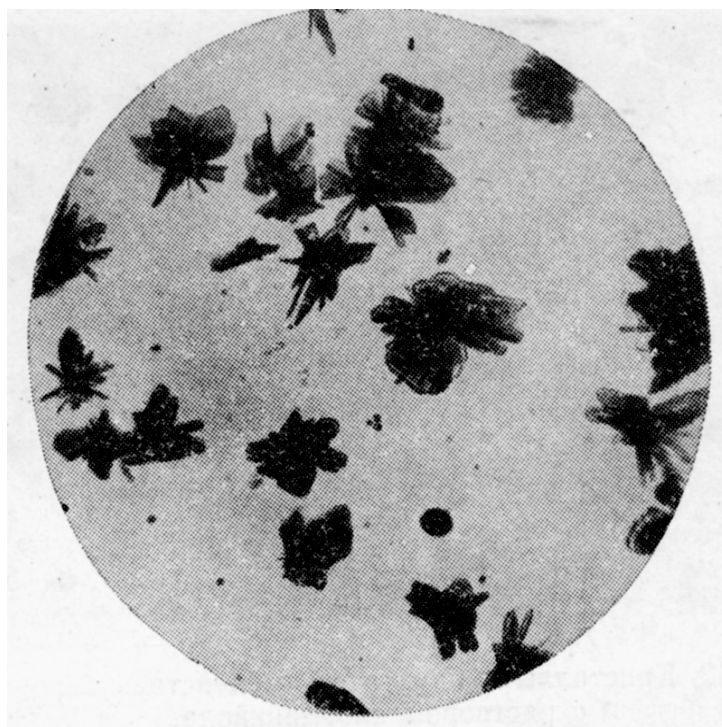


Рис. 13.8. Кристаллы продукта взаимодействия амобарбитала с раствором хлорцинкиода

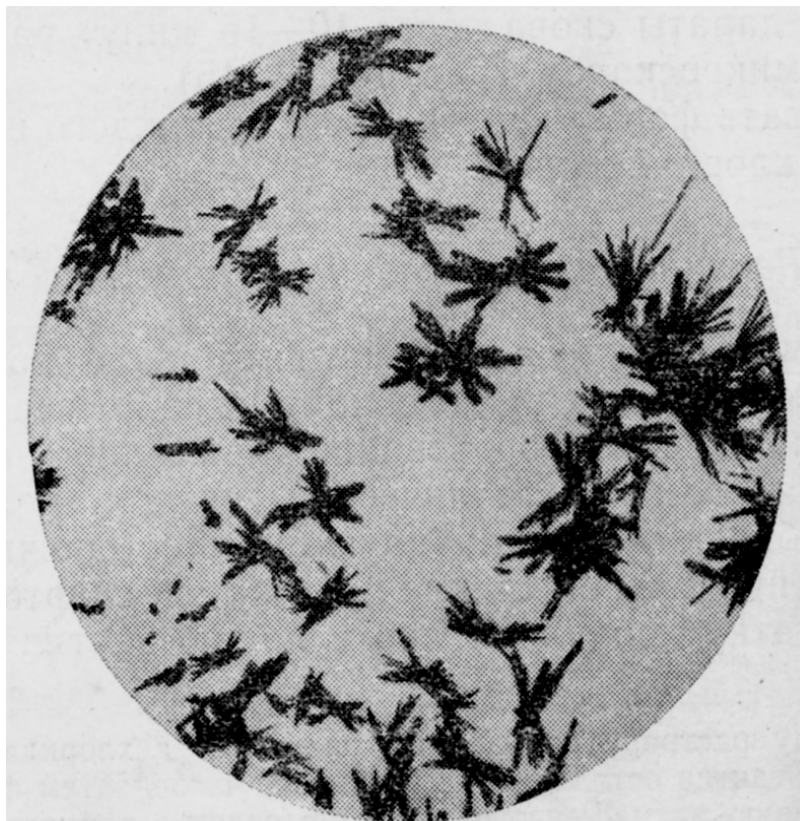


Рис. 13.9. Кристаллы продукта взаимодействия пентобарбитала натрия с раствором хлорцинкиода

Реакция с железоиодидным реактивом. На предметное стекло наносят несколько капель раствора исследуемого вещества в хлороформе. Этот раствор выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю реактива (раствор хлорида железа (III), содержащий иодид калия). При наличии барбитуратов в исследуемом растворе через 10–15 мин появляются кристаллы характерной формы (13.10–13.13).
Чувствительность реакции: 0,5 мкг (пентобарбитал натрия), 2 мкг (амобарбитал натрия), 4 мкг (фенобарбитал), 6 мкг (бутобарбитал).

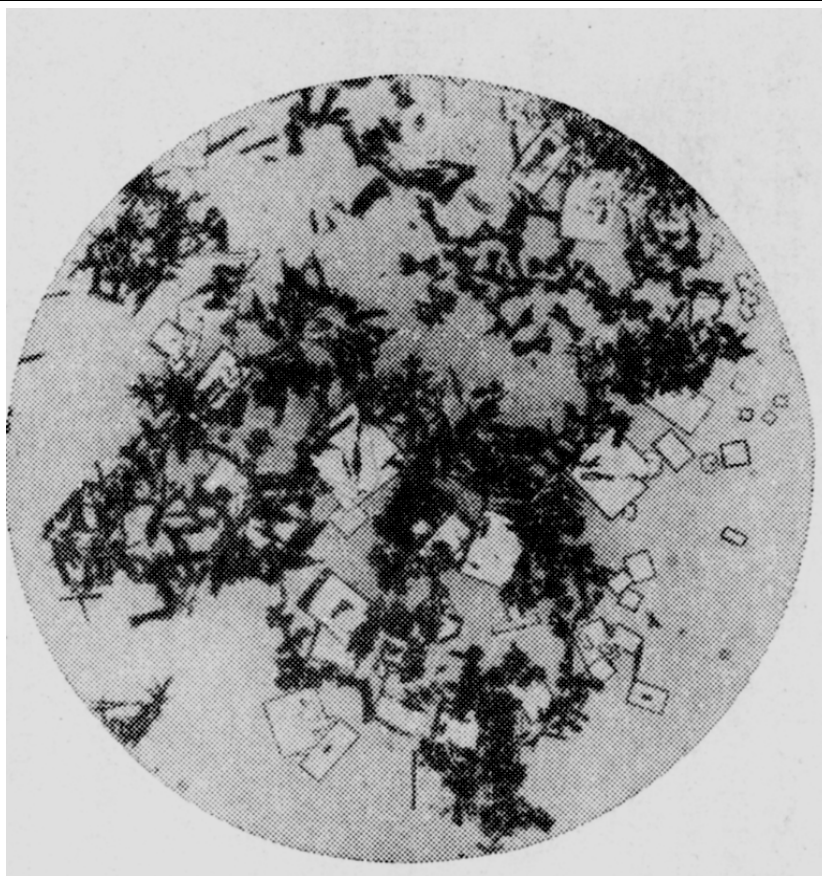


Рис. 13.10 Кристаллы продукта взаимодействия фенобарбитала с железистоидным реактивом

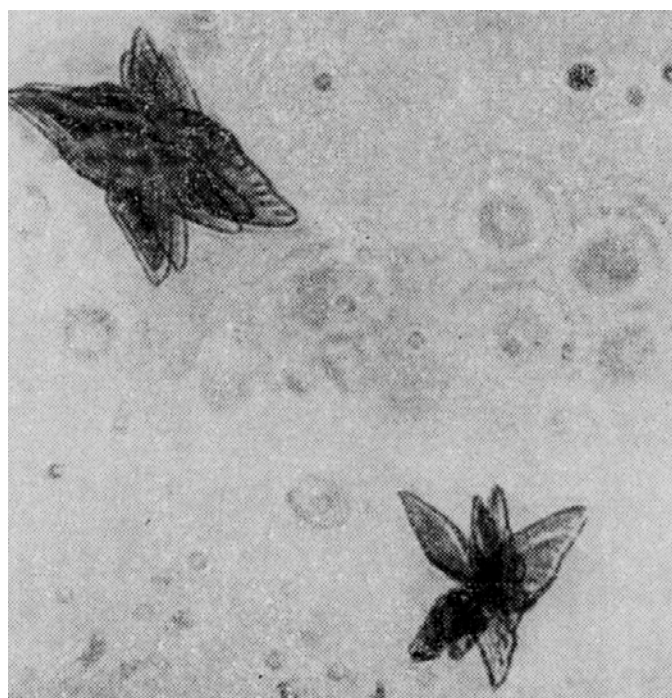


Рис. 13.11 Кристаллы продукта взаимодействия амобарбитала натрия с железистоидным реактивом

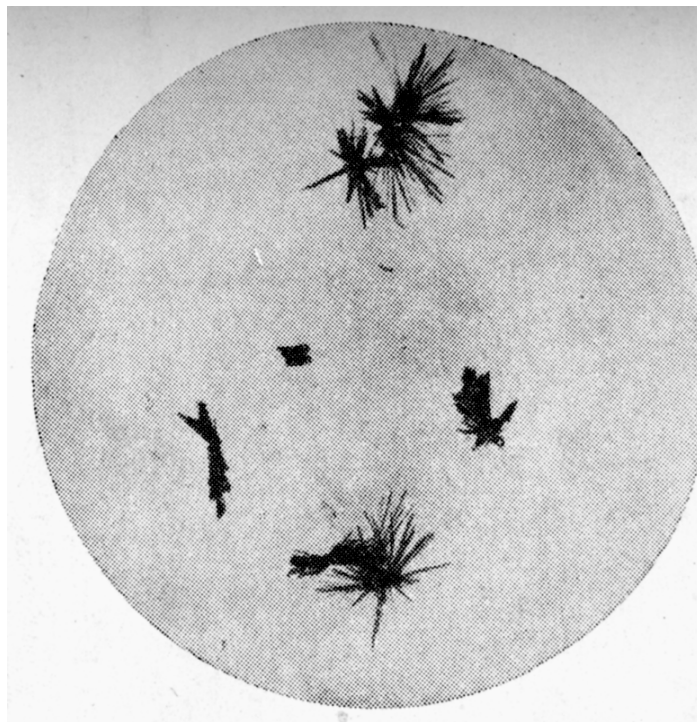


Рис. 13.12. Кристаллы продукта взаимодействия пентобарбитала натрия с железоиодидным реактивом

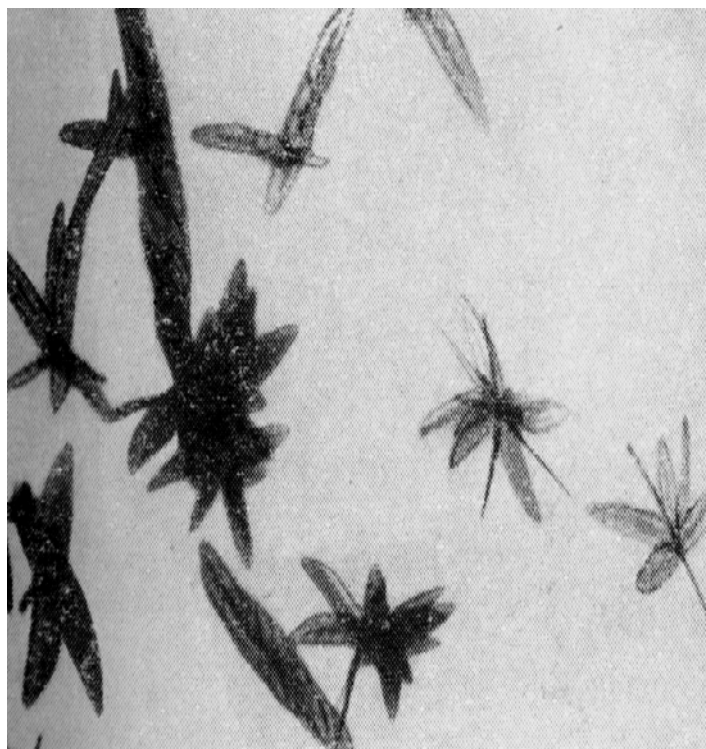
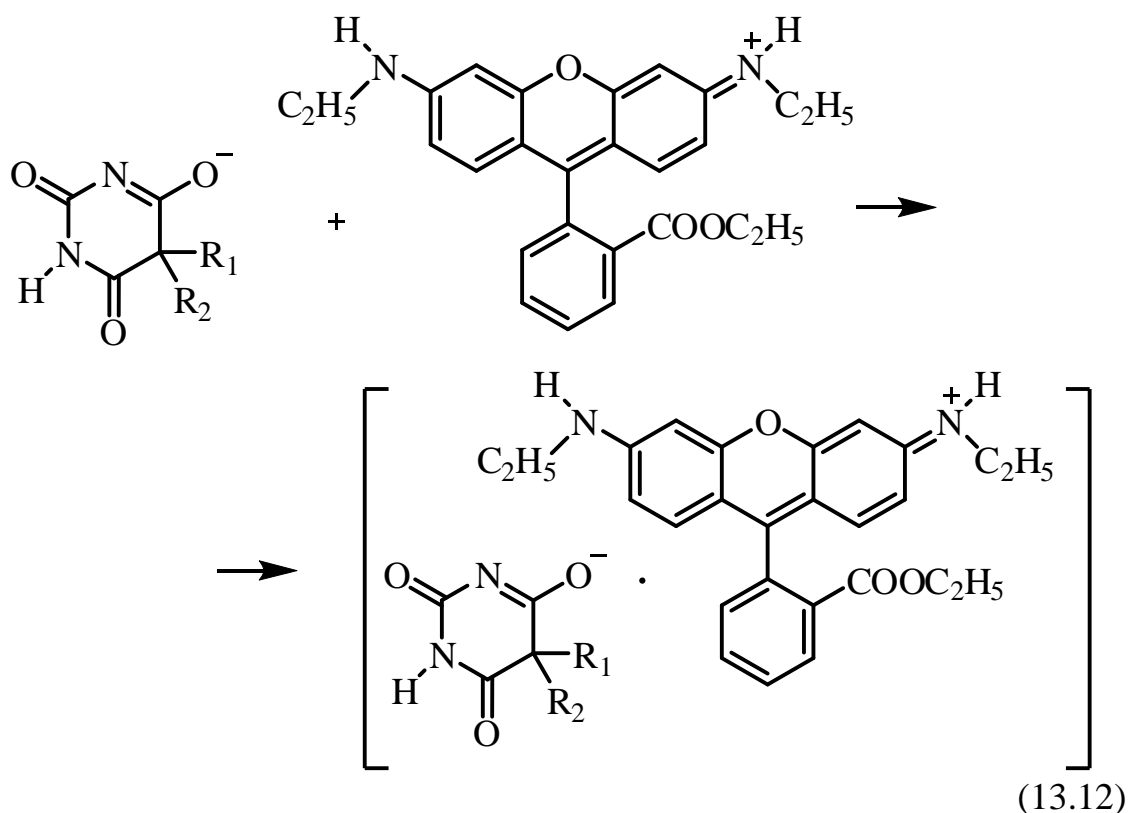


Рис. 13.13. Кристаллы продукта взаимодействия бутобарбитала с железоиодидным реактивом

Реакция с роданином бЖ. Реакция характерна для солей барбитуратов (амобарбитал натрия, гексобарбитал натрия, пентобарбитал натрия). При взаимодействии перечисленных барбитуратов с роданином бЖ образуются ионные ассоциаты, экстрагирующиеся тетрачлормета-

ном. Реакция может быть использована при анализе лекарственных средств.



Выполнение реакции: в пробирку вносят 0,1 мл водного раствора исследуемого вещества, 0,2 мл 0,1% раствора родамина 6Ж и 1 мл тетрахлорметана. Пробирку встряхивают в течение 1 мин. При наличии в растворе солей барбитуратов (амобарбитал натрия, гексобарбитал натрия, пентобарбитал натрия) органическая фаза окрашивается в светло-оранжевый или оранжево-красный цвет.

Инструментальные методы определения барбитуратов

УФ- и ИК-спектроскопия

В зависимости от значения рН раствора производные барбитуровой кислоты могут находиться в неионизированном, и ионизированном состоянии. При ионизации в структуре молекул барбитуратов появляются двойные связи, что приводит к батохромному смещению полос поглощения (рис. 13.14).

В кислой среде (рН = 2) барбитураты незначительно поглощают в области ≥ 240 нм, при значении рН 9–10 появляется полоса поглощения при длине волны около 240 нм; при значениях рН 13–14 – около 260 нм. На этом основана методика обнаружения барбитуратов по УФ-спектрам поглощения.

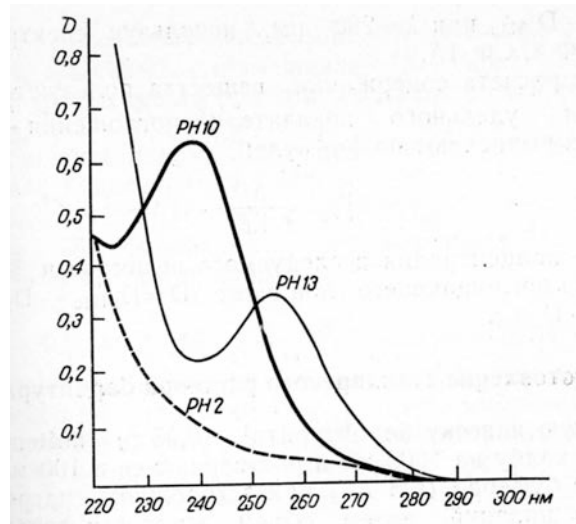


Рис. 13. 14. Спектры поглощения водного раствора барбитала при различных значениях рН

Выполнение определения: к сухому остатку после упаривания вытяжек из биоматериала прибавляют 5 мл воды. Снимают спектры поглощения полученного раствора после прибавления к нему 1 капли 2 М раствора аммиака (рН = 10), 2 капель 1 М раствора серной кислоты (рН 2) и 2–3 капли 4 М раствора гидроксида натрия (рН = 13). Изменение спектральных характеристик в зависимости от значения рН, характерное для производных барбитуровой кислоты, свидетельствует о присутствии барбитуратов в исследуемом растворе.

В таблице 13.3 представлены значения максимумов основных полос поглощения важнейших представителей барбитуратов в УФ-области.

Таблица 13.3

Максимумы основных полос поглощения некоторых барбитуратов в УФ-области

Максимумы поглощения барбитуратов в УФ-области				
Соединение	рН = 9,2		рН = 13,0	
	λ , нм	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	λ , нм	$A_{1\text{см}}^{1\%}$
Барбитал	239	549	254	427
Фенобарбитал	239	452	254	342
Амобарбитал натрия	240	445	255	364
Пентобарбитал натрий	239	438	255	327

По характеру поглощения в УФ-области спектра барбитураты относятся к 3-ей группе органических соединений (поглощение в УФ-области изменяется в зависимости от рН раствора). В щелочной среде происходит ионизация молекул барбитуратов с образованием монолактимной и дилактимной форм, имеющих максимум поглощения при 240 и 255–260 нм соответственно. Идентификация по электронным спек-

трам внутри группы производных барбитуровой кислоты практически невозможна, так как заместители R₁ и R₂ не сопряжены с хромофором и не влияют на характер поглощения.

В ИК-спектрах барбитуратов обнаруживаются характеристические частоты колебаний определенных групп атомов (таблица 13.4).

Таблица 13.4

Основные характеристические частоты ИК-спектров барбитуратов (см⁻¹)

Барбитал	Амобарбитал натрия, пентобарбитал натрия	Гексобарбитал натрия	Фенобарбитал
1680	1685	1693	1684
1720	1719	1725	1712
1767	1744	1745	1770
1320	1315	1300	1310
1245	1218	1210	
875	845	830	

Обнаружение барбитуратов методом ТСХ

Метод тонкослойной хроматографии позволяет не только обнаруживать отдельные барбитураты, но и отличать барбитураты друг от друга. Разделение обычно проводят в тонком слое силикагеля. На хроматографическую пластинку наносят исследуемое хлороформное извлечение, а рядом на линию старта растворы «свидетелей» (стандартные растворы исследуемых барбитуратов). В качестве подвижной фазы используют различные системы растворителей: хлороформ – *n*-бутанол – 25% раствор аммиака (70:40:5); хлороформ – ацетон (80:20); хлороформ – бензол – ацетон (70:15:15), этилацетат – метанол – 25% раствор NH₃ (85:10:5) и др.

Проявление хроматографических пятен осуществляют раствором сульфата или хлорида ртути (II), затем раствором дифенилкарбазида. При наличии барбитуратов наблюдают развитие окраски от сине-фиолетовой до красно-фиолетовой.

Внутригрупповую идентификацию барбитуратов осуществляют по совпадению значений R_f хроматографического пятна исследуемого хлороформного извлечения и раствора «свидетеля», либо по совпадению значений R_{st}, рассчитанного относительно метчика, и справочных значений.

Иммунохимические методы (ИФА, ПФИА, РИА) применяются для скринингового исследования мочи, крови, слюны на наличие барбитуратов. При положительном результате обязательно проводят подтверждающие исследования с применением других методов.

Метод *газовой хроматографии* применяется как для идентификации, так и для количественного определения барбитуратов без их де-

риватизации. Эфирный экстракт из подкисленного объекта (моча, рН 1–2) упаривают, сухой остаток растворяют в 50 мкл 5% раствора изоамилового спирта в нонане (детектор – пламенно-ионизационный или азотно-фосфорный). В ряде случаев проводится дериватизация с применением метилирующих или ацетилирующих реактивов.

Определение барбитуратов *методом ВЭЖХ* проводят в большинстве случаев с обращенно-фазовыми сорбентами C_8 или C_{18} . Подвижные фазы – это смеси метанола и фосфатного буферного раствора, ацетонитрила и воды дистиллированной, или смеси, содержащие несколько органических растворителей.

Количественное определение барбитуратов методом УФ-спектрометрии возможно как способами прямой, так и дифференциальной УФ-спектрометрии. В первом случае измеряют оптическую плотность растворов при 240 нм и рН = 10. Способ дифференциальной УФ-спектрометрии барбитуратов основан на определении разности $A(\text{pH } 10) - A(\text{pH } 2)$ при 240 нм или $A(\text{pH } 13) - A(\text{pH } 10)$ при 260 нм и построении соответствующего градуировочного графика.

ГЛАВА 14

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЕЩЕСТВ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА

14.1. Общая характеристика веществ основного характера

Органические вещества, экстрагируемые неполярными органическими растворителями из щелочной среды, делятся на две большие группы. Главное место при химико-токсикологическом исследовании принадлежит алкалоидам и их синтетическим аналогам (этилморфин, героин). В последние годы заметно возросло химико-токсикологическое значение и другой группы синтетических азотистых оснований, и в особенности, производных фенотиазина и 1,4-бензодиазепина. Подавляющее большинство представителей обеих групп относится к лекарственным средствам, острые отравления которыми занимают одно из ведущих мест среди бытовых интоксикаций химической этиологии в большинстве стран мира. Сложная клиническая симптоматика при отравлениях и отсутствие характерной патологоанатомической картины резко повышают значимость химических методов анализа.

Алкалоиды – это органические азотсодержащие основания сложного состава, встречающиеся в растительных (реже в животных) организмах и обладающие сильным фармакологическим действием.

Алкалоиды проявляют физиологический эффект уже в очень малых количествах, в связи с чем при определенных условиях они являются токсичными. Большому числу отравлений способствует также и легкая доступность их из-за широкого распространения в природе алкалоидоносных растений. Употребление в пищу частей растений, содержащих алкалоиды, детьми или животными часто является причиной отравлений, заканчивающихся смертельным исходом. Вторым источником отравлений является передозировка лекарственных средств, содержащих алкалоиды.

Химико-токсикологическое исследование биологического материала на наличие алкалоидов и синтетических азотистых оснований

относится к числу сложных и трудоемких. Основными этапами анализа являются:

- извлечение лекарственных веществ из биоматериала;
- очистка и концентрирование полученных извлечений;
- ТСХ- или химический скрининг (имеет отрицательное судебно-химическое значение);
- подтверждающее исследование с использованием химических и физико-химических методов;
- количественное определение алкалоидов и синтетических азотистых оснований.

14.2. Физико-химические свойства

Основания алкалоидов в большинстве случаев представляют собой кристаллические, реже аморфные твердые вещества. Некоторые основания, например, кониина, ареколина, никотина и анабазина, являются жидкостями. Большинство оснований алкалоидов мало растворимы в воде и растворимы в органических растворителях (спирт, эфир, хлороформ). Жидкие алкалоиды, в отличие от большинства соединений этого класса, хорошо растворяются в воде даже в виде оснований.

Водные растворы оснований имеют щелочную реакцию на лакмус, а атропина и кодеина даже на фенолфталеин. Степень основности алкалоидов характеризуется показателем кислотности сопряженной кислоты pK_{BH^+} , который имеет тем большую величину, чем сильнее основные свойства алкалоидов (папаверин имеет $pK_{BH^+} = 6$, атропин – $pK_{BH^+} = 9,8$).

Взаимодействуя с кислотами, алкалоиды образуют соли по типу солей аммиака и аминов. Соли алкалоидов с минеральными (H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4) или органическими (виннокаменная, щавелевая, лимонная) кислотами за редким исключением растворяются в воде, а иногда и в полярных органических растворителях (метанол, этанол), но, в большинстве случаев, нерастворимы в эфире, углеводородах и их галогенпроизводных.

Гидрохлориды кокаина, папаверина, производных фенотиазина растворяются в хлороформе и поэтому в процессе извлечения они могут частично экстрагироваться им из кислых водных растворов. То же относится к гидробромидам скополамина и хинина. В противоположность этому, основание морфина не растворяется в эфире, что необходимо учитывать при химико-токсикологическом исследовании.

Некоторые из алкалоидов образуют легко гидролизующиеся соли, которые при извлечении органическими растворителями из кислой вытяжки переходят в органический растворитель, особенно при недос-

таточном подкислении. Так ведут себя кофеин, теобромин, наркотин, папаверин и, отчасти, стрихнин и бруцин.

Щелочи взаимодействуют с солями алкалоидов с выделением последних в виде оснований, которые затем экстрагируют органическими растворителями.

Алкалоиды, содержащие в своем составе фенольный гидроксил или другие кислотные центры (морфин, сальсолин), со щелочами образуют соли, растворимые в воде и не экстрагируемые неполярными органическими растворителями. Для их экстракции используют относительно полярные органические растворители, такие как изоамиловый спирт (при рН 8,5–9,5 экстрагируется 73–75% морфина). Чаще алкалоиды–амфолиты экстрагируют смесью полярного и неполярного органического растворителя при

$$\text{pH} = \frac{\text{pK}_a + \text{pK}_{\text{BH}^+}}{2} \quad (14.1)$$

14.3. Факторы, влияющие на степень экстракции

Степень экстракции алкалоидов из биологических объектов зависит от рН среды, температуры, природы органических экстрагентов, присутствия электролитов и других факторов.

От **изменения температуры** зависят константы ионизации и распределения веществ. Зависимость константы распределения веществ между экстрагентом и водой от температуры объясняется несколькими причинами: с изменением температуры изменяется растворимость вещества в каждой фазе, температура влияет на взаимную растворимость органической и водной фаз, температура влияет на способность вещества димеризоваться. Повышение температуры может вызывать увеличение, либо уменьшение констант распределения одного и того же вещества при экстракции разными экстрагентами. Например, константы распределения фенола для менее активных экстрагентов (бензол, нитробензол) возрастают с повышением температуры, а для более активных экстрагентов (амилацетат, гексиловый спирт) – уменьшаются. Это связано с разным характером сил, действующих между молекулами экстрагента и экстрагируемого вещества.

В зависимости от **рН** изменяется состояние вещества в растворе. Недиссоциированные молекулы вещества легко переходят в органическую фазу, а ионы остаются в водной фазе. В таблице 14.1 показана зависимость степени экстракции некоторых алкалоидов от рН раствора и природы органического растворителя.

Таблица 14.1

Зависимость экстракции некоторых алкалоидов от рН и природы экстрагента (по В. Ф. Крамаренко)

Алкалоид	Экстрагент	Оптимальный интервал рН	Степень экстракции, %
Атропин	Дихлорэтан	9,5-11,5	90-93
	Хлороформ	9,0-11,5	82-85
	Бензол	10,5-12,0	72-75
	Эфир	9,5-12,0	53-60
	Петролейный эфир	9,0-12,0	25-30
Бруцин	Хлороформ	7,5-12,0	92-96
	Эфир		11-13
	Бензол		93-96
	Изоамиловый спирт		94-98
	Бензин		7-8
Кодеин	Хлороформ	8,0-8,5	86-88
	Бензол	8,0-8,5	77-80
	Эфир	8,0-8,5	25-29
	Изоамиловый спирт	8,0-8,5	83-85
Кокаин	Хлороформ	7,0-8,5	80-83
	Эфир	8,0-8,5	57-62
	Бензол	7,0-8,5	68-70
	Изоамиловый спирт	8,0-8,5	52-55
Кофеин	Хлороформ	4,0-5,5	96-98
	Дихлорэтан	4,0-5,5	82-86
	Диэтиловый эфир	4,0-5,5	3-4

Глава 14. Химико-токсикологический анализ веществ основного характера

Морфин	Хлороформ	8,6-10,2	28-30
	Эфир	8,0-9,0	8-9
	Бензол	8,5-9,5	4-5
	Изоамиловый спирт	8,5-9,5	73-75
Скополамин	Хлороформ	8,75-10,5	88-90
	Эфир	9,75-10,5	40-43
	Бензол	9,0-10,0	76-78
	Дихлорэтан	9,5-11,0	86-90
	Петролейный эфир	7,0-12,0	3-5
Стрихнин	Хлороформ	8,9-12,0	92-94
	Эфир	9,8-12,0	63-65
	Бензол	8,9-12,0	89-91
	Изоамиловый спирт	9,0-12,0	96-98
Теобромин	Хлороформ	4,0-7,0	32-37
	Дихлорэтан	6,1-8,0	12-22
	Диэтиловый эфир	4,0-7,0	4-6
Хинин	Хлороформ	9,0-10,0	79-82
	Эфир	9,0-10,0	38-48
	Бензол	9,0-10,0	65-67
	Изоамиловый спирт	9,0-10,0	83-85

В присутствии **электролитов** может происходить высаливание, т.е. понижение растворимости в воде и повышение экстрагируемости органическими растворителями из водных растворов.

Эффект высаливания связан с увеличением коэффициента распределения вещества, при всаливании – уменьшается коэффициент распределения. Высаливающее действие солей объясняется разными причинами. Соли снижают диэлектрическую проницаемость водного

раствора и соответственно изменяется растворимость веществ. Вследствие гидратации соли уменьшается количество несвязанной воды, что также приводит к уменьшению растворимости вещества в воде. Высаливающее действие ионов связано с их радиусами. Ионы малого радиуса имеют большую плотность заряда и лучше гидратируются по сравнению с крупными ионами такого же заряда. Поэтому высаливающее действие ионов лития и натрия больше, чем ионов калия, а ионов фтора и хлора больше, чем ионов брома и иода. С уменьшением радиуса иона увеличивается угол наклона прямой, характеризующей эффективность высаливающего действия солей.

Высаливающее действие зависит как от природы высаливателей, так и от свойств высаливаемого вещества. Например, наблюдается такая зависимость:

- для веществ кислотного характера ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$);
- для веществ основного характера ($\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$).

Для практических целей важно, что введение солей в водную фазу влияет на полноту извлечения.

Высаливающим действием обладают не только соли, но и некоторые неэлектролиты (этанол повышает степень экстракции уксусной кислоты этилацетатом).

Высаливающим действием обладают как неорганические, так и органические вещества, хорошо растворимые в воде (карбамид, уротропин, этиленгликоль, растворимые соли высших жирных кислот). Высаливающее действие соли повышается с увеличением числа атомов углерода в молекуле алифатической карбоновой кислоты. Ионы (ClO_4^- , NR_4^+ и другие) разрушают структуру воды (отрицательная гидратация) и вызывают высаливающий эффект.

Для извлечения алкалоидов из биоматериала при общем судебно-химическом исследовании используют методы Стаса – Отто (для гнилостного материала) и метод Васильевой (для растительного и свежего биоматериала). При направленном анализе, как правило, используются методы Крамаренко или Карташова.

14.4. Методы изолирования веществ основного характера

В. Ф. Крамаренко с сотрудниками исследовал влияние различных факторов на полноту извлечения алкалоидов:

- рН среды и природы кислоты на изолирование алкалоидов водой из биологических объектов;
- влияние рН среды и природы органического растворителя;
- влияние электролита на полноту экстрагирования.

Алкалоиды, введенные в организм, подвергаются различным превращениям: гидролизу, окислению, восстановлению и т.д. Только

немногие алкалоиды выделяются из организма в неизменном виде. Одним из свойств алкалоидов является способность их вступать во взаимодействие с молекулами белков и образовывать комплексы, неизоллируемые или мало изоллируемые водой. Реакция взаимодействия алкалоидов с белками протекает при величине рН 4–5, т.е. в слабокислой среде. С повышением рН возможность связывания алкалоидов с белками увеличивается, а это значит, что комплексообразование между алкалоидами и белками возможно и в живом организме (рН крови 7,3–7,5) и в трупе (рН 6,2 и выше). Чтобы изоллировать алкалоиды из биологического материала, необходимо разрушить комплекс «алкалоид-белок». По результатам работ В.Ф. Крамаренко оптимальным является рН 2,5–3, так как в этой области рН белки и алкалоиды имеют положительный заряд и не взаимодействуют друг с другом. В области рН выше изоэлектрической точки белки имеют отрицательный заряд и взаимодействуют с катионами алкалоидов. Изоэлектрическая точка белков зависит от их природы. Например, для сывороточного альбумина изоэлектрическая точка соответствует рН = 4,8, β-глобулина – рН = 5,2, γ-глобулина – рН = 6,4, фибриногена – рН = 5,4. Алкалоиды, освобожденные из комплекса белок-алкалоид, экстрагируют из водных растворов органическими растворителями. Слабоосновные алкалоиды (например, кофеин) экстрагируются из водных растворов органическими растворителями даже из кислой среды. Алкалоиды со сравнительно большой величиной константы ионизации – кодеин и другие экстрагируют из щелочных растворов.

В результате проведенных исследований В. Ф. Крамаренко разработал **общий и частный методы** изоллирования алкалоидов подкисленной водой (см. Приложения).

Частный метод В. Ф. Крамаренко: к 100 г биоматериала прибавляют 0,01 М раствор H_2SO_4 , оставляют на 2 часа, процеживают. Затем еще дважды повторяют извлечение. Кислые вытяжки соединяют и центрифугируют. Сливают надосадочную жидкость, остаток заливают 0,01 М раствором H_2SO_4 на 2 часа и центрифугируют. Центрифугаты объединяют. Далее поступают в зависимости от того свежий или загнивший биоматериал: если биоматериал загнивший, то к центрифугату прибавляют сульфат аммония до насыщения. Через 1–2 часа осадок отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость сливают, если необходимо – подкисляют до рН = 2–2,5 и взбалтывают дважды с эфиром. Эфирные вытяжки не исследуют (содержат примеси). Кислую водную фазу подщелачивают 20% раствором NaOH до рН 8,5–9,0 и три раза экстрагируют хлороформом. Хлороформные вытяжки фильтруют и выпаривают. Остаток растворяют в 0,1 М растворе HCl.

Если биоматериал не загнивший, то прибавлять сульфат аммония не нужно. Примеси экстрагируют эфиром дважды из кислой среды. За-

тем так же подщелачивают и экстрагируют алкалоиды хлороформом. Хлороформ выпаривают на воздухе, остаток растворяют в 10 мл 0,1M HCl. Возможны потери веществ, экстрагируемых эфиром из кислой среды.

Эфирный экстракт из кислой среды (по методу В. Ф. Крамаренко) содержит вещества кислотного характера, что позволяет применять этот метод и **при общем анализе**.

В работах В. Ф. Крамаренко установлено, что для веществ слабоосновного характера оптимальным значением pH экстракции является pH 4–5. При исследовании биологического материала на вещества слабоосновного и основного характера после изолирования веществ подкисленной водой сначала проводят экстракцию веществ слабоосновного характера при pH 4–5, а затем экстрагируют вещества основного характера при pH 8,5–9. Такой метод изолирования веществ известен в литературе как «общий метод изолирования алкалоидов».

Из других частных методов изолирования алкалоидов следует отметить метод изолирования алкалоидов и синтетических азотистых оснований, который основан на изолировании 100% алкалоидов нейтральным ацетоном. Из кислой и щелочной сред изолируется ацетоном соответственно 82% и 89% алкалоидов. Извлечение из нейтральной среды подщелачивают и экстрагируют алкалоиды хлороформом.

Лучшими органическими растворителями для экстракции алкалоидов являются хлороформ и изоамиловый спирт. Недостатками изоамилового спирта являются высокая температура кипения, токсичность, экстракция примесей. В некоторых случаях степень экстракции дихлорэтаном значительно выше, чем хлороформом. Например, дихлорэтан экстрагирует 90–93% атропина, а хлороформ – 80–85%.

На степень извлечения алкалоидов влияют электролиты (NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), извлечение в присутствии электролитов лучше.

Кроме описанных методов изолирования алкалоидов применяется и перегонка с водяным паром: например, так изолируют ареколин, никотин, конииин. Затем их экстрагируют из дистиллята органическими растворителями. Предложены и другие методы (приемы) изолирования. Например, предлагается разрушать клетки биоматериала путем замораживания, действием ферментов, растиранием с песком и настаиванием с водой, подкисленной серной кислотой.

14.5. Общие методы анализа

Анализ полученного извлечения начинают с предварительного исследования, имеющего, как правило, отрицательное судебно-химическое значение и, вместе с тем, обладающего высокой чувствительностью и экспрессностью. Наиболее часто для этой цели исполь-

зуют хроматографический скрининг, базирующийся на ТСХ, ГЖХ или химический, основанный на использовании общеалкалоидных реактивов.

Применение общеалкалоидных реактивов основано на свойстве алкалоидов как оснований давать простые или комплексные соли с кислотами, солями тяжелых металлов, комплексными иодидами и другими веществами.

Общие реактивы, осаждающие алкалоиды, можно разделить на две группы:

1. Реактивы, образующие с алкалоидами простые соли (таннин, пикриновая, хромовая кислоты).

2. Реактивы, дающие с алкалоидами комплексные соли, которые в свою очередь подразделяются на:

А) реактивы, содержащие в своем составе неметаллы:

I_2+KI : реактив Бушарда (1,27% I_2), реактив Вагнера – 2% I_2 ;

Br_2+KBr .

Б) реактивы, содержащие в своем составе металлы:

$H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$ – реактив Зонненштейна (фосфорномолибденовая кислота);

$H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$ – реактив Шейблера (фосфорновольфрамовая кислота);

кремневольфрамовая кислота;

(CdI_2+KI) – реактив Марме;

(BiI_3+KI) – реактив Драгендорфа;

(HgI_2+KI) – реактив Майера;

ZnI_2+KI , H_2PtCl_6 , $K_3[Fe(CN)_6]$, $K_4[Fe(CN)_6]$, $HgCl_2$ и многие др.

Чувствительность этих реактивов различна по отношению к различным алкалоидам. Фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты являются наиболее чувствительными осадительными реактивами (см. «Приложения»). Наименее чувствительными являются таннин и пикриновая кислота. Кроме алкалоидов и синтетических азотистых оснований с осадительными реактивами могут давать труднорастворимые осадки белки и продукты их распада, поэтому вышеприведенные реакции рассматриваются как предварительное исследование, способное лишь определенным образом сориентировать эксперта-химика. Положительный результат указывает на необходимость дальнейшего исследования на наличие алкалоидов другими методами.

14.6. Подтверждающие методы анализа

К подтверждающим методам относятся:

1. *Микрориспаллоскопические реакции.* В качестве реактивов используют, в основном, осадительные реактивы, например, реактив

Драгендорфа на никотин, анабазин. Необходимо учитывать, что форма кристаллов зависит от многих факторов: концентрации исследуемого вещества и реактива, чистоты извлечения, температуры, рН, порядка прибавления реактивов, полиморфизма образующихся кристаллов и т.д. Ввиду этого микрокристаллоскопические реакции имеют ограниченное применение.

2. Реакции окрашивания.

В основе реакций окрашивания лежат следующие процессы:

- отнятие воды концентрированной серной кислотой;
- окисление $K_2Cr_2O_7$ в кислой среде (стрихнин);
- одновременное отнятие воды и окисление;
- конденсация с альдегидами в присутствии концентрированной серной кислоты (поглощает воду);
- функциональный анализ (на вещества, содержащие фенольный гидроксил, характерна реакция с $FeCl_3$).

Для проведения указанных реакций используют следующие реактивы:

- концентрированная серная кислота,
- концентрированная азотная кислота,
- реактив Эрдмана: конц. $H_2SO_4 + 30\% HNO_3$,
- реактив Фреде: конц. $H_2SO_4 +$ молибденовая кислота,
- реактив Манделина: конц. $H_2SO_4 +$ ванадиевая кислота,
- реактив Марки: конц. $H_2SO_4 +$ формалин.

Эти реакции в ряде случаев позволяют обнаружить отдельные группы алкалоидов (реактив Марки на производные фенантренизохинолина, конц. HNO_3 на бруцин (крово-красное окрашивание)).

При проведении хромогенных реакций полученные окраски необходимо сравнивать с окраской, образованной веществами сравнения (метчиками), так как хромогенные реакции не являются специфичными. Хромогенные реагенты могут взаимодействовать и с другими (сопутствующими) веществами с образованием сходной окраски.

3. Инструментальные (физико-химические) методы анализа.

В настоящее время в связи с прогрессом в развитии аналитического оборудования данная группа методов является наиболее чувствительной и доказательной. Сюда можно отнести: спектрометрические методы (УФ- и ИК-спектрометрия, флуориметрия), ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, радиорецепторный и иммунохимические методы анализа.

В ряде случаев фармакологические (физиологические) испытания являются более чувствительными и специфичными, чем химические методы анализа. Токсикологическое значение имеют фармакологические пробы на тропановые алкалоиды, никотин, стрихнин. В «Приложении» приводятся примеры действия некоторых ядовитых веществ на организм животных.

14.7. Количественное определение

Вопрос о целесообразности количественного определения алкалоидов при химико-токсикологическом исследовании следует рассматривать с двух позиций:

1. В случаях, когда объектами исследования являются лекарственные средства (таблетки, растворы для инъекций, субстанции); растительные объекты, содержащие алкалоиды, количественное определение алкалоидов в них обязательно и проводится по методикам ГФ и другими традиционными методами (экстракционная фотометрия, спектрофотометрия, хроматографические и другие методы).

2. Если объектами химико-токсикологического исследования являлись органы трупа или биологические жидкости, изолирование из которых связано с большими трудностями, количественное определение алкалоидов в таких случаях из-за больших потерь не всегда отражает их действительное количество. Кроме того следует учитывать, что токсические вещества распределяются неравномерно в органах и тканях организма, а также подвергаются метаболизму. Из методов количественного определения алкалоидов можно выделить спектрометрические, хроматографические (ГЖХ, ВЭЖХ), белоксвязывающие (иммуноферментный, радиорецепторный). Из спектрометрических методов применяются в основном молекулярно-абсорбционные (различные варианты экстракционной и безэкстракционной фотометрии) и молекулярно-эмиссионные (флуориметрия).

14.8. Классификация веществ основного характера

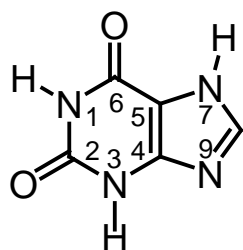
Одной из общепринятых классификаций алкалоидов является классификация по химическому строению. Токсикологический интерес приобрели следующие группы алкалоидов:

1. Производные пиридина и пиперидина (никотин, анабазин, пахикарпин).
2. Производные тропана (атропин, кокаин, скополамин).
3. Производные хинолина (хинин).
4. Производные фенантренизохинолина (морфин, кодеин, этилморфин, героин).
5. Производные индола (стрихнин, бруцин).
6. Производные ксантина (кофеин, теofilлин, теобромин).
7. Ациклические алкалоиды (эфедрин).
8. Производные изохинолина (папаверин).

К синтетическим азотистым основаниям, имеющим токсикологическое значение, относятся: производные *para*-аминобензойной кислоты, фенотиазина, 1,4-бензодиазепина, пиперидина, фенилалкиламины и др.

14.9. Алкалоиды, производные ксантина

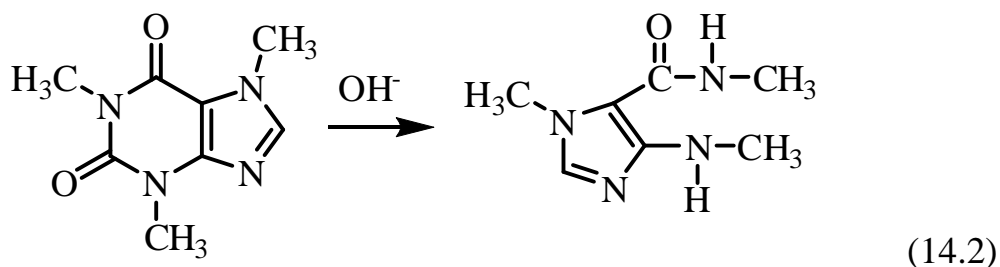
К производным ксантина относятся кофеин (1,3,7-триметилксантин), теofilлин (1,3-диметилксантин), теобромин (3,7-диметилксантин).



Ксантин

14.9.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных ксантина

Производные ксантина представляют собой белые кристаллические вещества без запаха. Кофеин умеренно растворим в воде (1:60), мало растворим в этаноле, легко растворим в горячей воде; теofilлин мало растворим в воде, этаноле, хлороформе, легко растворим в горячей воде; теобромин практически нерастворим в холодной воде, этаноле, мало растворим в горячей воде. Теofilлин и теобромин растворимы в растворах кислот и щелочей. Кофеин в щелочной среде разлагается с образованием физиологически неактивного кофеидина:



Основные свойства производных ксантина обусловлены атомом азота в положении 9, а кислые – атомами водорода амидных групп. У кофеина атомы водорода амидных групп замещены на метильные радикалы, поэтому он не обладает кислотными свойствами и является слабым основанием. Теобромин и теofilлин – амфолиты, в молекулах этих алкалоидов имеются основные ($pK_{BH^+} = 0,6$) и кислотные центры

($pK_a = 10$ для теобромина и $pK_a = 8,6$ для теофиллина). Поэтому теофиллин и теобромин не экстрагируются хлороформом из щелочных растворов.

Производные ксантина оказывают возбуждающее действие на центральную нервную систему, причем у кофеина это действие выражено в наибольшей степени. Кофеин используется преимущественно как стимулятор центральной нервной системы, теофиллин – как бронхолитик.

Острое отравление производными ксантина может вызвать учащенное сердцебиение, гипертензию, повышенный диурез, тошноту, рвоту, головную боль, беспокойство, чувство страха, подавленность, стимуляцию центральной нервной системы, выраженную гипокалиемию, метаболический ацидоз и судороги. Возможно падение артериального давления вплоть до коллапса (в особенности при быстром внутривенном введении теофиллина).

В тяжелых случаях наблюдают мышечные подергивания, подъем температуры. Симптомы отравления могут напоминать отравление стрихнином.

Летальный исход может наступить на фоне истощения или при явлениях недостаточности сердечно-сосудистой системы и дыхания.

Теофиллин более токсичен, чем кофеин и теобромин.

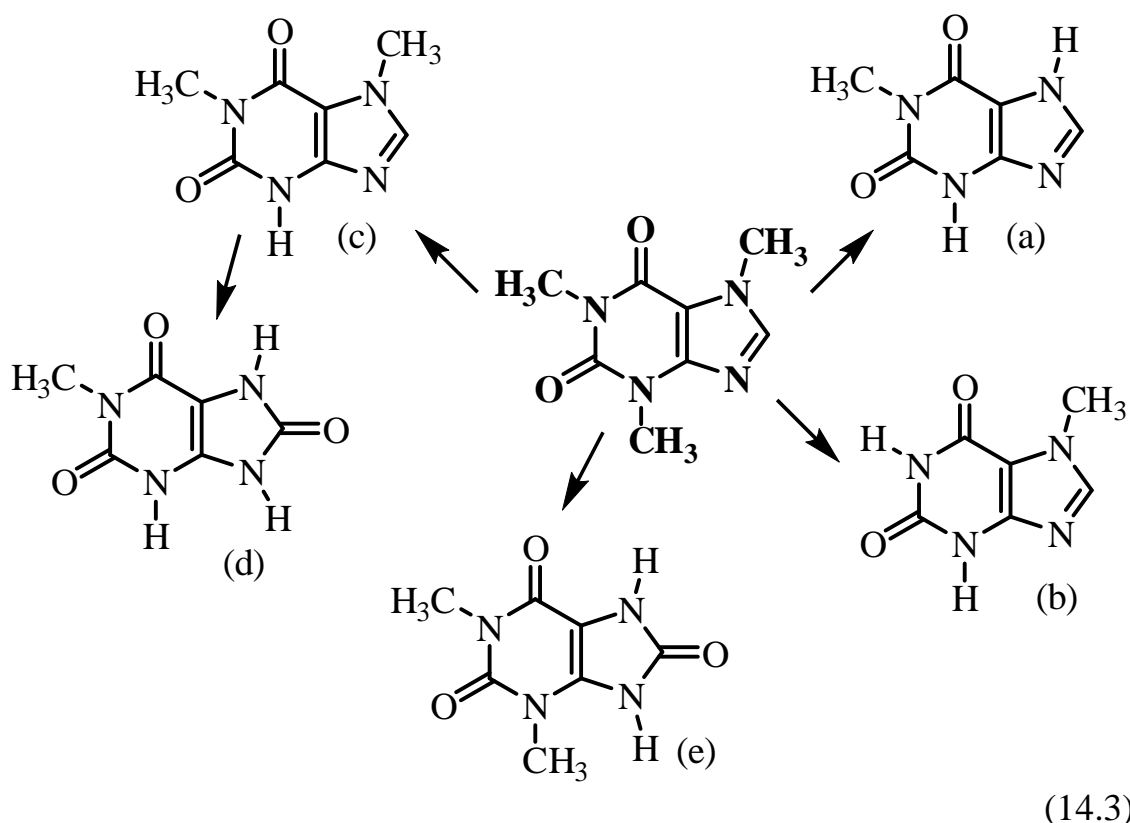
Производные ксантина при попадании в организм быстро всасываются. Основные фармакокинетические параметры производных ксантина представлены в таблице 14.2.

Таблица 14.2

Основные фармакокинетические параметры производных ксантина

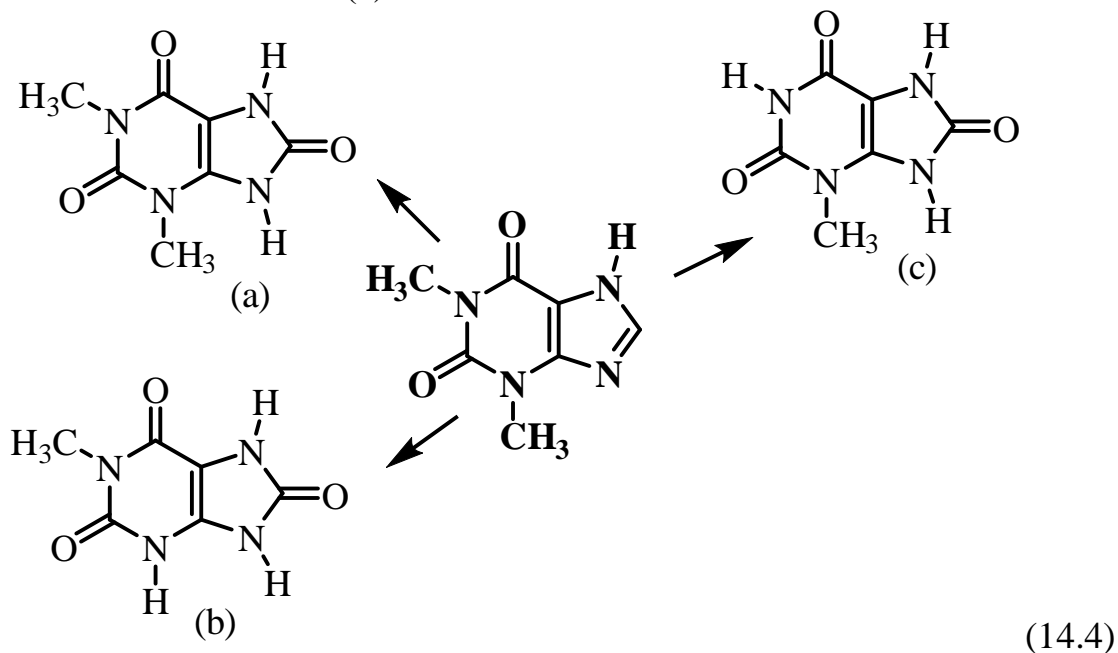
Основные фармакокинетические параметры производных ксантина						
Соединение	pK_a	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Кофеин	–	0,6	2-10	0,5	1-2	35
Теобромин	10,0	0,6	5-11	0,5-1,0	0,8	
Теофиллин	8,6	0,6	3-13	0,5	0,2-2,0	40

После поступления в организм **кофеин** практически полностью подвергается метаболизму путем N-деметилирования и окисления. В результате образуются 1-метилксантин (а), 7-метилксантин (б), 1,7-диметилксантин (с), 1-метилмочевая кислота (д), 1,3-диметилмочевая кислота (е):

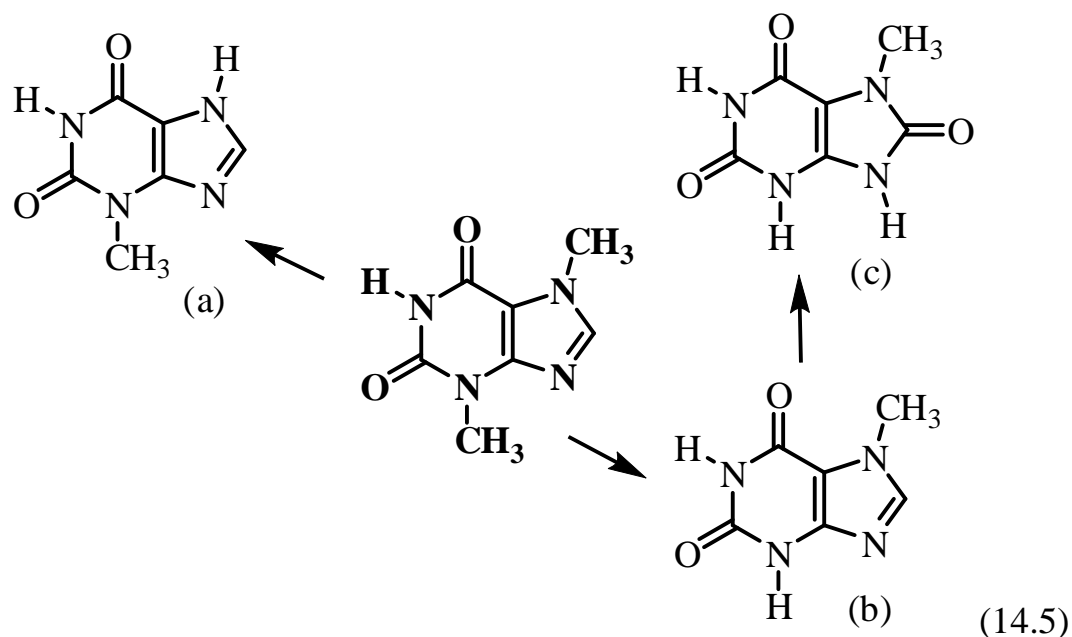


Незначительные количества кофеина выделяются с мочой в неизмененном виде.

Теofilлин метаболизируется с образованием 1,3-диметилмочевой кислоты (а), 1-метилмочевой кислоты (б) и следов 3-метилмочевой кислоты (с):



Метаболитами **теобромина** являются 3-метилксантин (а), 7-метилксантин (б) и 7-метилмочевая кислота, которые выводятся из организма с мочой:



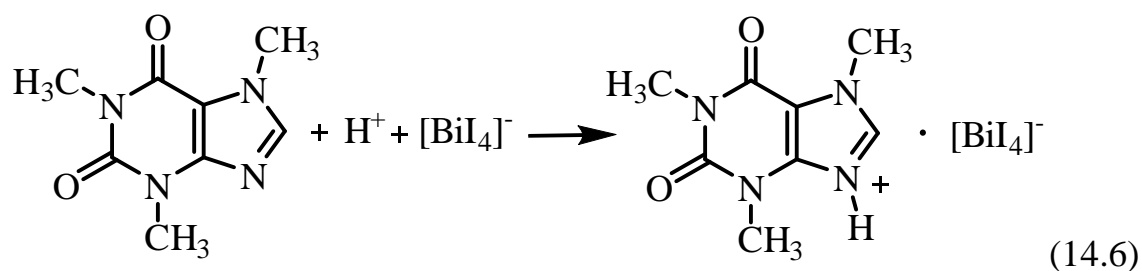
Первая помощь при отравлении производными ксантина заключается в вызывании рвоты (после приема теплого 10% раствора поваренной соли), обильное питье (иногда с добавлением 1 столовой ложки сульфата магния на 0,5 л воды), обеспечении покоя и защиты от переохлаждения.

14.9.2. Изолирование и определение производных ксантина

Изолирование производных ксантина можно проводить по методу Крамаренко и Стаса – Отто. На стадии проведения экстракции из водной вытяжки органическими растворителями имеются особенности изолирования: максимальные количества кофеина экстрагируются хлороформом при значениях pH = 4–5; теобромина и теофиллина – при значениях pH = 4–7.

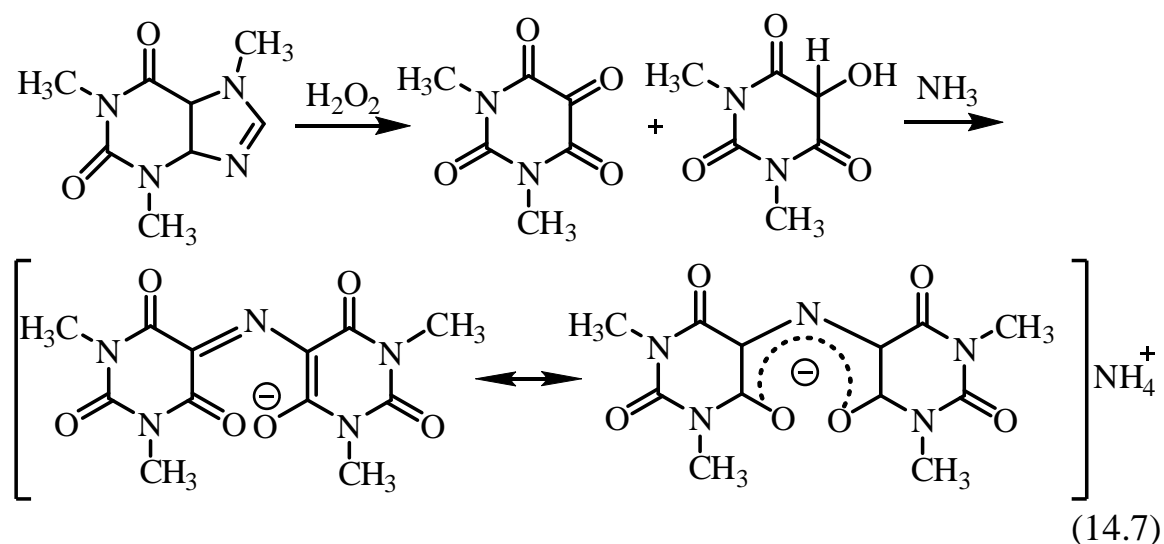
Обнаружение производных ксантина

Реакция с реактивом Драгендорфа (групповая реакция на алкалоиды).



Выполнение реакции: на предметное стекло помещают 2–3 капли исследуемого хлороформного экстракта, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М хлороводородной кислоты и прибавляют 1 каплю реактива Драгендорфа – появляется оранжевый осадок. Чувствительность реакции – 20 мкг.

Мурексидная реакция (групповая реакция на производные ксантина). При действии окислителей (хлорная вода, бромная вода, пероксид водорода, хлорат калия, периодат калия и др.) и хлороводородной кислоты на производные ксантина происходит образование смеси производных аллоксана и диалуровой кислоты. От прибавления аммиака к этой смеси происходит образование метильного производного мурексида, имеющего фиолетовую окраску:



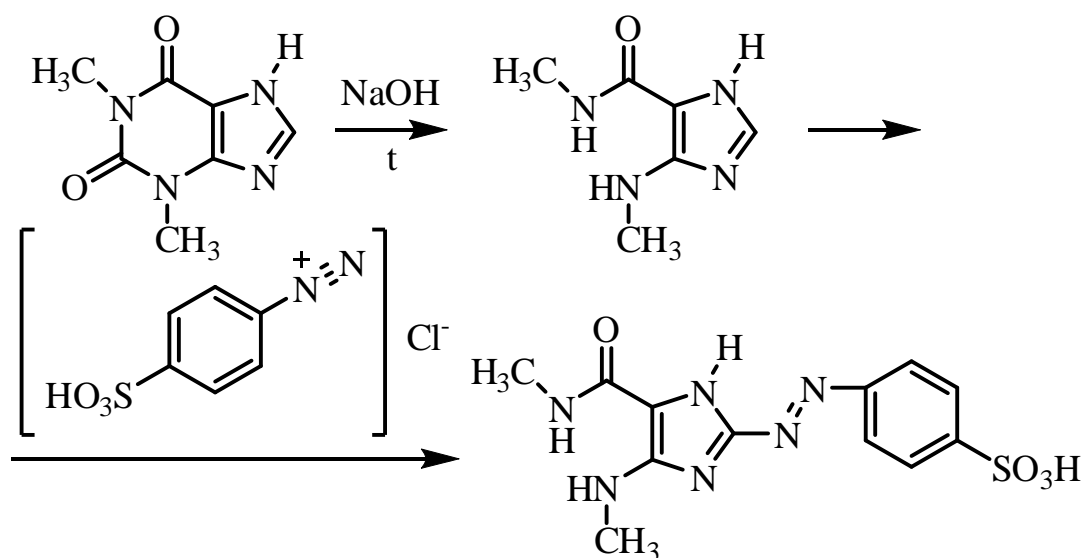
Выполнение реакции: 5–6 капель исследуемого хлороформного экстракта вносят в фарфоровую чашку и упаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5–1 мл бромной воды (пергидроля или несколько кристалликов калия хлората), 2–3 капли концентрированной хлороводородной кислоты и на водяной бане упаривают содержимое фарфоровой чашки досуха. К полученному остатку прибавляют 2–3 капли 25% раствора аммиака. При наличии в экстракте производных ксантина развивается пурпурно-красная или фиолетовая окраска.

Реакция с реактивом Несслера (реакция отличия теобромина от кофеина).

Выполнение реакции: 0,3 мл исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2–3 каплях 0,1 М хлороводородной кислоты, прибавляют 2–3 капли реактива Несслера и нагревают на водяной бане в течение 1–2 мин.

Появление красно-бурого осадка указывает на наличие кофеина. Теобромин в этих условиях дает слабо-коричневую окраску.

Реакция теофиллина с диазотированной сульфаниловой кислотой. Теофиллин после щелочного гидролиза превращается в теофиллин, который вступает в реакцию с солью диазония с образованием азокрасителя красного цвета.



(14.8)

Выполнение реакции: 0,5 мл хлороформного экстракта упаривают на водяной бане досуха, сухой остаток растворяют в 0,5 мл 30% раствора гидроксида натрия и кипятят в течение 5 минут. Затем к полученному раствору прибавляют 0,5 мл раствора диазотированной сульфаниловой кислоты.

Появление оранжево-красной окраски указывает на наличие теофиллина в растворе. Реакция позволяет отличить теофиллин от теоброммина.

Реакция кофеина с хлоридом ртути (II): на сухой остаток, полученный после выпаривания 2–3 каплей хлороформного экстракта, наносят каплю 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и каплю 5% раствора хлорида ртути (II). Через 10–15 мин под микроскопом видны бесцветные иглообразные кристаллы. Чувствительность реакции – 9 мкг кофеина.

Реакция кофеина с золотобромоводородной кислотой: на сухой остаток наносят каплю 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и каплю реактива, состоящего из равных частей 5% раствора хлорида золота, концентрированной хлороводородной кислоты и ацетона, а затем 2–3 кристалла бромида калия. Под микроскопом наблюдают желтовато-коричневые иглообразные кристаллы. Чувствительность реакции – 5 мкг кофеина.

УФ- и ИК-спектры. В таблице 14.3 приведены спектральные характеристики производных ксантина.

Таблица 14.3

Спектральные характеристики производных ксантина

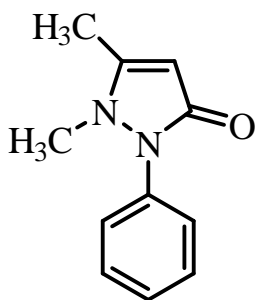
Вещество	УФ-область, нм	ИК-область, см ⁻¹
Кофеин	273 (этанол), 272 (0,1 М HCl)	1695, 1658, 745
Теобромин	273 (рН 9,4)	1690, 1221, 1550
Теofilлин	270 (0,1 М HCl)	1660, 1700, 1560, 1445

Тонкослойная хроматография. Исследованы и предложены различные адсорбенты и подвижные фазы для разделения и идентификации производных ксантина. Применение системы растворителей «диэтиловый эфир-ацетон-25% раствор аммиака (40:20:1)» и силикагеля позволяет идентифицировать производные ксантина (реактивы: 0,1 М раствор йода и смесь равных объемов 96% этанола и 25% раствора HCl). Хроматографирование проводят также в системах растворителей: диоксан-хлороформ-ацетон-25% раствор аммиака (47,5:45:5:2,5) и хлороформ-ацетон (9:1) с применением реактива Драгендорфа.

Количественное определение: ГЖХ (детектор пламенно-ионизационный, газ-носитель – азот), ВЭЖХ (УФ-спектрометрический детектор).

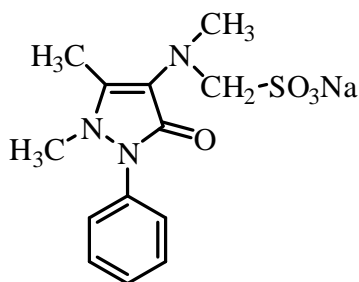
14.10. Лекарственные вещества, производные пиразола

Из производных пиразола в медицинской практике применяются производные пиразолона-5 (феназон, метамизол натрия, пропифеназон) и производное пиразолидин-3,5-диона (фенилбутазон). Амидопирин (1-фенил-2,3-диметил-4-диметиламино-пиразолон-5) в настоящее время не применяется, так как при приеме амидопиринна наблюдалось угнетение кроветворения (гранулоцитопения и агранулоцитоз), а так же развитие анафилактических реакций. В литературе встречается и другая нумерация атомов в молекуле пиразола, в соответствии с которой, например, феназон имеет название 1,5-диметил-2-фенилпиразолон-3.

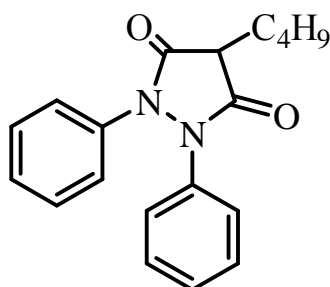


Феназон

Антипирин, азофен;
1-фенил-2,3-
диметилпиразолон-5



Метамизол натрия,
Анальгин, 1-фенил-
2,3-диметил-4-
метиламино-
пиразолон-5-N-
метансульфонат на-
трия



Фенилбутазон

Бутадион, 1,2-
дифенил-4-
бутилпиразолидин-
дион-3,5

14.10.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных пиразола

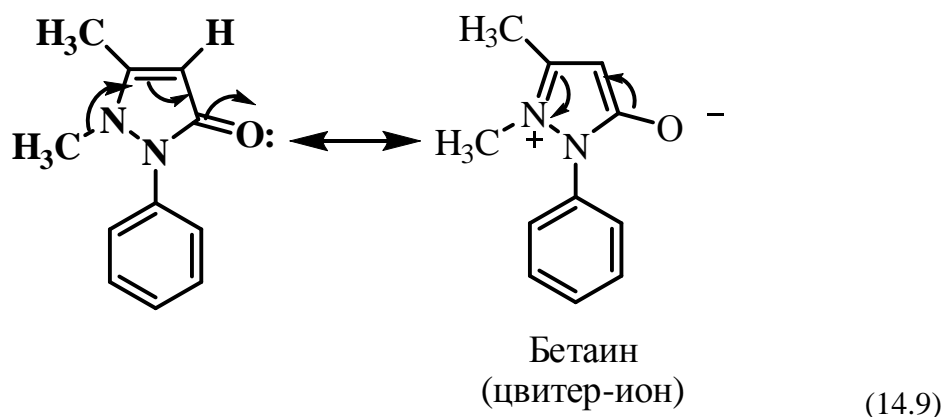
Производные пиразола представляют собой белые или почти белые кристаллические порошки, горького вкуса. Феназон и метамизол натрия легко растворимы в воде. Метамизол натрия, в отличие от феназона мало растворим в этаноле, в эфире, хлороформе и ацетоне.

Несмотря на сходство химической структуры, производные пиразола отличаются друг от друга по химическим свойствам. Феназон вступает в реакции замещения (например, с иодом, нитритом натрия), что используется для качественного и количественного анализа.

Основные свойства производных пиразолона обусловлены наличием двух атомов азота. Сопряжение неподеленной электронной пары атомов азота с фенильным радикалом приводит к тому, что производные пиразолона являются слабыми основаниями. Кроме того, сила этих оснований зависит от характера заместителя в 4 положении. Поэтому

pK_{BH^+} феназона составляет всего 1,5. Наличие заместителей в 4 положении амидопирина, феназона и фенилбутазона обуславливает $pK_{BH^+} = 5,0, 3,9$ и $4,5$ соответственно.

Способность производных пиразола к комплексообразованию например, с солями железа (III) обусловлена образованием при растворении в воде цвитер-иона бетаиновой структуры.



Производные пиразола применяются как болеутоляющие, жаропонижающие и противовоспалительные лекарственные средства. По анальгезирующей активности они близки к производным салициловой кислоты. Производные пиразола уменьшают проницаемость капилляров и препятствуют воспалительной реакции. Анальгин, вследствие лучшей растворимости, действует быстрее, чем амидопирин. В настоящее время анальгин широко применяется в качестве анальгезирующего средства.

При приеме внутрь больших доз производных пиразола появляется тошнота, боли в животе, понос. Возможна потеря сознания, состояние возбуждения. В некоторых случаях развиваются нарушения функции сердечно-сосудистой системы, цианоз, коллапс. Смерть наступает при явлениях сердечно-сосудистой недостаточности. При поступлении производных пиразолона в желудочно-кишечный тракт они всасываются быстро и полностью. Основные фармакокинетические параметры производных пиразолона представлены в таблице 14.4.

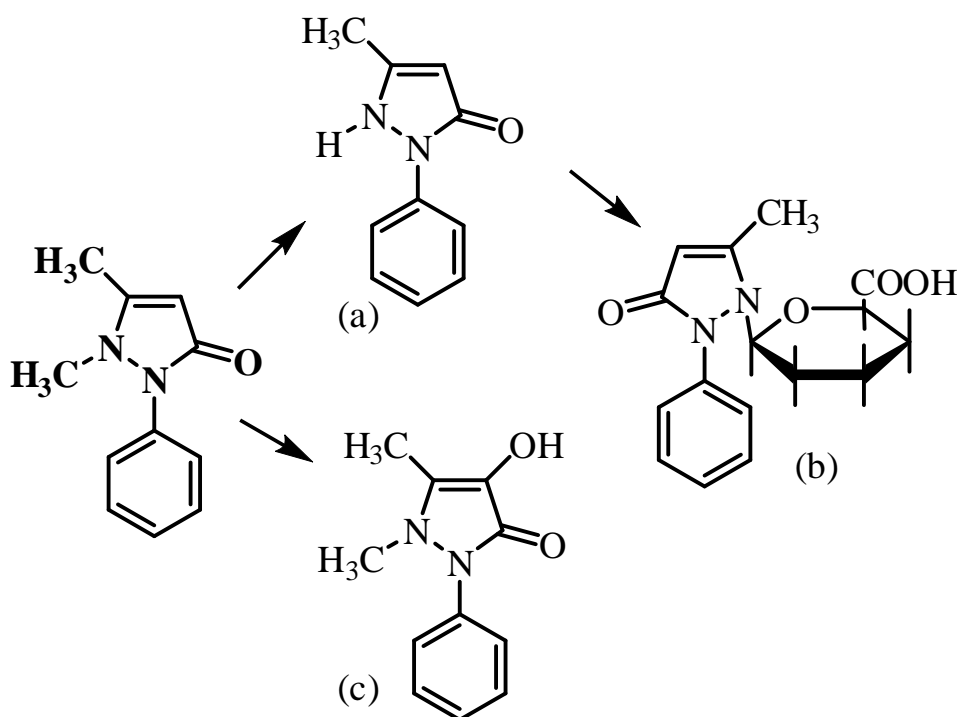
Таблица 14.4

**Основные фармакокинетические параметры
производных пиразолона**

Соединение	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Феназон	1,5	8-12	0,6	50	10
Амидопирин	5,0	2-3	0,86	-	-
Метамизол натрия	3,9	-	-	-	-

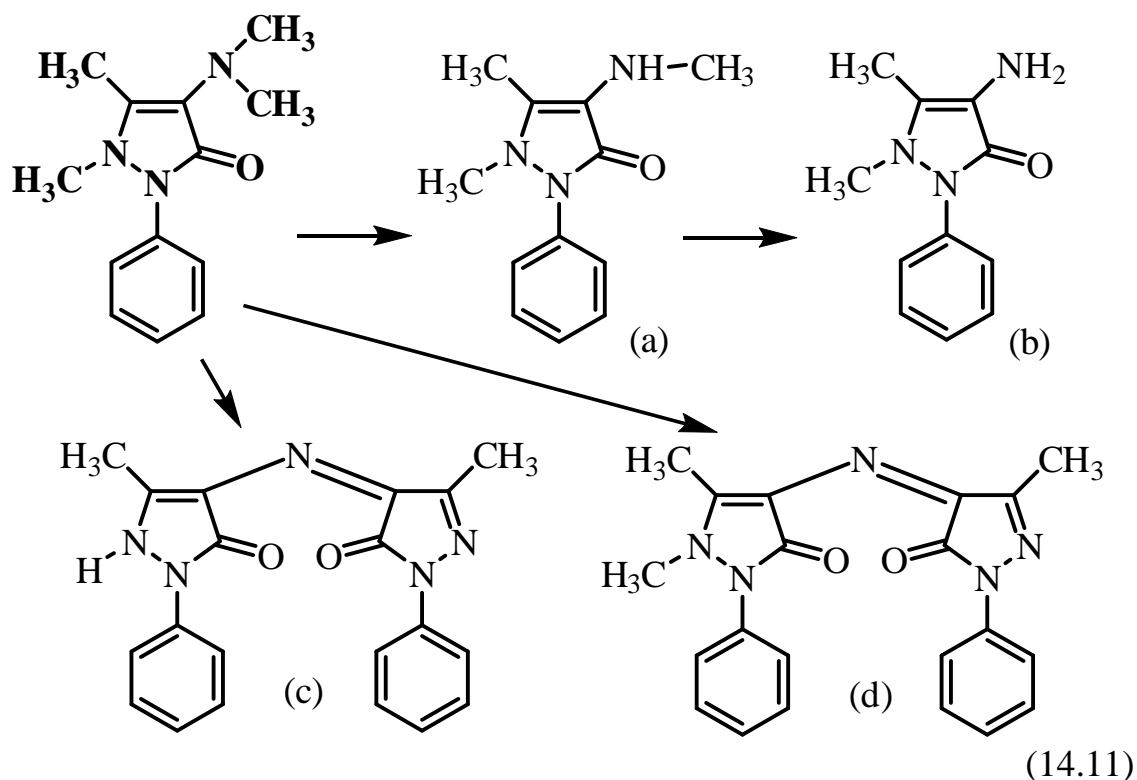
Фенилбутазон	4,5	70	0,17	2	-
--------------	-----	----	------	---	---

После всасывания производные пиразолона подвергаются метаболизму. Феназон относительно медленно метаболизируется в органах и тканях. Около 5% дозы феназона выделяется в несвязанном виде через почки. 30–40% дозы подвергается N-деметилованию (а) и глюкуронизации (b), некоторое количество феназон подвергается гидроксигированию с образованием 4-гидроксифеназона (с):

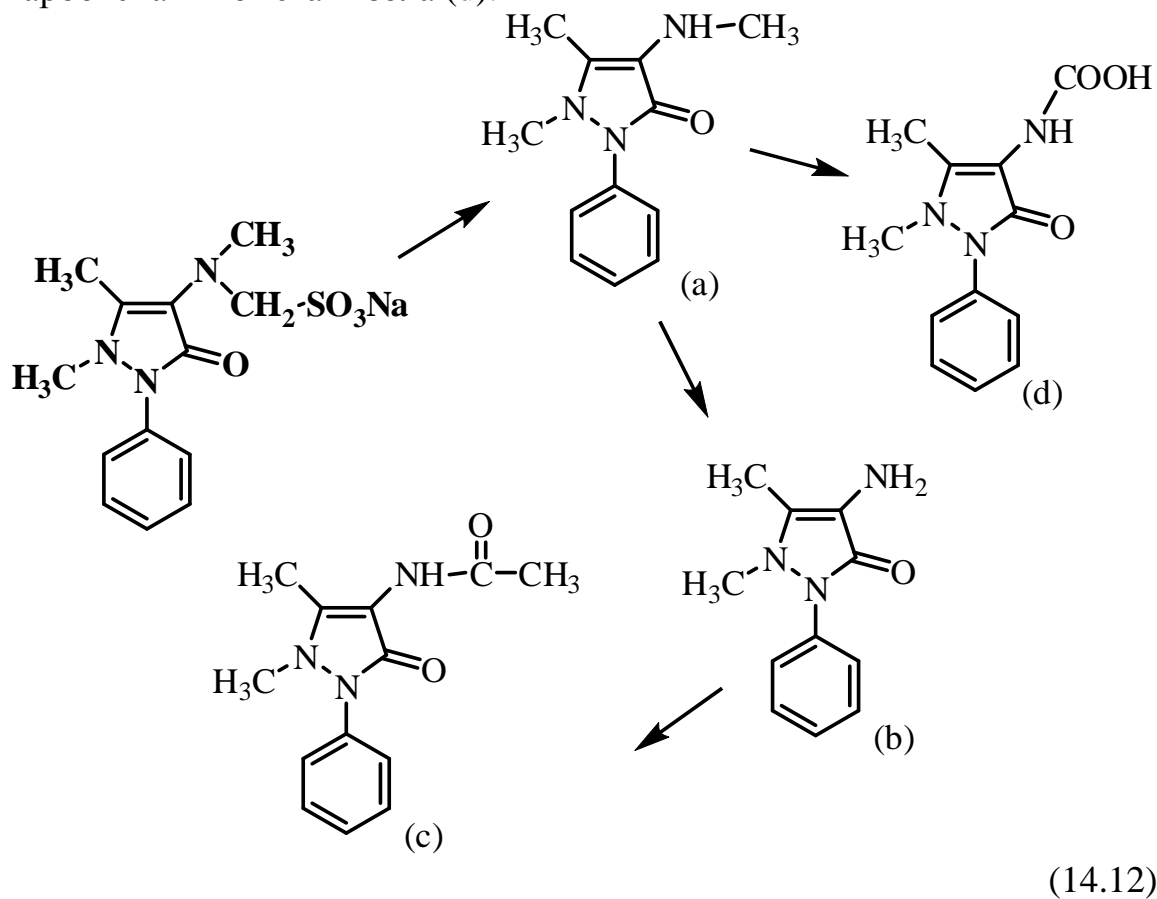


(14.10)

Характерным признаком отравления амидопирином является красно-бурая окраска мочи в результате образования рубазоновых кислот (с, d).



Метамизол натрия метаболизируется до метиламинометамизола (a), 4-аминометамизола (b) (30–50%), N-ацетиламинометамизола (c), карбоксиаминометамизола (d):



При отравлении производными пиразола необходимо осторожно (во избежание судорог) вызвать рвоту и произвести промывание желудка. Принимают слабительное (натрия сульфат или касторовое масло). Проводят форсированный диурез с поддержанием баланса жидкости в организме.

14.10.2. Изолирование и определение производных пиразола

Изолирование производных пиразола проводят методами Стаса – Отто, Крамаренко, Швайковой – Васильевой. Производные пиразола являются слабыми основаниями, поэтому они экстрагируются хлороформом как из щелочной, так и умеренно кислой среды. Метамизол натрия – амфолит, полностью экстрагируется органическими растворителями из щелочной среды (pH 8-9).

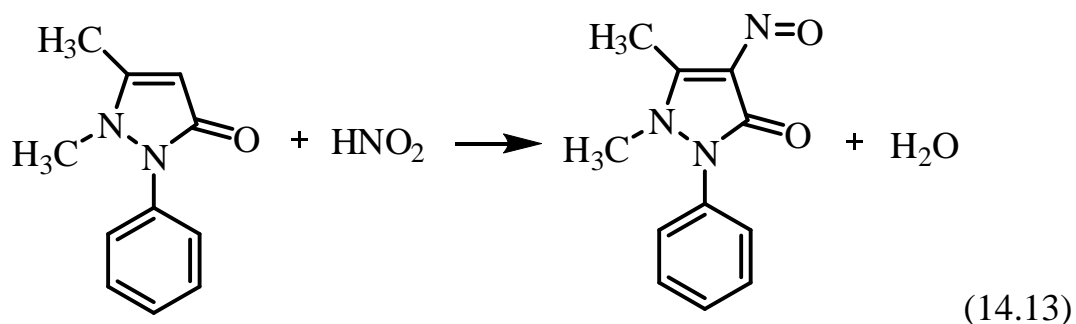
Обнаружение производных пиразола

Реакция с реактивом Драгендорфа. В кислых растворах производные пиразола находятся в протонированной катионной форме и способны к взаимодействию с общеалкалоидными реактивами (реактив Драгендорфа, таннин, пикриновая кислота, реактив Майера и т.д.)

Выполнение реакции: 5 капель исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха, сухой остаток растворяют в капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и прибавляют 1 каплю реактива Драгендорфа – появляется оранжевый осадок.

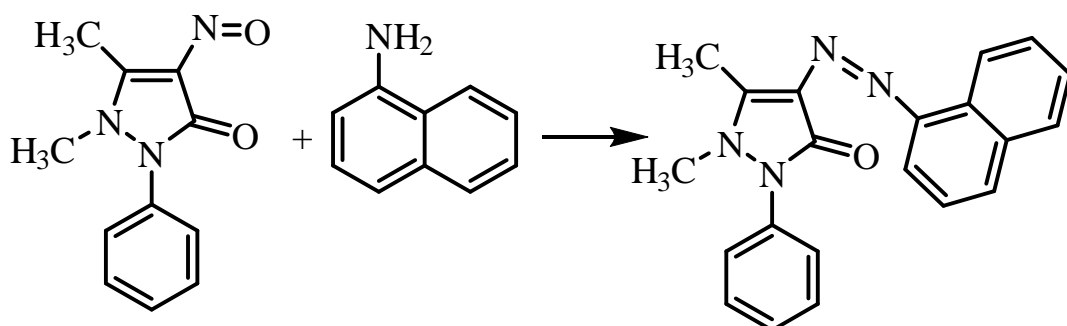
Реакция с хлоридом железа (III) (феназон, метамизол натрия): на предметное стекло наносят 3 капли исследуемого хлороформного экстракта и упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 каплю свежеприготовленного хлорида железа (III). Появление красной или синей окраски указывает на наличие феназона или метамизола натрия.

Реакция феназона с натрия нитритом: при реакции с феназоном происходит замещение атома водорода в 4 положении на нитрозо-группу:



Выполнение реакции: в пробирку вносят 3–5 мл хлороформного экстракта, упаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 3–5 каплях воды и 2–4 каплях 10% раствора серной кислоты. Прибавляют 2–3 капли насыщенного раствора натрия нитрита. При наличии феназона в пробе появляется желто-зеленая окраска нитрозофеназона.

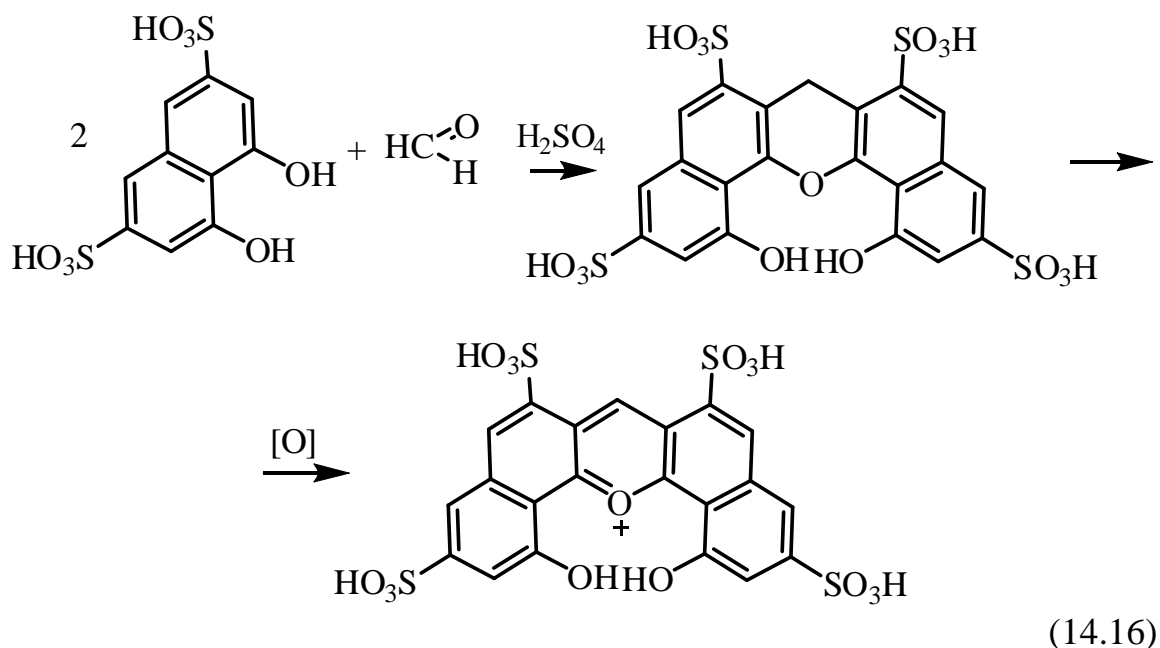
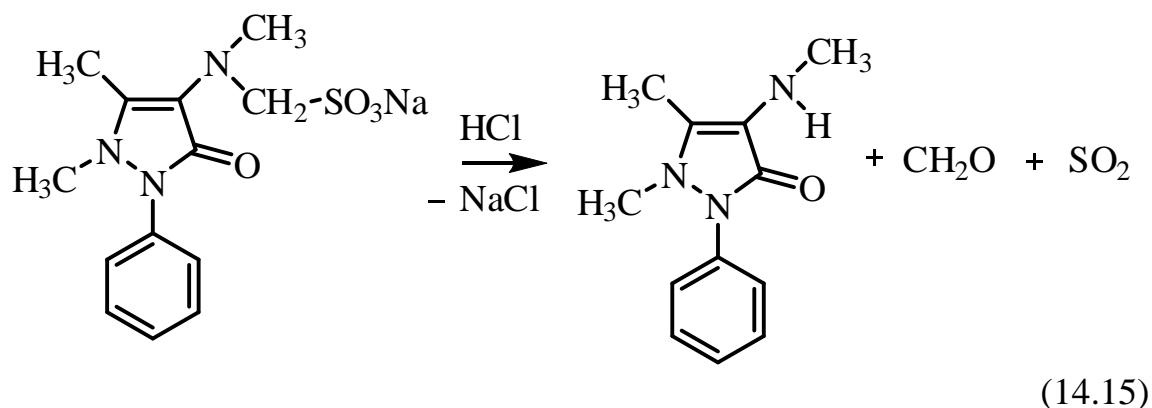
Реакция образования азокрасителя (феназон). При взаимодействии феназона с нитритом натрия образуется нитрозофеназон, который способен вступать в реакцию с α -нафтиламином с образованием азокрасителя.



(14.14)

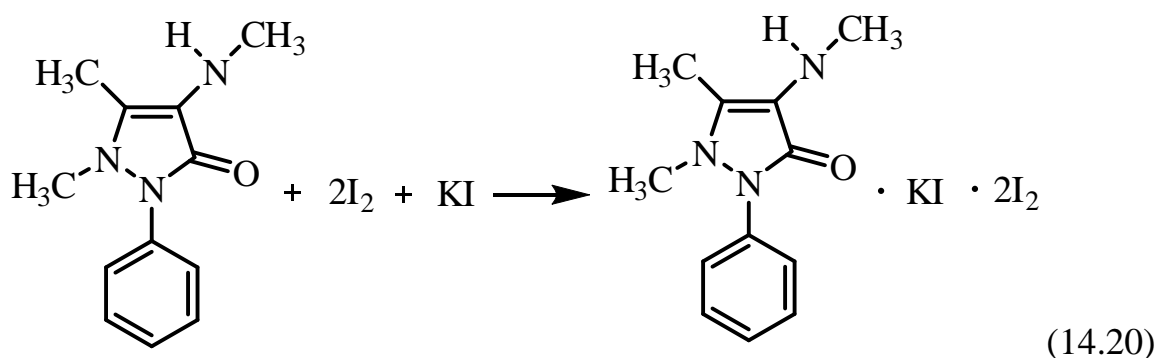
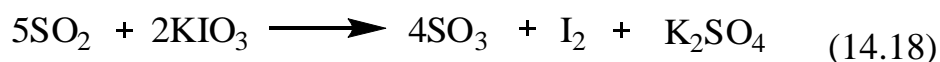
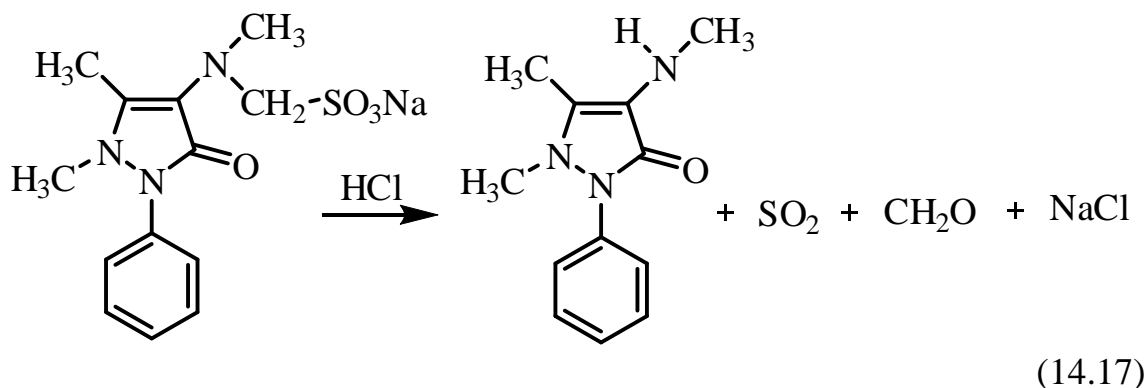
Выполнение реакции: в пробирку вносят 2–5 капель хлороформного экстракта и упаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 1–2 каплях воды, прибавляют каплю ледяной уксусной кислоты и каплю 5% раствора нитрита калия. Смесь периодически взбалтывают, в течение 5 минут. Для удаления избытка нитрита натрия в пробирку вносят небольшое количество азиды натрия и после прекращения выделения пузырьков газа прибавляют 3–4 кристаллика α -нафтиламина, нагревают пробирку на водяной бане 1–2 мин. В зависимости от количества феназона появляется темно- или светло-фиолетовая окраска. Чувствительность реакции – 2 мкг феназона.

Реакция с хромотроповой кислотой (метамизол натрия). При нагревании метамизола натрия с разбавленными минеральными кислотами происходит выделение формальдегида, который взаимодействует с хромотроповой кислотой:



Выполнение реакции: 3–5 капль хлороформного экстракта упаривают досуха, к сухому остатку прибавляют каплю концентрированной серной кислоты и 1 каплю раствора хромотроповой кислоты. Появление фиолетовой окраски указывает на наличие метамизола натрия.

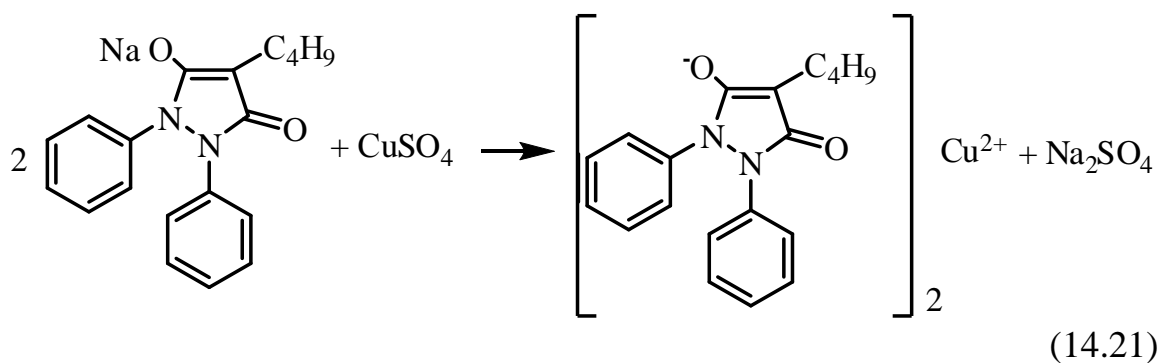
Реакция метамизола натрия с иодатом калия. При взаимодействии метамизола натрия с иодатом калия в среде хлороводородной кислоты вначале происходит гидролиз метамизола натрия с выделением диоксида серы. Последний, взаимодействуя с иодатом калия, окисляется. При восстановлении иодата калия происходит выделение иода и иодида калия. Реакция сопровождается образованием малинового окрашивания.



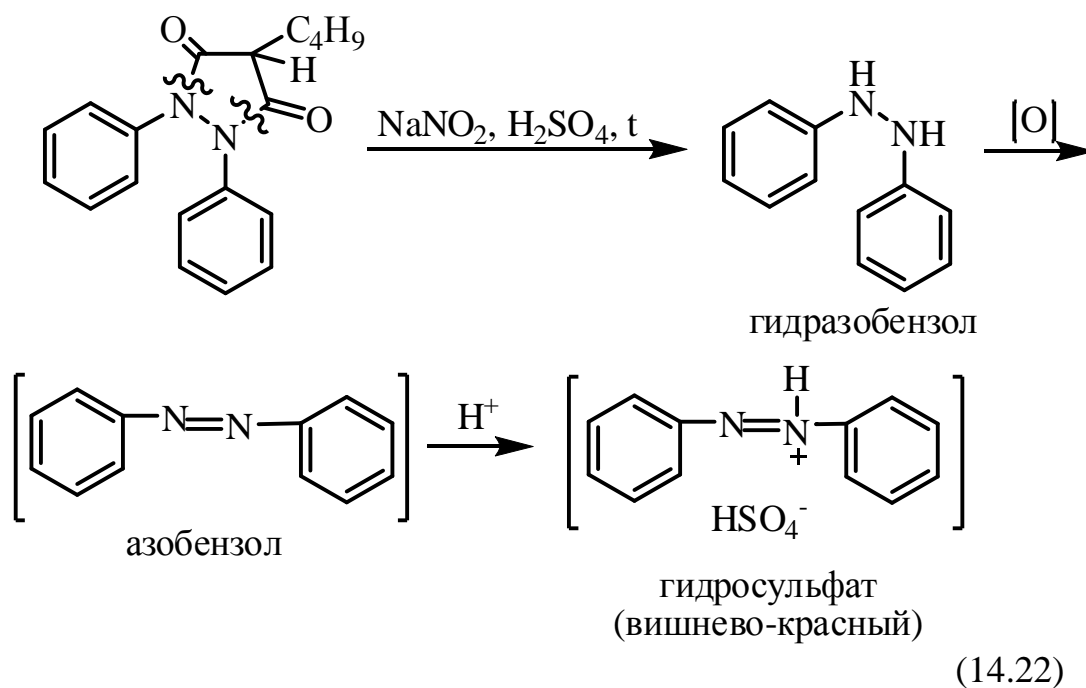
Выполнение реакции: в пробирку вносят 3–5 мл хлороформного экстракта, упаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 3–5 каплях концентрированной хлороводородной кислоты и прибавляют несколько кристалликов иодата калия. При наличии метамизола натрия появляется малиновая окраска.

Реакция метамизола натрия с реактивом Миллона. При взаимодействии метамизола натрия с реактивом Миллона [$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 + \text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$] появляется темно-синее окрашивание.

Реакция обнаружения фенилбутазона. Фенилбутазон проявляет кислотные свойства за счет неподвижного атома водорода у C_4 , стоящего рядом с электроотрицательными карбонильными группами. Поэтому фенилбутазон образует нерастворимые соединения с солями тяжелых металлов (с раствором сульфата меди (II) образуется осадок серо-голубого цвета). При выполнении реакции вначале получают натриевую соль фенилбутазона, действуя раствором гидроксида натрия, а затем добавляют раствор сульфата меди (II).



Окисление фенилбутазона возможно в жестких условиях (кристаллы нитрита натрия в присутствии концентрированной серной кислоты). Продукт реакции – гидросульфат азобензола имеет вишнево-красную окраску.



Тонкослойная хроматография. Неподвижная фаза – силикагель, подвижные фазы – хлороформ-ацетон (9:1), ацетон-циклогексан (5:1). Реактивы: раствор хлорида железа (III), реактив Драгендорфа.

УФ- и ИК-спектры. Спектральные характеристики некоторых производных пиразола приведены в таблице 14.5.

В ИК-спектрах производных пиразола имеются характерные пики, которые идентифицируют с помощью специальных атласов или сравнением полученных ИК-спектров с ИК-спектрами стандартных веществ.

Таблица 14.5

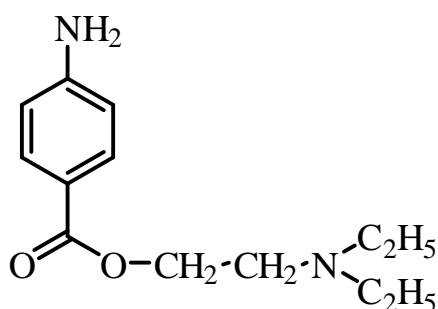
Характерные полосы поглощения производных пиразола в УФ- и ИК-областях

Вещество	УФ-область, нм	ИК-область, см ⁻¹
Феназон	243 и 267 (метанол) 243 и 256 (вода) 231 (0,1 М НСl) 243 и 256 (0,1 М NaOH)	770, 1486, 1660
Метамизол натрия	234 и 265 (метанол) 259 (0,1 М НСl)	1054, 1174, 1498, 1660
Фенилбутазон	235 (0,1 М НСl) 240 (нейтральная среда) 243 (метанол) 264 (0,1 М NaOH)	1491, 1597, 1717, 1752

Количественное определение: УФ-спектрометрия при соответствующих длинах волн, ВЭЖХ (УФ-спектрометрический детектор, обращенно-фазовый сорбент «Сепарон С-18»).

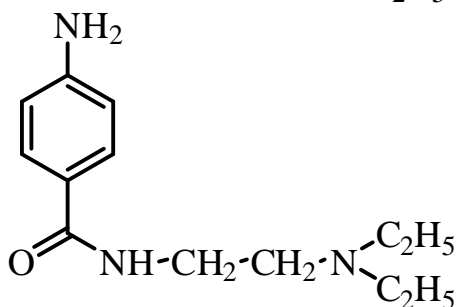
14.11. Лекарственные вещества, производные *p*-аминобензойной кислоты

Из производных ароматических аминокислот (анестезин, прокаин, прокаинамид, кислота мефенаминовая, натрия диклофенак) определенный токсикологический интерес представляют производные *para*-аминобензойной кислоты (прокаин и прокаинамид).



Прокаин

Новокаин, этокаин, амбокаин, аминоккаин, анестокаин, топокаин, генокаин; β-диэтиламиноэтиловый эфир *para*-аминобензойной кислоты



Прокаинамид

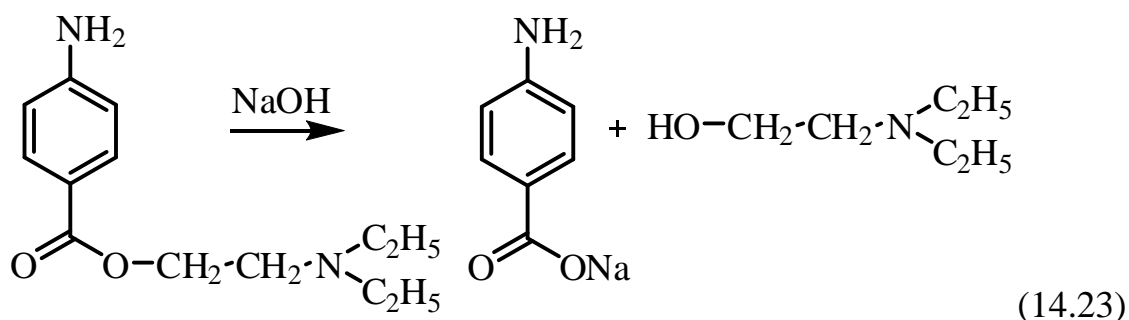
Новокаинамид, новокаамид, амидопрокаин, кардиоритмин, прокардил; β-диэтиламиноэтиламид *para*-аминобензойной кислоты

14.11.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных *n*-аминобензойной кислоты

Гидрохлориды прокаина и прокаинамида представляют собой белые или белые с кремоватым оттенком кристаллические порошки, без запаха, гигроскопичные. Гидрохлориды прокаина и прокаинамида очень легко растворимы в воде, легко в этаноле, мало растворимы в хлороформе, практически нерастворимы в эфире.

Прокаин и прокаинамид являются органическими основаниями, обладают характерными спектрами поглощения в УФ-области, форма которых зависит от значения pH среды.

Прокаин в сильнощелочных растворах легко гидролизуются с образованием соли *para*-аминобензойной кислоты и диэтиламиноэтанола:



Прокаин является местноанестезирующим лекарственным средством. По способности вызывать поверхностную анестезию он менее активен, чем кокаин, но значительно менее токсичен. Не вызывает свойственных кокаину явлений наркомании. Помимо местноанестезирующего действия, прокаин оказывает общее влияние на организм: уменьшает выработку ацетилхолина, оказывает блокирующее действие на вегетативные ганглии, уменьшает спазмы гладкой мускулатуры, понижает возбудимость сердечной мышцы и моторной зоны коры головного мозга.

Прокаинамид обладает фармакологическим действием, сходным с прокаином, но снижение возбудимости сердечной мышцы у него выражено в значительно большей степени, чем у прокаина. Поэтому прокаинамид применяется как антиаритмическое средство. Он менее токсичен, чем прокаин.

При передозировке производных *n*-аминобензойной кислоты развивается саливация, тошнота, рвота, чувство угнетенности и головокружение. Появляются возбуждение, мышечные подергивания, судороги. Нарушается частота сердечных сокращений и сердечного ритма вплоть до тотальной блокады сердца. Снижается артериальное давле-

ние вплоть до коллапса. Смерть наступает при явлениях сердечной недостаточности или паралича дыхательного центра.

Основные фармакокинетические параметры производных *n*-аминобензойной кислоты представлены в таблице 14.6.

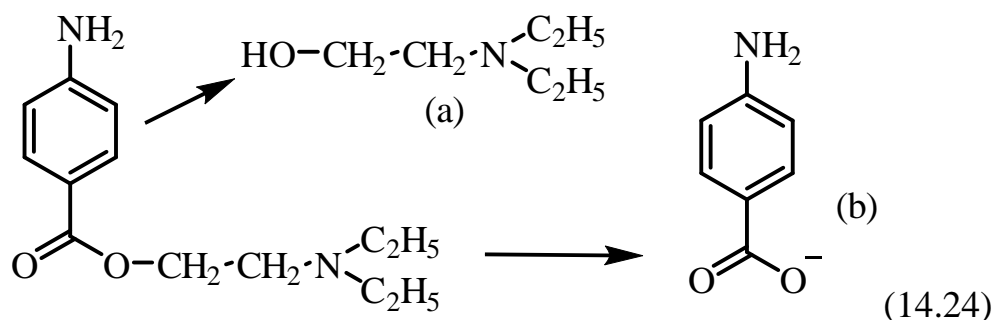
Таблица 14.6

Основные фармакокинетические параметры производных *n*-аминобензойной кислоты

Соединение	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Прокаин	8.1 (9,0)	0,1			6
Прокаинамид	9,2	6-9	2	5-15	15

Прокаин и прокаинамид медленно всасываются через слизистые оболочки и пищеварительный тракт, но зато быстро всасываются из тканей после инъекции.

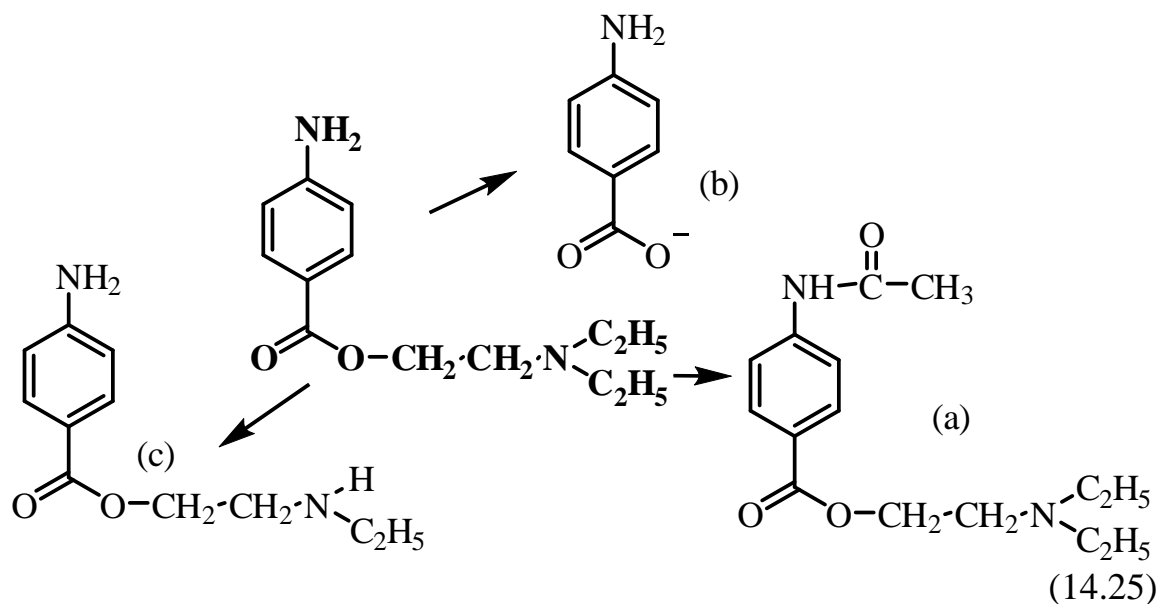
Под действием эстераз крови прокаин быстро гидролизуется с образованием диэтиламиноэтанола (а) (воздействует на нервные окончания и на тонус сосудов) и *n*-аминобензойной кислоты (б) (вызывает аллергические реакции); последняя частично подвергается глюкуронизации.



Около 90% дозы прокаина выводится с мочой в виде ПАБК (в свободной форме и в виде конъюгатов). Только 2% прокаина выделяется с мочой в неизменном виде в течение первых 24 часов. Около 33% диэтиламина (а) выводится в свободном виде.

Прокаинамид гораздо более устойчив к действию эстераз, чем прокаин. Поэтому гидролиз его осуществляется значительно медленней. Основным метаболитом прокаинамида является *N*-ацетилпрокаинамид (а), лишь 2–10% дозы введенного прокаинамида метаболизируется до *n*-аминобензойной кислоты (б). Обнаружены также *N*-деэтилированные метаболиты (с).

Около 50–60% прокаинамида выводится с мочой в неизменном виде в течении 24 часов.



Выведение производных *p*-аминобензойной кислоты и их метаболитов осуществляется преимущественно через почки.

При пероральном отравлении производными *p*-аминобензойной кислоты необходимо вызвать рвоту, промыть желудок, дать активированный уголь, сульфат натрия. При случайном введении токсичной дозы необходимо сразу же наложить жгут проксимальнее места введения и создать венозный застой. Жгут распускать через каждые 15 мин.

Необходимо обеспечить достаточное дыхание, при необходимости дать кислород, произвести искусственное дыхание.

14.11.2. Изолирование и определение производных *p*-аминобензойной кислоты

Изолирование прокаина и прокаинамида из органов и тканей проводят методами Стаса – Отто, Крамаренко, Швайковой – Васильевой. Поскольку прокаин и прокаинамид являются достаточно сильными основаниями, они экстрагируются хлороформом из щелочной среды (рН 8–10). При исследовании содержания прокаина в плазме необходимо прибавлять натрия фторид для подавления активности эстераз крови.

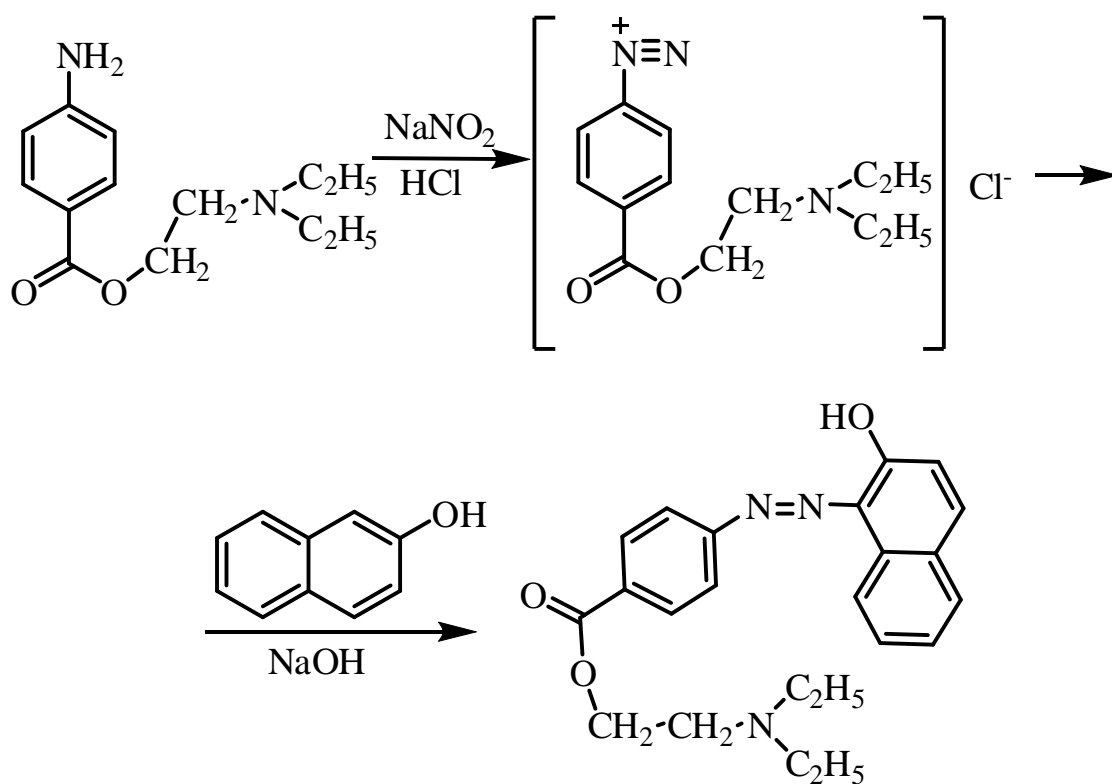
Для **обнаружения** производных *p*-аминобензойной кислоты применяют реакции с общеалкалоидными осадительными реактивами, реакции Витали-Морена, образования азокрасителя и др.

Выполнение реакции с реактивом Драгендорфа: 3–5 капель исследуемого хлороформного экстракта упаривают на предметном стекле досуха и прибавляют реактив Драгендорфа. Появление осадка, состоящего из кристаллов красно-оранжевого цвета указывает на наличие прокаина или прокаинамида в экстракте.

При микрокристаллоскопическом исследовании **кристаллов прокаина с пикриновой и стифниновой кислотами** под микроскопом видны характерные призматические кристаллы.

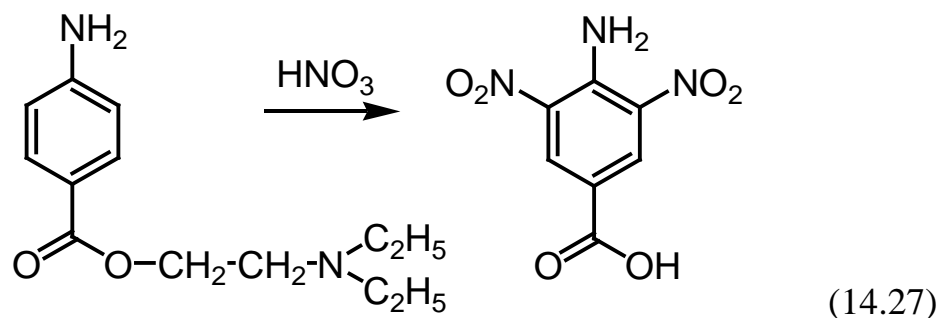
Реакция образования азокрасителя: 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 0,2 мл 1% раствора хлороводородной кислоты и прибавляют несколько кристалликов нитрита натрия. Через 5 минут жидкость подщелачивают 5% раствором гидроксида натрия до щелочной реакции и прибавляют щелочной раствор β -нафтола.

При наличии производных *p*-аминобензойной кислоты раствор приобретает красно-оранжевую окраску.



(14.26)

Выполнение реакции Витали-Морена: в фарфоровую чашку вносят 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта и при комнатной температуре упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и на кипящей водяной бане упаривают досуха. При этом сухой остаток приобретает желтую окраску. После добавления к сухому остатку капли ацетона и капли 10% этанольного раствора гидроксида калия желтая окраска сохраняется:



УФ-спектры. Прокаин и прокаинамид интенсивно поглощают в УФ-области спектра. В таблице 14.7 представлены спектральные характеристики производных *para*-аминобензойной кислоты.

Таблица 14.7

Спектральные характеристики прокаина и прокаинамида, нм

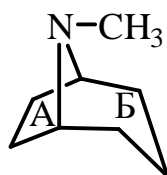
Вещество	Кислая среда	Нейтральная среда	Щелочная среда
Прокаин	228, 272, 279	228, 272, 290	288
Прокаинамид	224, 278	286	274

Тонкослойная хроматография. Подвижные фазы: хлороформ-этанол (20:1), циклогексан-бензол-диэтиламин (75:15:10); неподвижная фаза – силикагель; реактив Драгендорфа.

Количественное определение: УФ-спектрометрия, фотометрия по образованию азокрасителя, ВЭЖХ.

14.12. Алкалоиды, производные тропана

Тропан – бициклическая конденсированная система, образованная пирролидином (А) и пиперидином (Б)

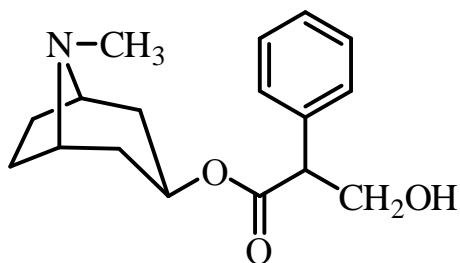


Алкалоиды группы тропана разделяют на 2 подгруппы:

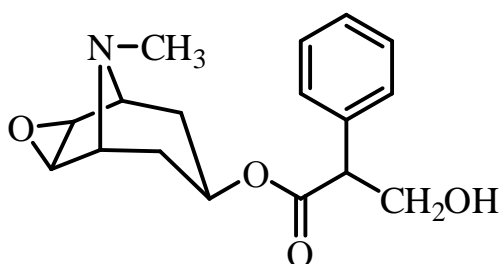
- 1) производные аминоспиртов тропина (атропин) и скопина (скополамин);
- 2) производные спиртокислоты эгонины (кокаин).

По химическому строению алкалоиды группы тропана – это сложные эфиры.

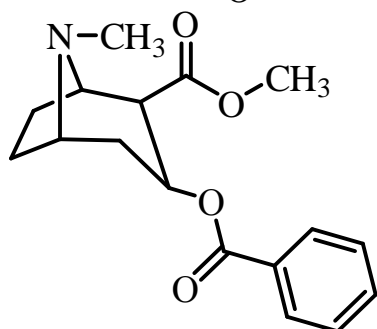
14.12.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных тропана



Атропин
(±)-гиосциамин



Скополамин
Гиосцин; скоподерм;
транскоп



Кокаин
Метилбензоилэкгонин

Соли производных тропана представляют собой белые кристаллические вещества, легко растворимые в воде, этаноле. В хлороформе соли атропина практически нерастворимы, скополамина – очень мало растворимы, кокаина – растворимы.

Атропин оптически неактивен: состоит из активного левовращающего и малоактивного правовращающего изомеров. Естественным алкалоидом, содержащимся в растениях, является S(-)гиосциамин; при химическом выделении алкалоида он в основном превращается в рацемическую форму – атропин.

Кокаин существует в виде четырех изомеров: *транс* (+ и -) и *цис* (+ и -). Синтетический кокаин представляет собой рацемат, из которого выделяют наиболее активный *цис*-левовращающий оптический изомер.

Введение атропина в организм сопровождается уменьшением секреции слюнных, желудочных, бронхиальных, потовых желез (последние получают симпатическую холинергическую иннервацию), поджелудочной железы, учащением сердечных сокращений (вследствие уменьшения тормозящего действия на сердце блуждающего нерва),

понижением тонуса гладкомышечных органов (bronхи, органы брюшной полости и др.). Действие атропина выражено сильнее при повышенном тонусе блуждающего нерва.

Под влиянием атропина происходит сильное расширение зрачков. Одновременно с расширением зрачка в связи с нарушением оттока жидкости из камер может наступить повышение внутриглазного давления. Расслабление ресничной мышцы цилиарного тела ведет к параличу аккомодации.

Атропин проникает через гематоэнцефалический барьер и оказывает сложное влияние на центральную нервную систему. Он обладает центральными холинолитическими свойствами и вызывает мышечное расслабление.

Гиосциамин обладает действием, аналогичным атропину, но центральное действие у него выражено в большей степени: он вызывает седативный эффект, мышечное расслабление. Иногда оказывает снотворное действие. Применяется также для предотвращения морской и воздушной болезни.

Кокаин – первое природное соединение, у которого было обнаружено местноанестезирующее действие. Он подавляет возбудимость нервных окончаний и тормозит проведение возбуждения по нервным волокнам. Кроме того, кокаин оказывает и центральное действие, вызывая эйфорию, возбуждение, а затем угнетение центральной нервной системы.

При передозировке производных тропана возникает рвота, появляется тахикардия, мидриаз (светобоязнь продолжается до нескольких дней), ослабление аккомодации. Кожа краснеет, тормозится потоотделение, развивается гипертермия. Наблюдается беспокойство, мышечная слабость, состояние возбуждения. Расстройства координации сменяются истощением, галлюцинациями, потерей сознания и комой. Летальный исход наступает вследствие паралича дыхательного центра.

При передозировках кокаина наблюдается эйфория, тремор, блеск глаз, тахикардия, повышается артериальное давление. Речь затруднена, поднимается температура, наступают судороги. Смерть наступает от дыхательного паралича и сосудистого коллапса.

Всасывание производных тропана происходит быстро через слизистые оболочки, а также из тканей после инъекции. Половина поступившего в организм атропина циркулирует в крови, а вторая половина – связывается с белками плазмы. Основные фармакокинетические параметры производных тропана представлены в таблице 14.8

Таблица 14.8

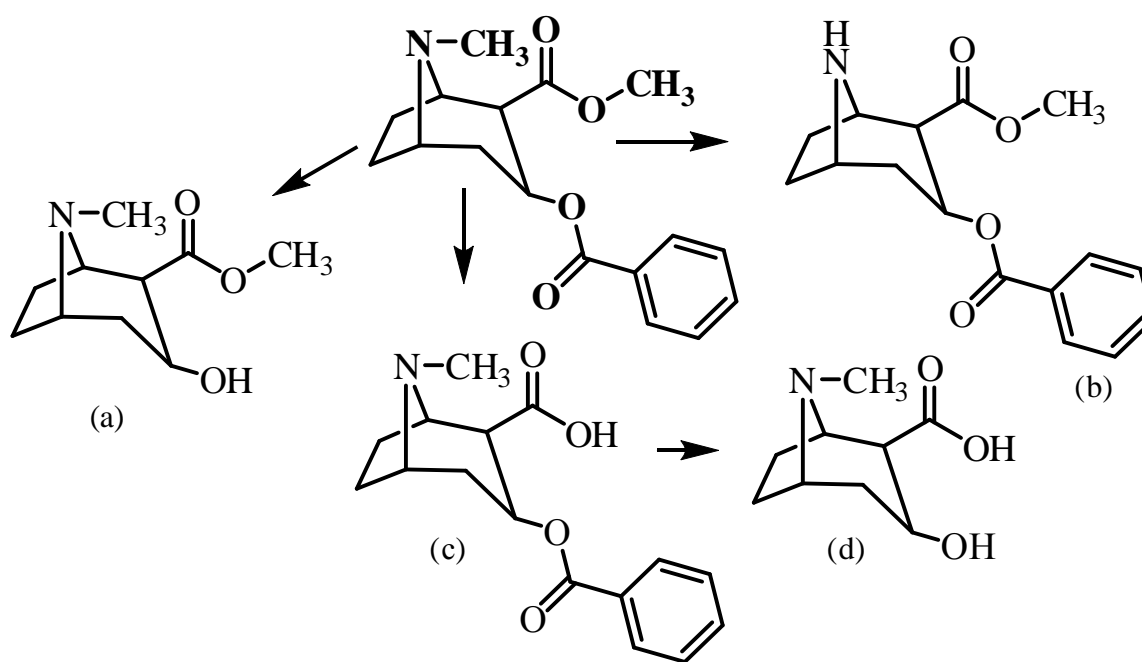
Основные фармакокинетические параметры производных тропана

Соединение	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Атропин	9,9	2-4	2-3	8	50
Скополамин	7,6	-	-	-	50
Кокаин	8,6	0,7-1,5	1-3	10-32	-

Выделение производных тропана происходит через почки в неизменном виде и в виде метаболитов. В результате метаболизма атропина и скополамина образуются тропин, скопин, троповая кислота, норатропин, норскопин, норскополамин и глюкурониды.

Около 50 % атропина и 5% кокаина выводятся из организма с мочой в неизменном виде.

Кокаин метаболизируется с образованием метилового эфира экгонина (а), норкокаина (b), бензоилэкгонина (с) и экгонина (d).



(14.28)

Экгонин не экстрагируется ни из кислого, ни из щелочного растворов. Для доказательства наличия экгонина его нужно перевести в метиловый эфир, который хорошо экстрагируется хлороформом.

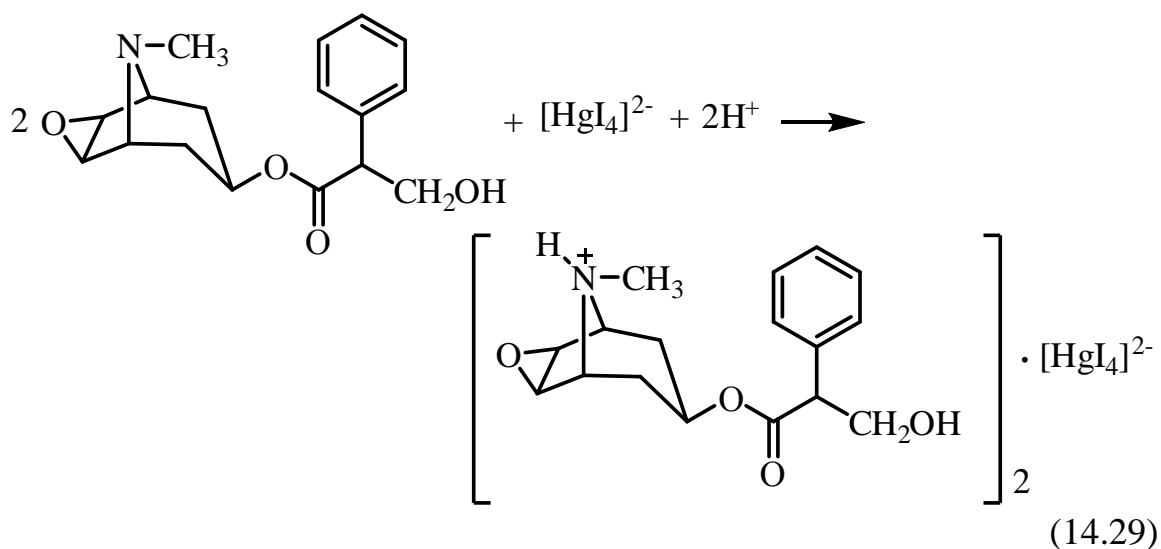
После приема токсичных доз производных тропана и экгонина необходимо как можно быстрее дать выпить теплую соленую воду, крепкий чай или раствор перманганата калия и вызвать рвоту. При тяжелых отравлениях промывают желудок и вызывают форсированный диурез.

14.12.2. Изолирование и определение производных тропана

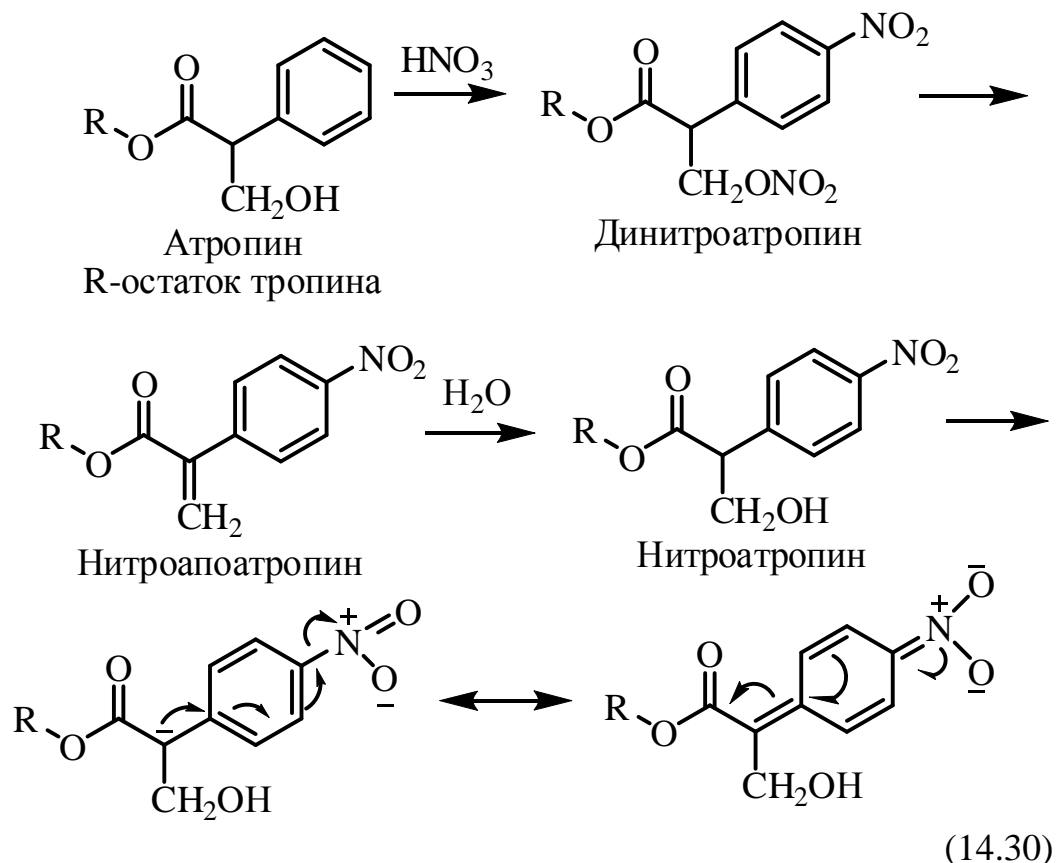
Изолирование производных тропана в зависимости от цели исследования и вида биоматериала проводят методами Стаса – Отто, Крамаренко, Швайковой – Васильевой. Максимальные количества атропина экстрагируются хлороформом при значении pH 9–11; скополамина – 8–10; кокаина – 7,0–8,5.

Обнаружение производных тропана

Выполнение реакции с общеалкалоидными осадительными реактивами: 0,5 мл хлороформного экстракта упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю общеалкалоидного реактива (реактивы Драгендорфа, Бушарда, Майера). При наличии атропина (скополамина, кокаина) образуются осадки характерной окраски и с характерной формой кристаллов.



Выполнение реакция Витали-Морена: в фарфоровую чашку вносят 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта и при комнатной температуре упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и на кипящей водяной бане упаривают досуха. При этом сухой остаток приобретает желтую окраску. К сухому остатку с одной стороны прибавляют каплю ацетона, с другой стороны – каплю 10% этанольного раствора гидроксида калия. При соприкосновении указанных растворов с сухим остатком появляется фиолетовая окраска. Чувствительность реакции – 1 мкг атропина. Кроме атропина реакцию Витали-Морена дают гиосциамин, скополамин, стрихнин, производные фенотиазина и другие вещества.



Реакция атропина с пикриновой кислотой: 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Рядом с полученной каплей помещают каплю 0,5% раствора пикриновой кислоты. При соединении этих растворов через 15–20 мин образуется светло-желтый кристаллический осадок в виде пластинок и сростков из них (рис. 14.1). Чувствительность реакции – 5 мкг атропина.

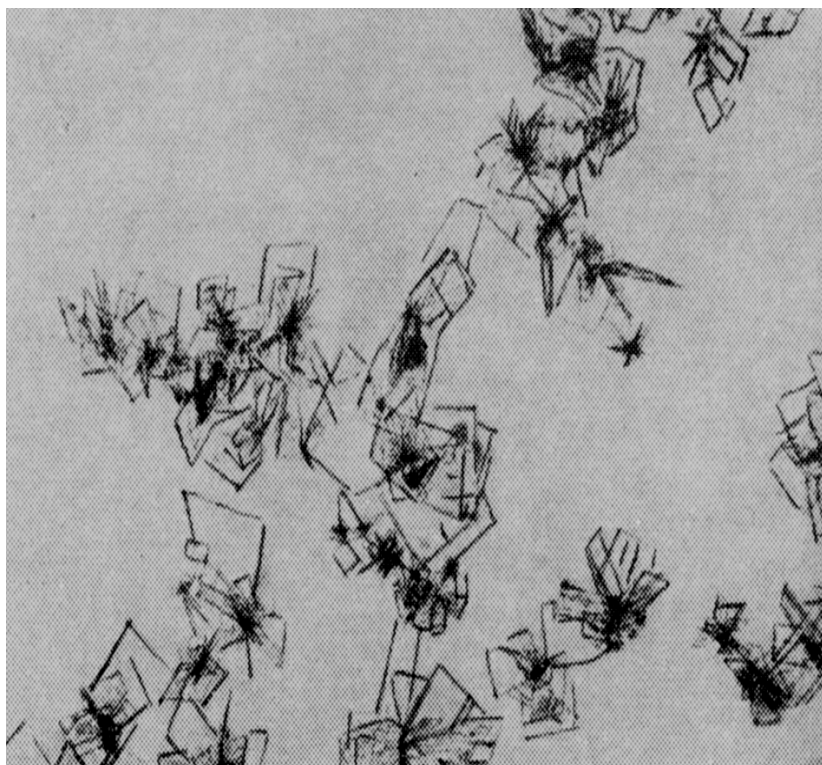
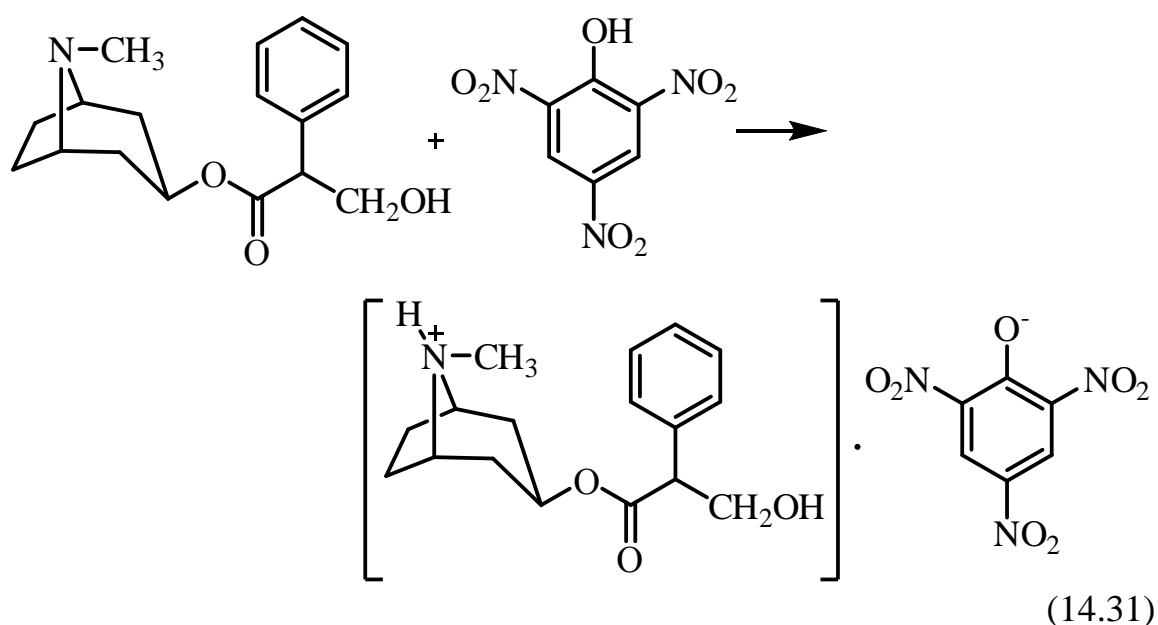


Рис. 14.1 Кристаллы пикрата атропина



Реакция атропина и скополамина с солью Рейнеке: 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Рядом с полученной каплей помещают каплю 1% свежеприготовленного раствора соли Рейнеке ($\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]$). Капли растворов соединяют. В результате образуется аморфный осадок сиреневого цвета, бы-

стро переходящий в кристаллический (рис. 14.2 – 14.3) Чувствительность реакции – 0,1 мкг атропина, 3 мкг скополамина.

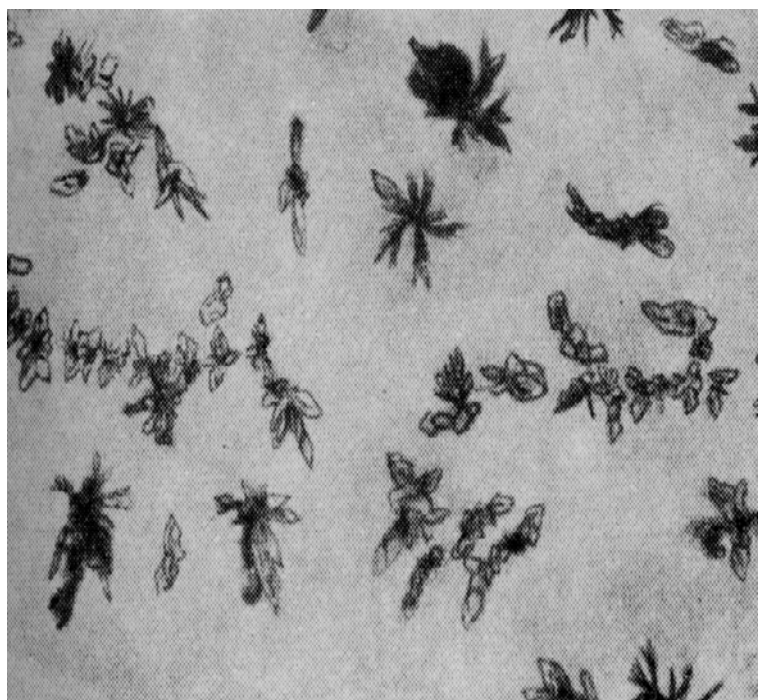


Рис. 14.2. Кристаллы продукта взаимодействия атропина с солью Рейнеке

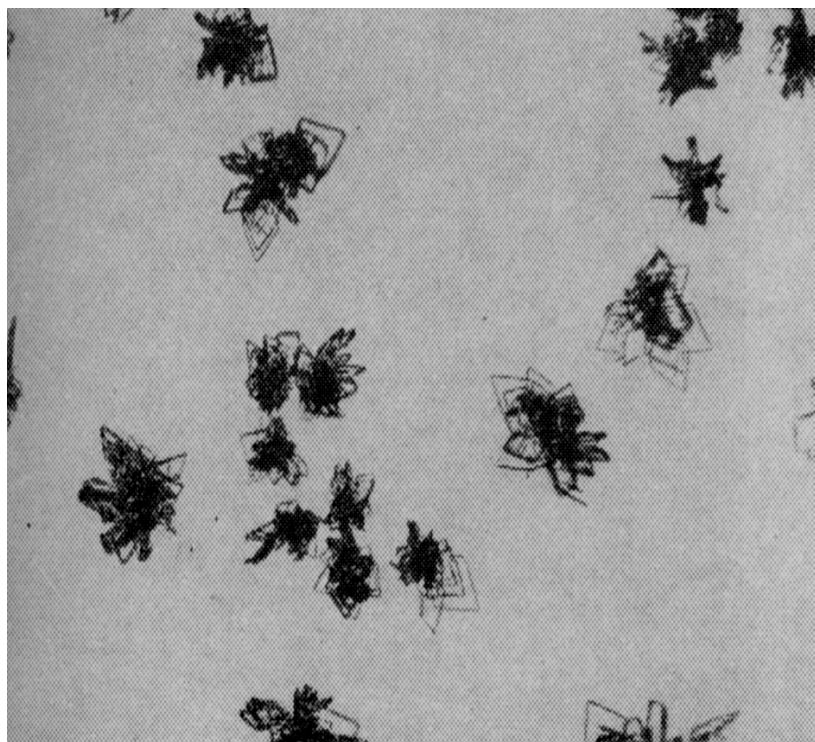


Рис. 14.3 Кристаллы продукта взаимодействия скополамина с солью Рейнеке

Реакция производных тропана с *n*-диметиламинобензальдегидом: 2–3 капли исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха, растворяют в капле 0,1 М хлороводородной кислоты, прибавляют 3–5 капель 0,5% раствора *n*-диметиламинобензальдегида в концентрированной серной кислоте. Жидкость взбалтывают и нагревают на водяной бане 5–10 минут.

При взаимодействии атропина и скополамина с *n*-диметиламинобензальдегидом в серной кислоте происходит образование красной окраски, которая переходит в вишневую, а затем в фиолетовую.

При взаимодействии морфина и кодеина с *n*-диметиламинобензальдегидом так же проявляется красная окраска, которая не изменяется. Кокаин с *n*-диметиламинобензальдегидом не образует окрашенного соединения.

Реакция скополамина с золотобромоводородной кислотой: несколько капель исследуемого хлороформного экстракта помещают на предметное стекло и упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю 0,1 М раствора хлороводородной кислоты и каплю реактива (смесь равных объемов 5% раствора золотохлороводородной кислоты, концентрированной хлороводородной кислоты и ацетона). После этого к жидкости прибавляют несколько кристалликов калия бромида. При наличии скополамина в исследуемом экстракте образуются светло-коричневые, желтые или оранжево-красные кристаллы. Реакция характерна для скополамина (рис. 14.4). Чувствительность реакции – 1 мкг скополамина.

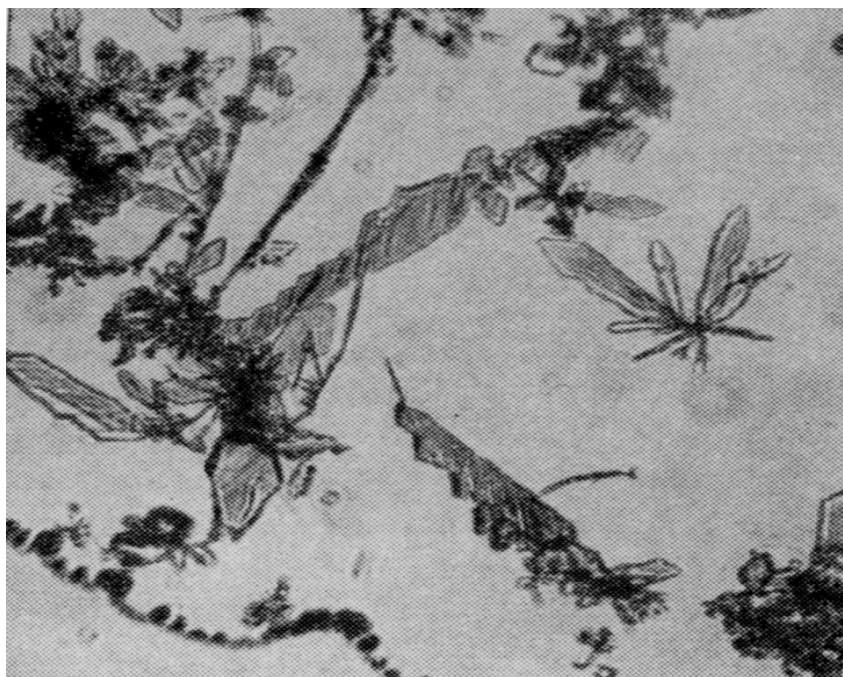


Рис. 14.4. Кристаллы продукта взаимодействия скополамина с золотобромоводородной кислотой

Реакция кокаина с перманганатом калия: сухой остаток после упаривания хлороформного экстракта растворяют в капле 10% раствора хлороводородной кислоты и полученный раствор снова упаривают досуха. Эту операцию повторяют еще один раз. Затем к сухому остатку прибавляют каплю 1% раствора перманганата калия. При наличии в пробе кокаина через 10–20 мин появляются красно-фиолетовые кристаллы в виде прямоугольных пластинок и сростков из них (14.5). Чувствительность реакции – 4 мкг кокаина.

Наиболее чувствительными осадительными реактивами на кокаин являются реактивы Шейблера, Драгендорфа, Майера и Бушарда (см. «Приложения»).

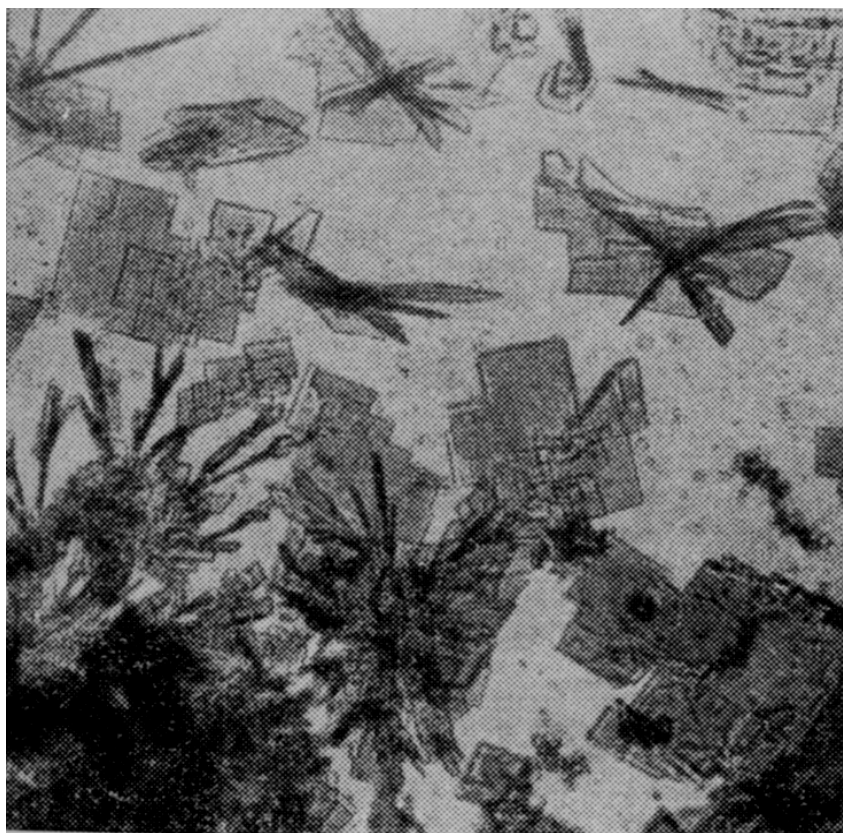
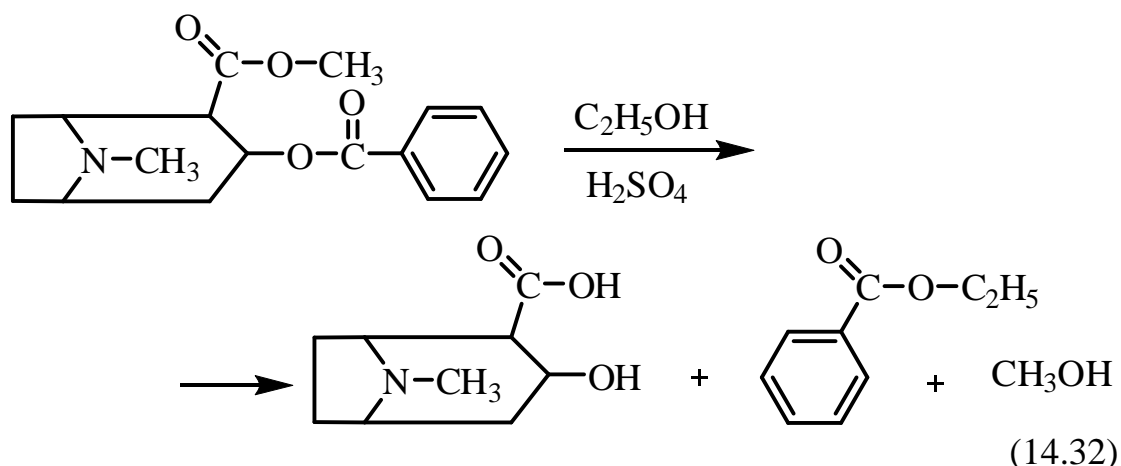


Рис. 14.5. Кристаллы перманганата кокаина

Реакция образования этилбензоата: к сухому остатку, полученному после упаривания хлороформной вытяжки, прибавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и 2 мл этанола. Смесь нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Появление характерного запаха бензойноэтилового эфира указывает на наличие кокаина в пробе.



УФ- и ИК-спектры. В таблице 14.9 представлены основные полосы поглощения растворов производных тропана в УФ- и ИК-областях.

Таблица 14.9

Спектральные характеристики производных тропана

Вещество	УФ-область, нм	ИК-область, см ⁻¹
Атропин	252, 258, 264 (0,1 М H ₂ SO ₄)	1035, 1153, 1720
Скополамин	251, 257, 263 (0,1 М H ₂ SO ₄)	1041, 1060, 1165, 1725
Кокаин	230, 274, 281 (этанол) 233, 275 (0,1 М H ₂ SO ₄)	1106, 1275, 1700, 1728

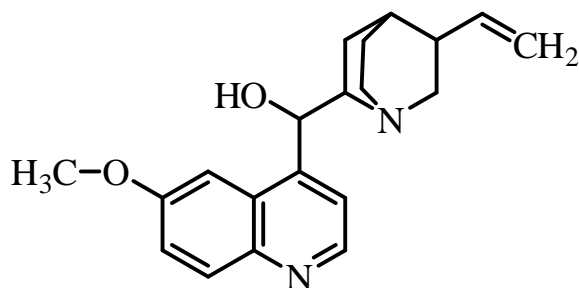
Тонкослойная хроматография. Неподвижная фаза – силикагель, подвижные фазы: хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2), хлороформ-диэтиламин (9:1), циклогексан-ацетон (5:1); реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье.

Фармакологическая проба (расширение зрачка кошки, см. «Приложения»). Чувствительность – 0,2 мкг атропина.

Количественное определение: ГЖХ, ВЭЖХ.

14.13. Алкалоиды, производные хинолина и изохинолина

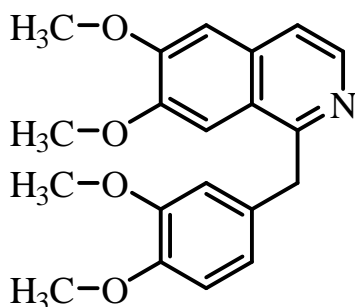
Алкалоиды хинин, хинидин, цинхонин, цинхонидин содержатся в коре различных видов хинного дерева. В медицинской практике применяются гидрохлорид, дигидрохлорид и сульфат хинина.



Хинин

6'-метоксихинолил-(4')-[5-винилхинуклидил-(2)]-карбинол

Алкалоид папаверин содержится в опиоиде в количестве 0,1–1,5%. В медицинской практике применяется гидрохлорид папаверина.



Папаверин

6,7-диметокси-1-(3',4'-диметоксибензил)-изохинолин

14.13.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных хинолина и изохинолина

Соли хинина представляют бесцветные кристаллические вещества, желтеющие под действием света. Они являются очень горькими на вкус. Хинин является двуосновным основанием, что обусловлено наличием в его молекуле двух атомов азота (в хинолиновой и хинуклидиновой системах). Ядро хинуклидина является более выраженным центром основности, так как неподеленная пара электронов локализована на атоме азота. Хинин образует два типа солей: основные и нейтральные. Растворы солей обладают кислой реакцией среды. Соли хинина различаются по растворимости в воде. Например, дигидрохлорид хинина очень легко растворим, гидрохлорид – растворим, сульфат – мало растворим в воде. Основание хинина растворяется в этаноле, хлороформе, диэтиловом эфире, насыщенном водой. В воде основание хинина растворяется мало.

Папаверина гидрохлорид представляет собой белое кристаллическое вещество, умеренно растворимое в воде, мало растворим в этаноле, растворим в хлороформе, почти не растворяется в диэтиловом эфире.

Хинин характерным свойством хинина является его противомаларийное действие. В настоящее время он применяется при устойчивости малярийного плазмодия к другим противомаларийным средствам (например, хлорохину). Ранее хинин применяли также при аритмиях и в акушерской практике для усиления родовой деятельности.

Примерно через 15 минут после приема токсичных доз хинина могут появиться тошнота, рвота, головная боль, шум в ушах, тугоухость (иногда полная глухота), нарушение равновесия, расстройства зрения. Возникает понос, боли в животе, снижается температура тела. Появляется возбуждение, иногда судороги. Утрачивается сознание, больной впадает в кому. Происходит нарушение сердечного ритма, падение артериального давления вплоть до коллапса. Смерть наступает вследствие паралича дыхательного центра или поражения мышцы сердца.

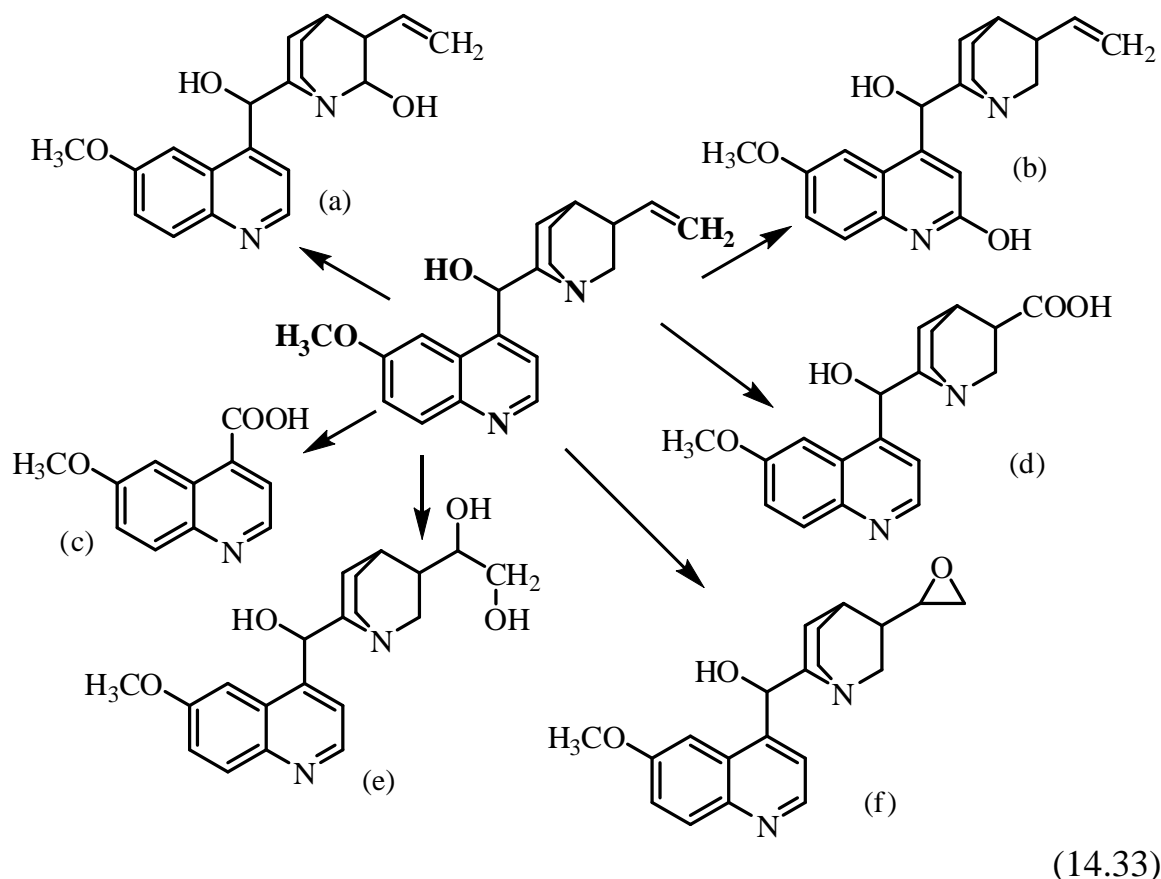
Всасывание хинина в кровь происходит в тонком кишечнике. Основные фармакокинетические параметры хинина представлены в таблице 14.10.

Таблица 14.10

Основные фармакокинетические параметры производных хинина и изохинолина

Соединение	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	P_b , %
Хинин	4,1; 8,5	4-15	2	70
Папаверин	6,4	7	-	90

Выведение хинина из организма происходит главным образом в виде метаболитов, а также с мочой и калом в неизменном виде (3-5 %). Основными метаболитами являются 2-оксихинин (а), 2'-оксихинин (б), гемохинная кислота (с), хинетин (д), хинин-10,11-дигидродиол (е), хинин-10,11-эпоксид (ф), глюкурониды и другие.



После приема токсичных доз хинина необходимо вызвать рвоту, промыть желудок с использованием активированного угля или назначить слабительное (натрия сульфат). Для ускорения выведения яда необходимо обильное питьё. В тяжелых случаях проводят форсированный диурез, перитонеальный диализ.

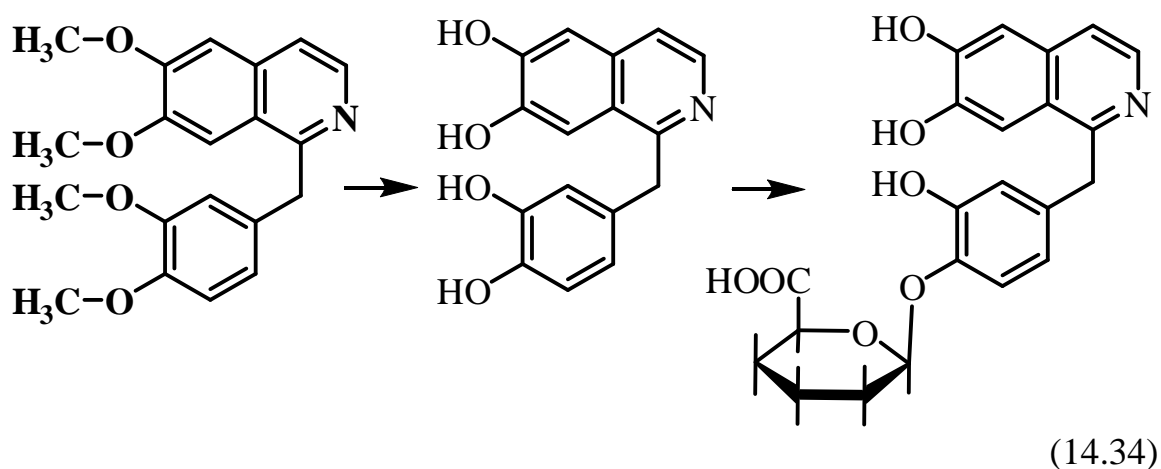
Папаверин является миотропным спазмолитическим средством. Он понижает тонус и уменьшает сократительную деятельность гладкой мускулатуры и оказывает в связи с этим сосудорасширяющее и спазмолитическое действие.

В больших дозах он понижает возбудимость сердечной мышцы и замедляет внутрисердечную проводимость. Папаверин широко применяют как спазмолитическое средство при спазмах гладкой мускулатуры органов брюшной полости (при холециститах, спастических колитах, при спазмах мочевыводящих путей), при спазмах бронхов, а также при спазмах периферических сосудов мозга.

Ранее папаверин относительно широко применяли (внутри) для профилактики приступов стенокардии. Папаверин производит некоторый эффект, однако в настоящее время для этой цели пользуются более эффективными антиангинальными средствами. Иногда папаверин применяют парентерально в сочетании с промедолом или другими анальгезирующими и спазмолитическими препаратами для купирования приступов стенокардии.

При передозировках папаверина наблюдается снижение артериального давления, появляется аритмия, сердечная недостаточность, головокружение, утомление, рвота, атония желудочно-кишечного тракта. В тяжелых случаях возникают судороги, паралич, кома. Летальный исход наступает вследствие сердечно-сосудистой недостаточности.

Всасывание папаверина из тканей и желудочно-кишечного тракта происходит быстро. Основные фармакокинетические параметры представлены в таблице. Выведение происходит преимущественно в виде метаболитов через почки. Основными продуктами метаболизма являются продукты деметилирования и их глюкурониды и сульфаты.



При отравлении папаверином проводят промывание желудка, назначают активированный уголь и слабительные средства, а затем проводят симптоматическое лечение: устраняют расстройства кровообращения, вводят противоаритмические лекарственные средства.

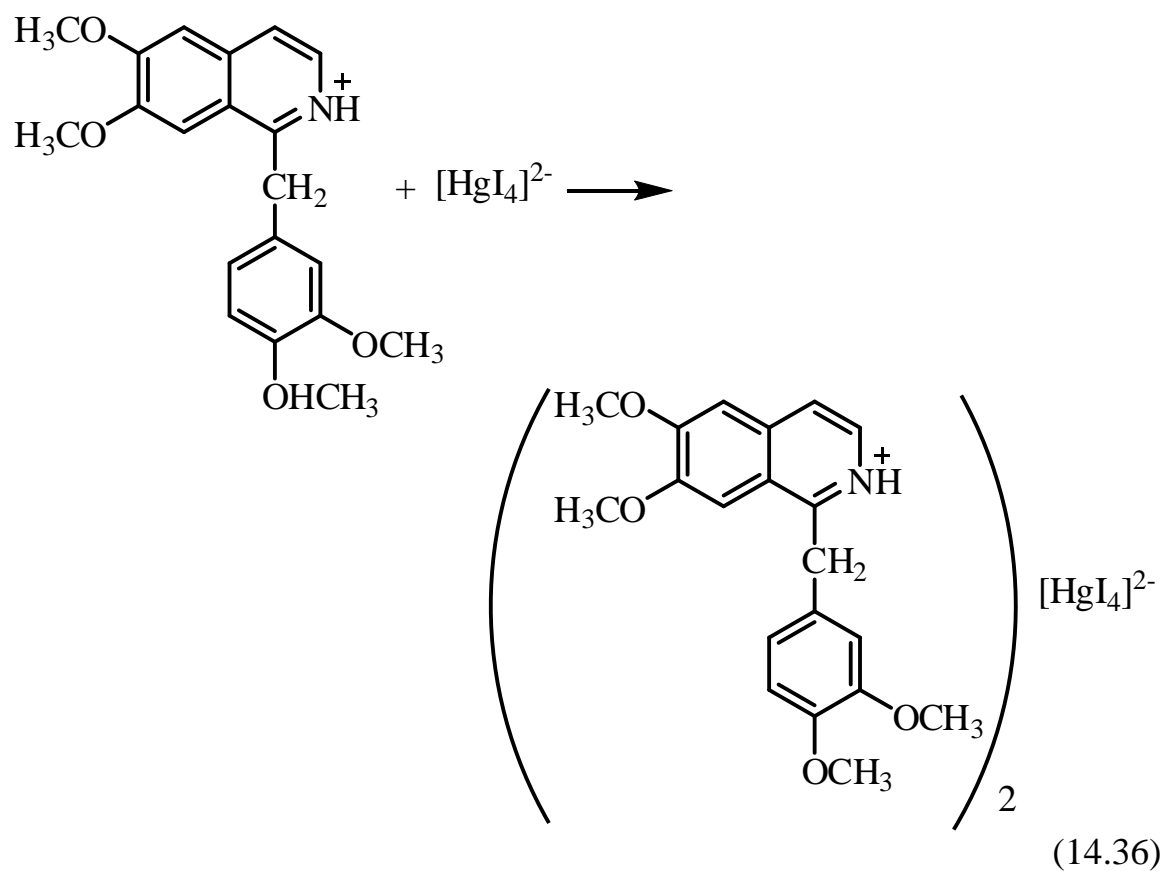
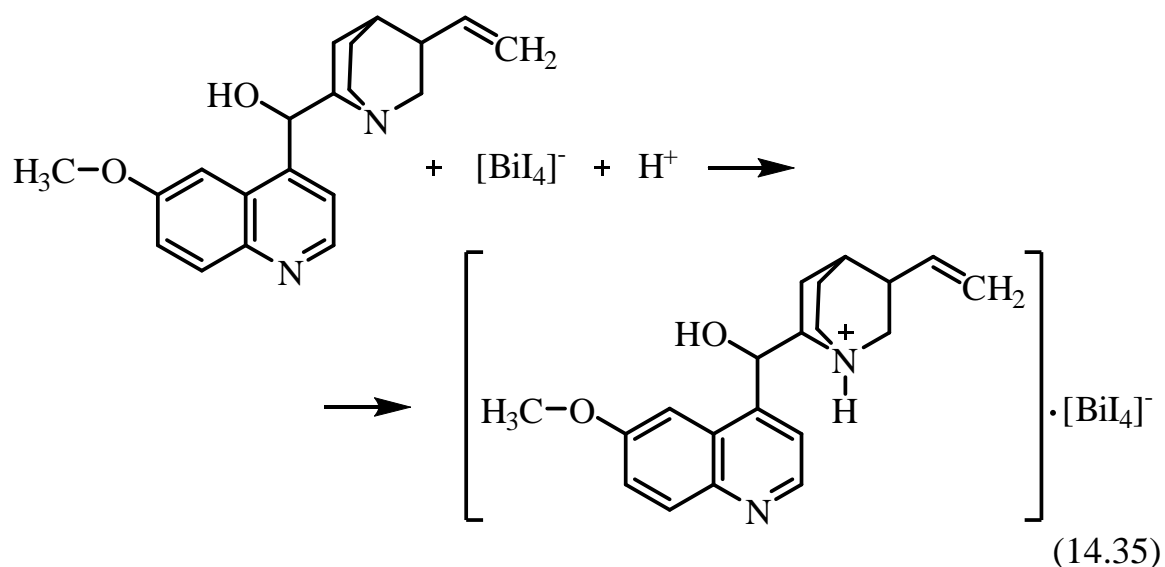
14.13.2. Изолирование и определение хинина и папаверина

Изолирование хинина и папаверина проводят методами Стаса – Отто, Крамаренко, Швайковой – Васильевой. Максимальные количества хинина экстрагируются хлороформом при значении pH 9–10; папаверина – 8–10. Папаверин частично экстрагируется из растворов при pH 2–3.

Для обнаружения хинина и папаверина применяют как общеалкалоидные осадительные реактивы (см. «Приложения»), так и проводят характерные реакции.

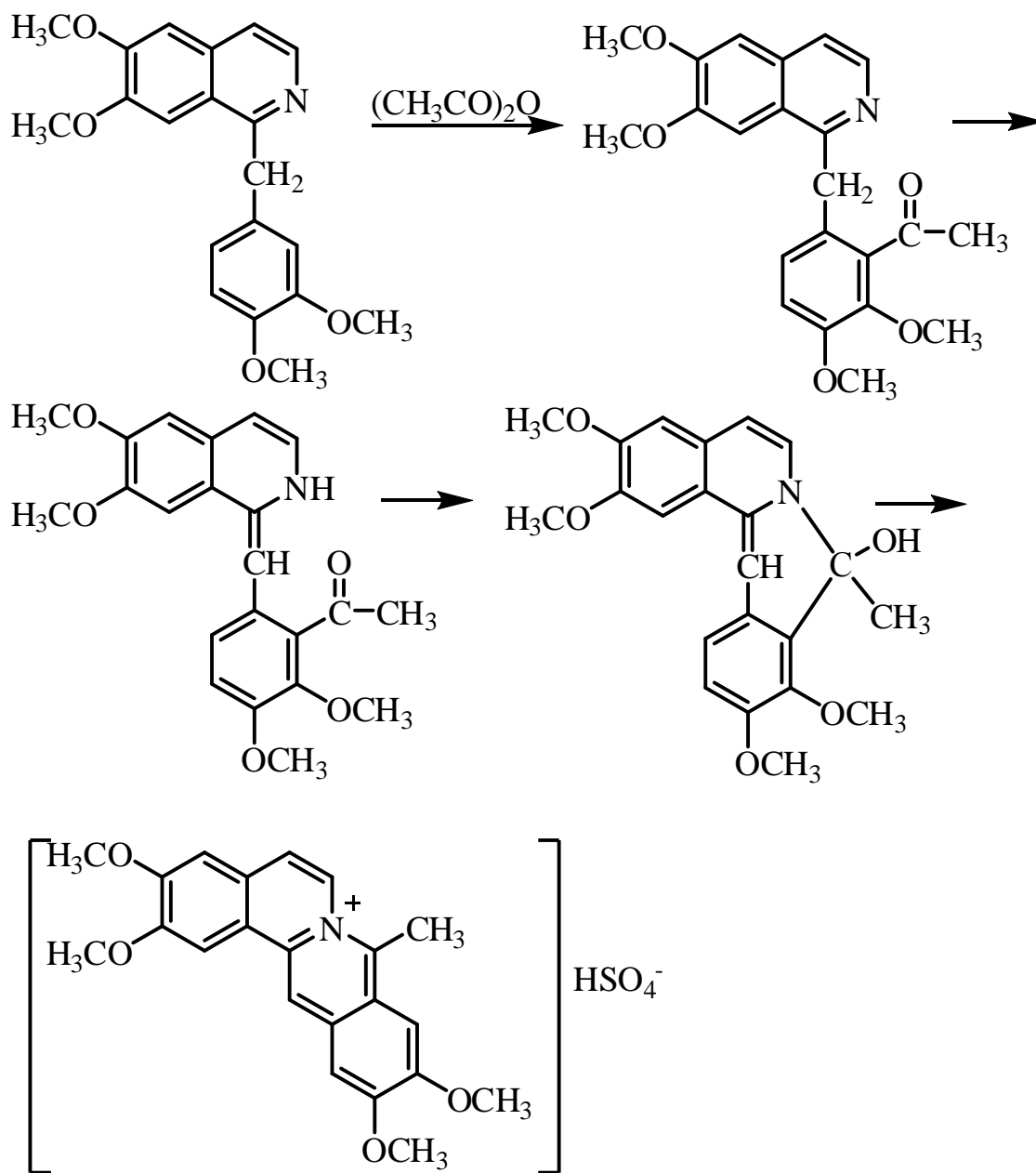
Реакция с общеалкалоидными реактивами: 0,5 мл хлороформного экстракта упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю общеалкалоидного реактива. При наличии произ-

водных хинолина и изохинолина образуются осадки с характерной формой кристаллов.



Характерной реакцией на папаверин является *каролиновая* проба: к исследуемому порошку прибавляют концентрированную серную кислоту, уксусный ангидрид и нагревают. Появление ярко-желтого ок-

рашивания и зеленой флуоресценции указывает на наличие папаверина:



(14.37)

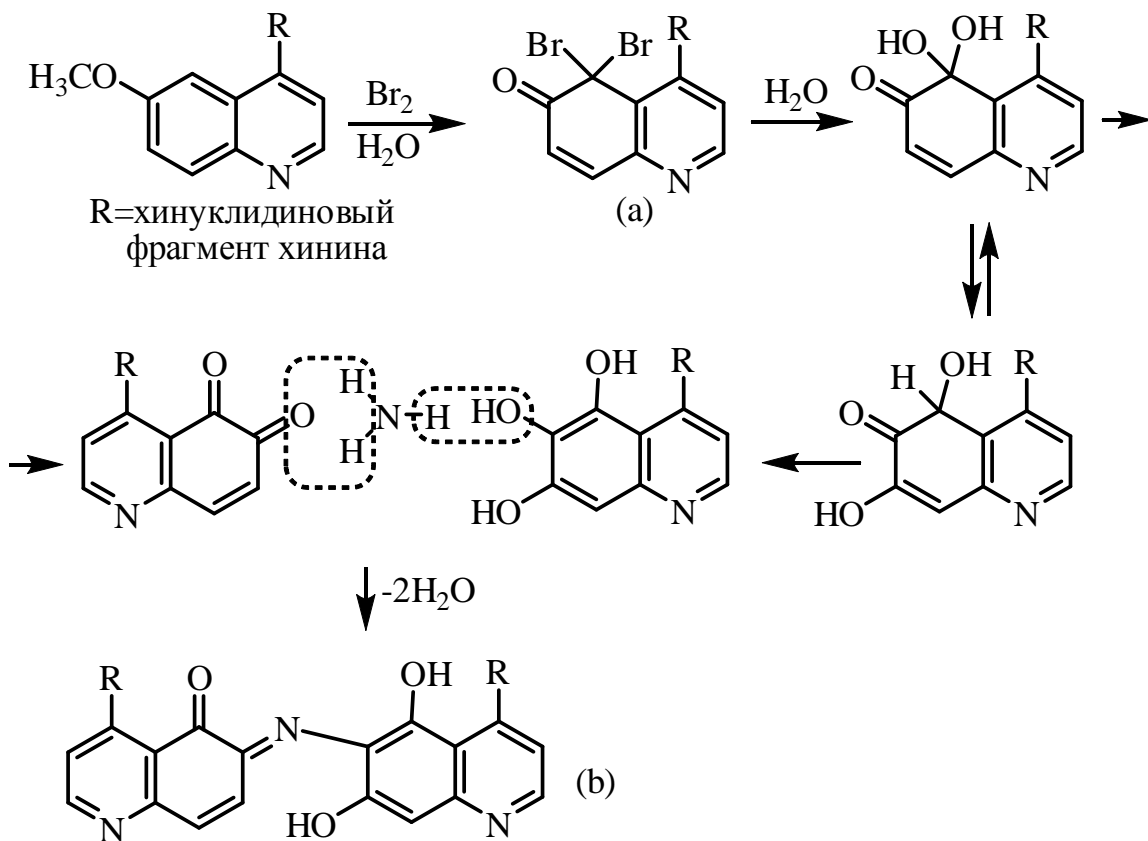
Флуоресценция растворов хинина: растворы хинина, подкисленные серной кислотой, имеют голубую флуоресценцию. Чувствительность реакции – 8,4 нг/мл. При наличии ионов хлора и некоторых других ионов в растворах флуоресценция хинина ослабляется.

Флуоресценция хинина как двухосновного основания зависит от pH среды. В кислой среде хинин имеет голубую флуоресценцию. В щелочной среде (pH ~ 9) хинин имеет фиолетовую флуоресценцию. Для продуктов окисления хинина характерна желто-зеленая флуоресценция.

Методика выполнения реакции: исследуемый хлороформный экстракт упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1–2 мл 0,05 М раствора серной кислоты. Полученный раствор переносят в пробирку, которую облучают УФ-лучами. При наличии хинина появляется голубая флуоресценция раствора. От прибавления к этой жидкости нескольких капель 0,1 М раствора гидроксида натрия интенсивность голубой флуоресценции ослабевает, а затем (при pH ~ 9) появляется фиолетовая флуоресценция.

Если к раствору хинина, подкисленному серной кислотой, прибавить несколько капель бромной воды, разбавленной десятикратным объемом воды (до полного тушения флуоресценции), а затем прибавить несколько капель 25%-го раствора аммиака до щелочной реакции, то появляется желто-зеленая флуоресценция.

Талейохинная проба: При окислении и галогенировании бромной водой хинолинового фрагмента происходит образование 5,5-дибром-6-оксо-хинолинпроизводного (а), которое затем гидратируется, изомеризуется и конденсируется с аммиаком. В результате реакции получается оксолонный краситель талейохин (b) зеленого цвета. Эта реакция характерна только для алкалоидов хинной коры, содержащих метокси группу. Поэтому талейохинная реакция является достаточно селективной в отношении хинина.

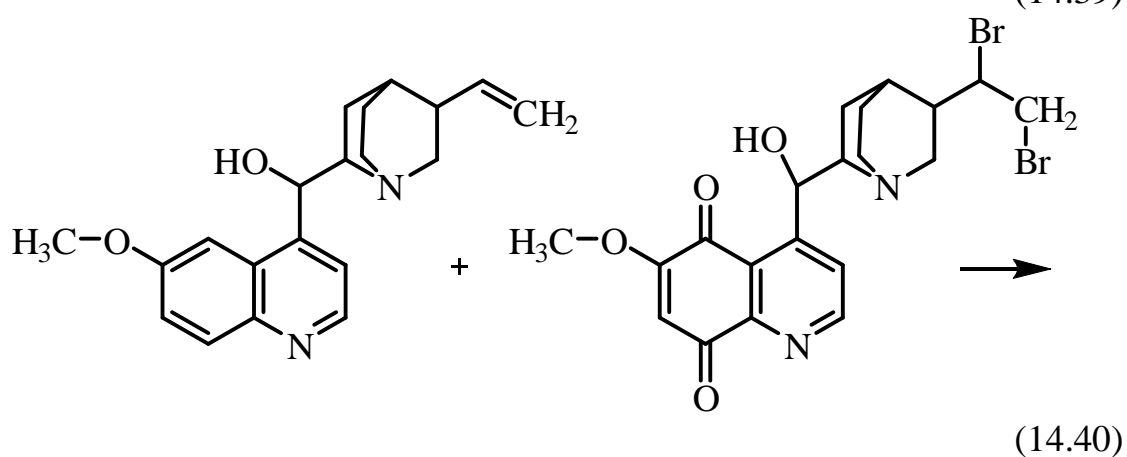
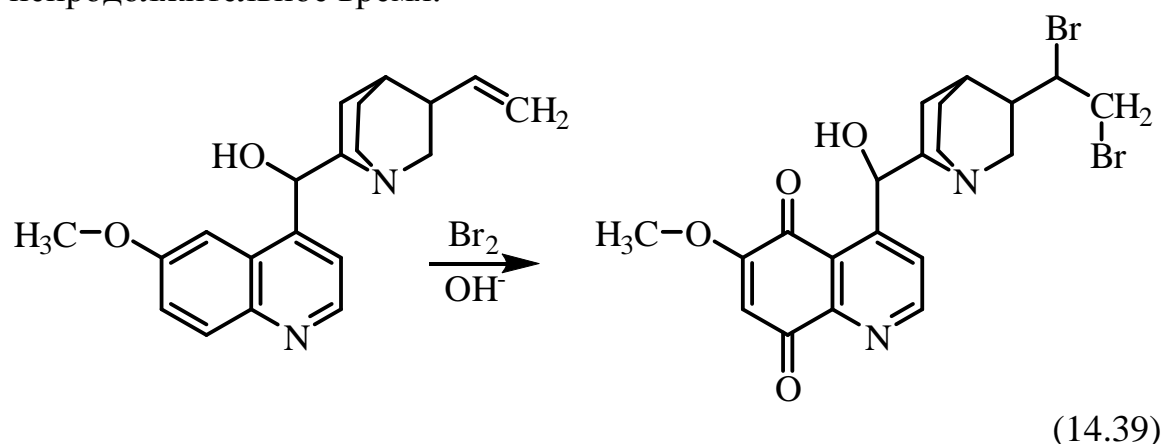


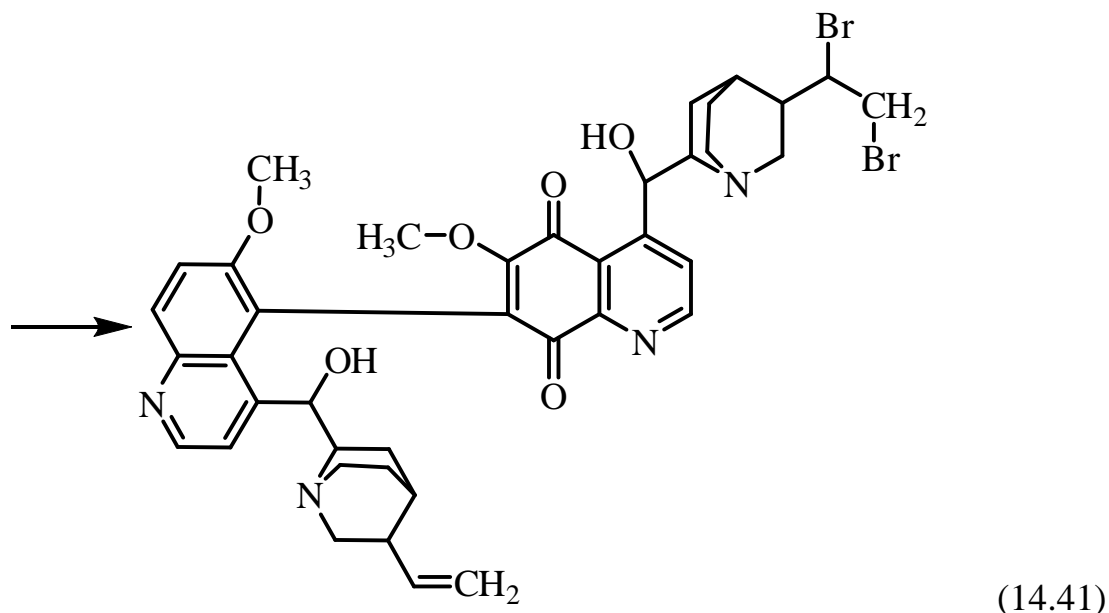
(14.38)

В процессе реакции образуются и другие талейохины, в которых возможно образование связей азота с 5,5- и 5,6- углеродными атомами.

Методика выполнения реакции: исследуемый хлороформный экстракт упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 мл воды, по каплям прибавляют бромную воду (избегая ее избытка) до слабо-желтой окраски. От прибавления нескольких капель раствора аммиака к слабо-желтому раствору появляется ярко-зеленая окраска, которая при нейтральной реакции становится синей, а при добавлении кислоты переходит в красную или фиолетовую. При взбалтывании жидкости, имеющей зеленую окраску, с хлороформом последний приобретает зеленую окраску. Реакции мешают антипирин, кофеин и др.

Эритрохинная реакция: эта реакция в десять раз более чувствительна (10 мкг/мл), чем талейохинная реакция. Но окраска сохраняется непродолжительное время.





Методика выполнения реакции: несколько капель исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха, прибавляют 1 мл воды, слабо подкисленной серной или уксусной кислотой, каплю бромной воды и каплю 10% раствора гексацианоферрата (III) калия. Полученную жидкость хорошо взбалтывают, затем по каплям прибавляют аммиак до щелочной реакции. При наличии хинина в исследуемом растворе появляется соединение розовой или красно-фиолетовой окраски, которое при взбалтывании с хлороформом переходит в хлороформный слой.

Реакция папаверина с цианидом натрия: к сухому остатку на предметном стекле прибавляют по капле 0,1 М раствор HCl и 0,5% раствор цианида натрия, через 5–10 минут под микроскопом наблюдают призматические кристаллы, собранные в сферолиты. Чувствительность реакции – 0,5 мкг папаверина.

Реакция папаверина с хлоридом кадмия: на предметное стекло помещают каплю исследуемого хлороформного экстракта и упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, рядом каплю 10% раствора хлорида кадмия и соединяют эти растворы. В месте соединения капель появляются сростки тонких пластинок или кубические кристаллы (рис. 14.6). Чувствительность реакции – 10 мкг папаверина.

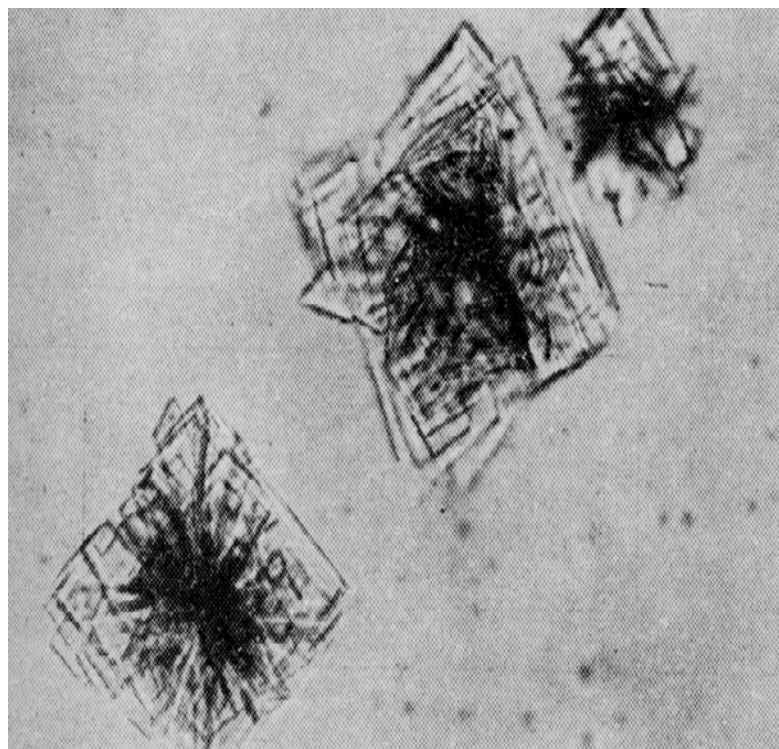


Рис. 14.6. Кристаллы продукта взаимодействия папаверина с хлоридом кадмия

УФ- и ИК-спектры. В таблице 14.11 приведены спектральные характеристики хинина и папаверина.

Таблица 14.11

Спектральные характеристики хинина и папаверина

Вещество	УФ-область, нм	ИК-область, см ⁻¹
Хинин	236, 278, 332 (этанол) 250, 316, 346 (0,1 М H ₂ SO ₄)	1030, 1235, 1510, 1619
Папаверин	250, 284, 310 (0,1 М HCl)	1068, 1273, 1507

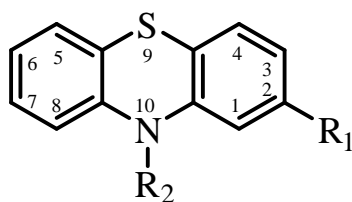
Тонкослойная хроматография. Неподвижная фаза – силикагель, подвижные фазы: диоксан-хлороформ-ацетон-25% раствор аммиака (47,5:45:5:2,5), диэтиловый эфир-ацетон-25% раствор аммиака (40:20:2), хлороформ-диэтиламин (9:1), хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2); реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье.

Количественное определение: флуориметрия и ВЭЖХ.

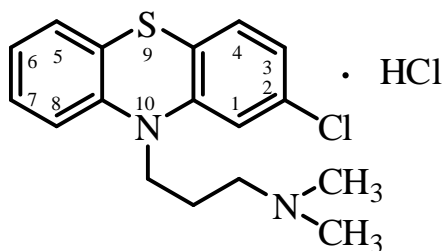
14.14. Лекарственные вещества, производные фенотиазина

В медицинской практике применяются более 50 лекарственных средств, содержащих производные фенотиазина. Наряду с отравления-

ми производными фенотиазина наблюдаются и комбинированные отравления производными фенотиазина и производными барбитуровой кислоты, производными 1,4-бензодиазепина и др. Различают 10-алкилпроизводные, т.е. к N₁₀ присоединена группа, состоящая из 2–4 углеродных атомов и диалкиламиногруппы (аминазин, дипразин, левомепромазин), ядро пиперидина (тиоридазин), пиперазина (трифлуоперазин, флуфеназин и др.) и 10-ацилпроизводные – к N₁₀ присоединена ацильная и диалкиламиногруппы (этмозин, этацизин).

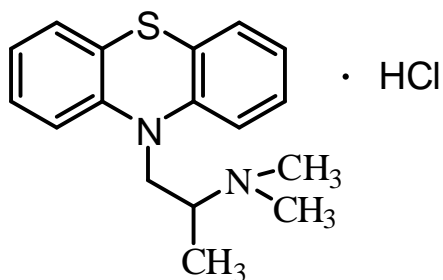


Ниже приведены структурные формулы некоторых производных фенотиазина.



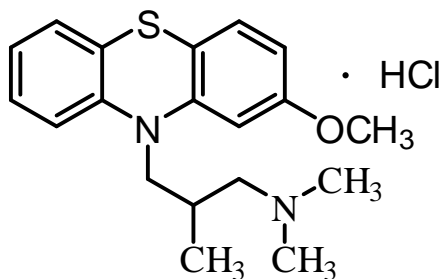
Хлорпромазин

Аминазин, хлоразин, плегомазин, ларгактил, эсминд, новомазин; 2-хлор-N,N-диметил-10Н-фенотиазин-10-пропанамин



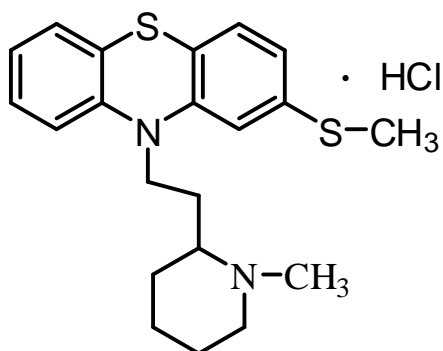
Прометазин

Дипразин, пипольфен, протазин, пенерган; N,N,α-триметил-10Н-фенотиазин-10-этанамин



Левомепромазин

Тизерцин, метотримепразин, левопромазин, (βR)-2-метокси-N,N,β-триметил-10Н-фенотиазин-10-пропанамин



Тиоридазин

Сонапакс, меллереттен, ридерил, меллерил; 10-[2-(1-метил-2-пиперидинил)этил]-2-(метилтио)-10Н-фенотиазин

14.14.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных фенотиазина

Производные фенотиазинов в виде гидрохлоридов представляют собой белые или белые с кремоватым оттенком кристаллические порошки, гигроскопичные, хорошо растворимые в воде, этаноле, хлороформе, практически нерастворимые в эфире и бензоле. Основания фенотиазинов также хорошо растворимы в этаноле, хлороформе и эфире, плохо – в воде. Константы распределения оснований и хлоридов фенотиазинов в системе хлороформ-вода различаются незначительно (12,3 и 16,6).

Производные фенотиазина являются очень лабильными соединениями и легко окисляются кислородом воздуха в процессе хранения и изолирования из биоматериала.

Основные свойства производных фенотиазина обусловлены наличием sp^3 -гибридного атома азота в боковой цепи ($pK_{BH^+} \approx 9$) и sp^2 -гибридного азота в фенотиазиновом ядре ($pK_{BH^+} \approx 4$).

УФ-спектры солей и оснований производных фенотиазина практически идентичны и характеризуются двумя максимумами: 250-260 нм ($\epsilon = 35000$) и 300-315 нм ($\epsilon = 4500$). Некоторое исключение составляют производные фенотиазина, содержащие во втором положении радикалы со свободными π -электронами (левомепромазин и тиоридазин). Спектральные характеристики сульфоксидов (основные метаболиты) в УФ-области более информативны, т.к. в отличие от нативных соединений они имеют по 3–4 максимума поглощения.

Аминазин является одним из основных представителей нейролептиков. Несмотря на появление многочисленных новых нейролептических лекарственных средств, он продолжает широко применяться в медицинской практике.

Одной из главных особенностей действия аминазина на центральную нервную систему является относительно сильный седативный эффект. Нарастающее с увеличением дозы аминазина общее успокоение сопровождается угнетением условно-рефлекторной деятельно-

сти, уменьшением спонтанной двигательной активности и некоторым расслаблением скелетной мускулатуры; наступает состояние пониженной реактивности к эндогенным и экзогенным стимулам, при больших дозах может развиваться состояние сна.

Аминазин усиливает действие снотворных, наркотиков, анальгетиков, местноанестезирующих веществ. Действие противосудорожных средств под влиянием аминазина усиливается, но в отдельных случаях аминазин может вызвать судорожные явления.

Аминазин оказывает сильное противорвотное действие и успокаивает икоту, оказывает гипотермическое действие, особенно при искусственном охлаждении организма. В отдельных же случаях у больных при парентеральном введении температура повышается, что связано с влиянием на центры терморегуляции и частично с местным раздражающим действием.

Важным свойством аминазина является его блокирующее влияние на центральные адренергические и дофаминергические рецепторы. Он уменьшает или даже полностью устраняет повышение артериального давления и другие эффекты, вызываемые адреналином.

Важнейшее свойство аминазина – его антипсихотическое действие и способность влиять на эмоциональную сферу человека. При помощи аминазина удается купировать различные виды психомоторного возбуждения, ослаблять или полностью купировать бред и галлюцинации, уменьшать или снимать страх, тревогу, напряжение у больных психозами и неврозами. Поэтому он широко применяется в психиатрической практике.

Левомепромазин обладает фармакологическими свойствами, близкими к аминазину. Он обладает более выраженной способностью потенцировать анальгетики и снотворные лекарственные средства, обладает большим гипотермическим действием, обладает выраженной противогистаминной активностью.

Тиоридазин по антипсихотической активности уступает аминазину и левомепромазину. Антипсихотическое действие сочетается с успокаивающим эффектом без выраженной заторможенности, вялости, эмоциональной индифферентности. Оказывает умеренное стимулирующее действие. Наряду с нейролептическим действием оказывает умеренный антидепрессивный эффект.

Наиболее важной особенностью дипразина является выраженный противогистаминный эффект. Поэтому он применяется при лечении аллергических заболеваний.

Основным побочным эффектом нейролептиков является паркинсонический синдром (дрожание конечностей), замедленность движений, снижение двигательной активности и др. Кроме того в результате

применения нейролептиков развивается депрессия, поражаются печень и кровь, наблюдаются эндокринные нарушения.

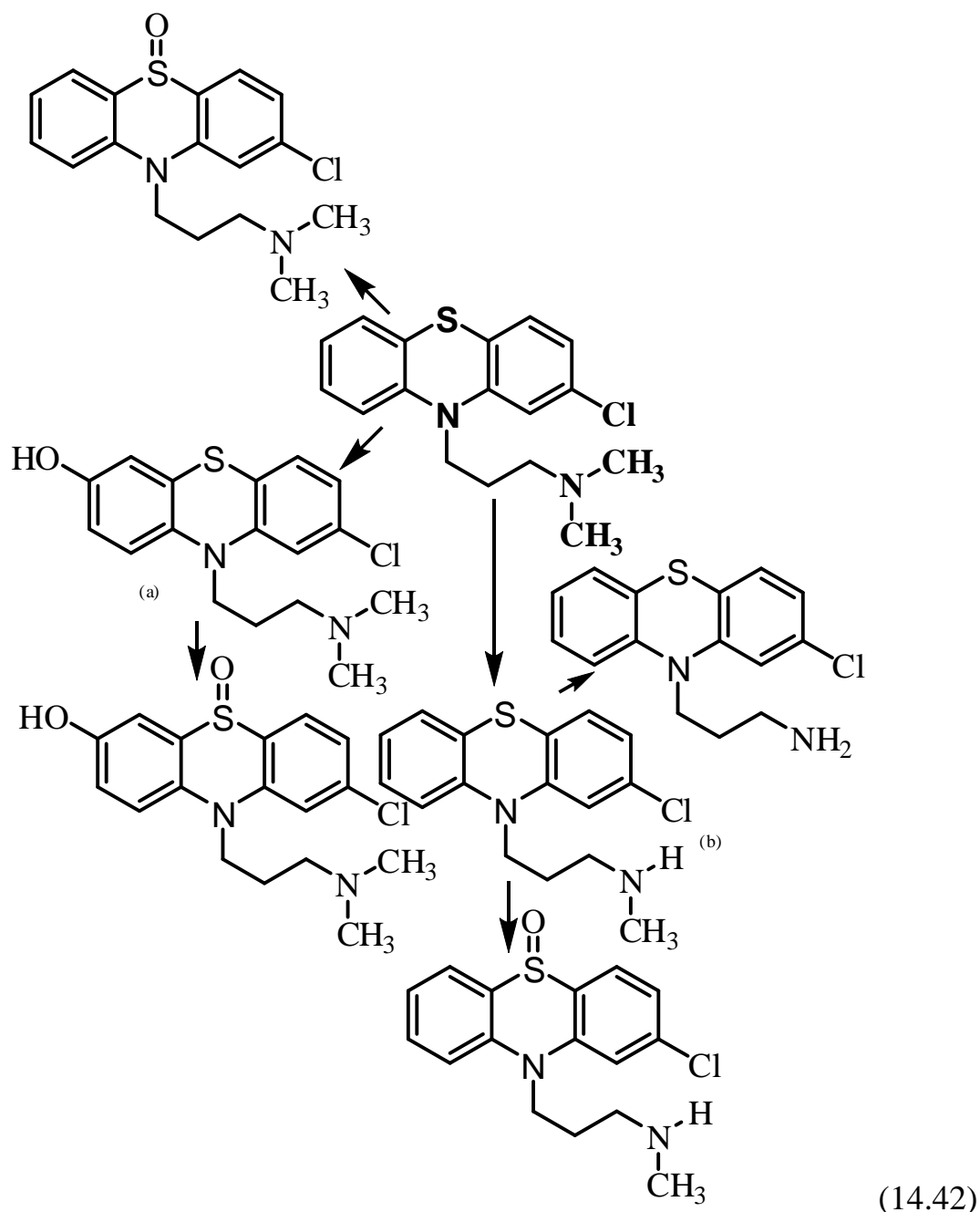
Клиника течения отравлений нейролептиками зависит от возраста, пола, дозы принятого лекарственного средства и не является характерной.

При отравлении производными фенотиазина развивается сухость слизистых оболочек, головокружение, нарушение ориентировки, тошнота, тахикардия. Снижается артериальное давление, возникает сердечная недостаточность. Иногда наблюдается возбуждение и судороги. Характерна лабильность температуры тела. Смерть наступает вследствие дыхательной и циркуляторной недостаточности.

При пероральном введении производные фенотиазина быстро всасываются из желудочно-кишечного тракта и их действие проявляется через 30–60 минут, а при парентеральном введении – через 15–20 минут. Максимум концентрации в крови наблюдается через 2–4 часа при пероральном введении и через 1–2 часа – при внутривенном. Производные фенотиазина всасываются преимущественно из кишечника. Гидрофобный характер фенотиазинов способствует взаимодействию их с белками (95–99% для аминазина). Высокое значение кажущегося объема распределения производных фенотиазина обуславливает их накопление в жировой ткани и в тканях паренхиматозных органов. В печени и почках накапливается значительно больше, чем в мозге. Производные фенотиазина легко проникают через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры.

Выведение производных фенотиазина осуществляется главным образом через почки в виде метаболитов, отчасти с калом; в неизменном виде выделяется только около 6% производных фенотиазина.

Аминазин метаболизируется с образованием более 100 метаболитов. Главными метаболитами являются 6-гидроксипроизводное аминазина (а), дезмонометиламиназин (b), их сульфоксиды и конъюгаты с глюкуроновой кислотой:



Основными путями метаболизма дипразина, левомепромазина и тиоридазина является ароматическое гидроксирование с образованием 3- и 6-гидроксипроизводных, N-, O-, S-деметилирование, образование сульфоксидов и конъюгатов с глюкуроновой кислотой.

Основные фармакокинетические параметры производных фенотиазина представлены в таблице 14.12

Таблица 14.12

**Основные фармакокинетические параметры
производных фенотиазина**

Соединение	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Аминазин	9,3	7-120	8	8,6	95-98

Дипразин	9,1	10-15	13	16	75-93
Левомепромазин	9,2	15-77	30	–	98
Тиоридазин	9,5	10-30	–	–	99

При отравлении производными фенотиазина больному необходимо придать горизонтальное положение, предохранить его от значительных температурных влияний. Яд удаляют промыванием желудка (с активированным углем) или вызыванием рвоты. Затем проводят симптоматическое лечение.

14.14.2. Изолирование и определение производных фенотиазина

Особенность изолирования производных фенотиазина заключается в том, что водой из биоматериала производные фенотиазина извлекаются незначительно (15% по методу Васильевой и около 2% по методу Крамаренко), что возможно связано с их высокой гидрофобностью и, как следствие, прочным связыванием с белками. Поэтому значительные количества производных фенотиазина можно извлечь этанолом или ацетонитрилом, которые разрушают связь с белком.

В связи с тем, что соли производных фенотиазина растворяются в хлороформе, но не растворяются в эфире, для очистки извлечения от липофильных примесей применяют эфир.

В основе современного метода изолирования фенотиазинов из биоматериала лежит модифицированный Е.М.Саломатиным метод Стаса – Отто. Выход анализируемых соединений составляет около 50%.

Производные фенотиазина изолируют из биоматериала (желудок, печень, почки) спиртом, подкисленным щавелевой кислотой. Эфиром экстрагируют примеси из кислой среды, водную фазу подщелачивают до $pH = 13$ и экстрагируют производные фенотиазина (эфиром). Вместо спирта можно использовать ацетонитрил, что позволяет ускорить в 5-6 раз изолирование.

Для обнаружения производных фенотиазина в моче и крови 2-5 мл их подщелачивают 50% NaOH до $pH = 13$ и смесь кипятят 10 минут. Полученный гидролизат охлаждают и экстрагируют *n*-гептаном, содержащим 3% изоамилового спирта. Гептановые извлечения объединяют и промывают водой, насыщенной гептаном, после чего исследуют.

В качестве предварительного теста при обнаружении фенотиазинов в моче используют реактив FPN (смесь 5% раствора $FeCl_3$, 20% раствора $HClO_4$ и 50% раствора HNO_3 в соотношении 5:45:50). При этом 1 мл мочи смешивают с 1 мл реактива и наблюдают красное или

красно-фиолетовое окрашивание (реакцию дают также салицилаты и желчные кислоты). Второй предварительной пробой на аминазин является реакция с реактивом, содержащем серную кислоту и хлорид железа (III): к 1 мл мочи прибавляют 1 мл реактива, состоящего из 80 мл 10% раствора серной кислоты и 20 мл 5% раствора хлорида железа (III). При наличии аминазина появляется розовая окраска.

Обнаружение производных фенотиазина.

Наиболее чувствительными осадительными реактивами для обнаружения производных фенотиазина являются реактивы Драгендорфа и фосфорномолибденовая кислота.

Методика выполнения реакции: 0,5 мл исследуемой органической фазы упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю общеалкалоидного реактива. При наличии производных фенотиазина образуются осадки характерной окраски и с характерной формой кристаллов.

Реакции окрашивания. В основе реакций окрашивания лежат такие процессы, как дегидрирование в присутствии кислот (концентрированная серная кислота), каталитическое окисление (смесь «хлорная кислота и нитрит натрия», реактив Фреде, реактив Манделина), конденсация с альдегидами в присутствии водоотнимающих средств (реактив Марки), окисление солями металлов с высшей степенью окисления ($FeCl_3$ и др.). Появляющаяся окраска в процессе реакции обусловлена промежуточными продуктами катион-радикалами. Окраска зависит от заместителя в положении 2. Например, аминазин и дипразин с окислителями дают малиновое окрашивание, левомепромазин – фиолетовое, а тиоридазин – голубое или зеленое.

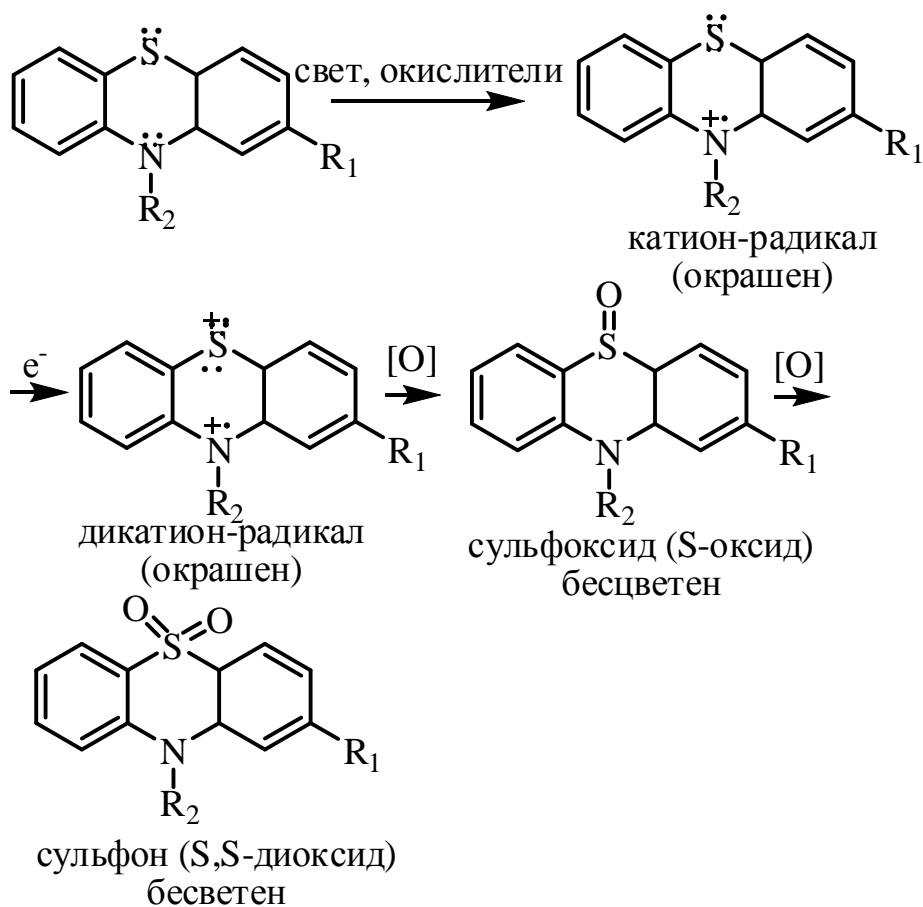
При проведении реакций окрашивания на производные фенотиазина к водным растворам прибавляют соответствующий реактив и нагревают. Если производные фенотиазина находятся в органическом растворителе, то каплю исследуемого раствора предварительно упаривают досуха, а сухой остаток растворяют в капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Основные аналитические эффекты реакций с производными фенотиазина представлены в таблице 14.13.

Таблица 14.13

Окраска продуктов реакций производных фенотиазина с различными реактивами

При взаимодействии с окислителями производные фенотиазина образуют ряд промежуточных окрашенных и бесцветных соединений.

Реактив	Аминазин	Дипразин	Левомепро- мазин	Трифтазин	Гиоридазин
H ₂ SO ₄ конц.	красная	красная	фиолетовая или розово- фиолетовая	голубая	голубая
HNO ₃ конц.	пурпурно- фиолето- вая	красная переходит в желтую	фиолетовая или розово- фиолетовая	голубая	голубая
Реактив Марки	пурпур- ная	пурпурная	фиолетовая или розово- фиолетовая	бирюзо- вая	голубая
Реактив Манде- лина	зеленая перехо- дит в пур- пурную	зеленая переходит в пурпур- ную	красно- пурпурная		голубая
2% рас- твор FeCl ₃	малино- вая	грязно- сиреневая	розово- фиолетовая	голубова- то-зеленая	голубова- то-зеленая
Реакция Витали- Морена	пурпур- но-фиоле- товая	пурпурно- фиолето- вая	красно- оранжевая	пурпурная	пурпурная



(14.43)

УФ-спектрометрия. В УФ-спектрах производных фенотиазина наблюдается две полосы: 250–260 нм и 300–315 нм. Если производные во втором положении не содержат заместителя или содержат метокси-группу (дипразин, левомепромазин) максимумы наблюдаются при 250–254 нм; при наличии атома хлора во втором положении (аминазин, этаперазин, френолон) – при 255–256 нм; если во втором положении имеется метилмеркаптогруппа (тиоридазин) максимум наблюдается при 263 нм.

УФ-спектры сульфоксидов, образующихся при окислении производных фенотиазина, имеют 4 полосы поглощения. Сульфоксиды получают окислением соответствующих фенотиозинов смесью H_2O_2 и CH_3COOH при 60 °С. Спектрометрия производных фенотиазина и их сульфоксидов в УФ-области позволяет идентифицировать их и дифференцировать от других групп токсикологически важных веществ. Например, для УФ-спектра сульфоксида аминазина характерны максимумы полос поглощения при 238–240, 273–274, 298–300 и 340–341 нм, а для сульфоксида дипразина – при 232–233, 267–268, 293 и 336–337 нм. Максимумы полос поглощения сульфоксидов производных фенотиазина зависят от природы заместителей во 2-м и 10-м положениях фенотиазинового ядра.

ИК-спектроскопия. В таблице 14.14 приведены основные характеристические частоты ИК-спектров производных фенотиазина.

Таблица 14.14

Основные характеристические частоты ИК-спектров производных фенотиазина (см⁻¹)

Аминазин	Дипразин	Левомепромазин	Тиоридазин
1561		1580	
1240	1259, 1287	1270	1248, 1281
1220	1229	1205	1234
1095		1030	
747	758	752	754

Тонкослойная хроматография. В качестве подвижных фаз для разделения и обнаружения производных фенотиазина применяются различные системы:

- 1) этилацетат-ацетон- 25% раствор аммиака (50:45:1),
- 2) этилацетат-метанол-25% раствор аммиака (17:12:1)
- 3) Бензол-диоксан-25% раствор аммиака (75:20:5)
- 4) Тoluол-ацетон-этанол- 25% раствор аммиака (45:47,5:7,5:2,5)
- 5) Метанол- *n*-бутанол (6:4)
- 6) Диоксан-хлороформ-ацетон-25% раствор аммиака (47,5:45:5:2,5) и другие.

Для проявления хроматограмм используют смесь 50% раствора серной кислоты и этанола (1:1) или реактив Марки.

Если ТСХ не позволяет идентифицировать производные фенотиазина, то используют ГЖХ.

Количественное определение.

Широкое применение ВЭЖХ при определении производных фенотиазина обусловлено возможностью УФ-детектирования (фенотиазины поглощают при 245-260 нм).

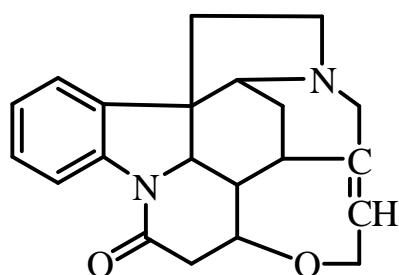
Для газохроматографического определения производных фенотиазина используются среднеполярные НЖФ OV-225 (содержит 25% метильных, фенильных, цианопропильных групп), стеклянные микроколонки при 200–250 °С, температура инжектора – 250–300 °С. Для регистрации наиболее подходящими являются селективные азотно-фосфорные и электронно-захватные детекторы. Внутренний стандарт – имизин. Методы ГЖХ и ВЭЖХ позволяют одновременно проводить обнаружение и количественное определение производных фенотиазина.

Основным недостатком предложенных методик спектрометрического определения (в УФ и видимой областях спектра) производных фенотиазина является возможность обугливания соэкстрактивных ве-

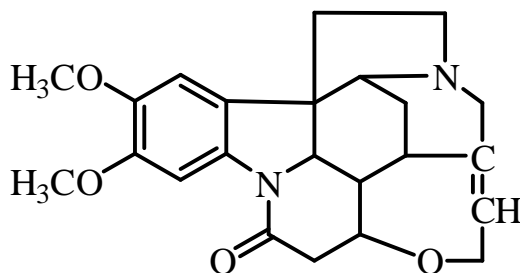
ществ. Поэтому требуется высокая степень очистки от соэкстрактивных веществ. Применение в качестве окислителя 1 М раствора мышьяковой кислоты в среде 18% раствора хлороводородной кислоты исключает возможность обугливания соэкстрактивных веществ в отличие от методов с применением концентрированной серной кислоты и реактива Манделина.

14.15. Алкалоиды, производные индола

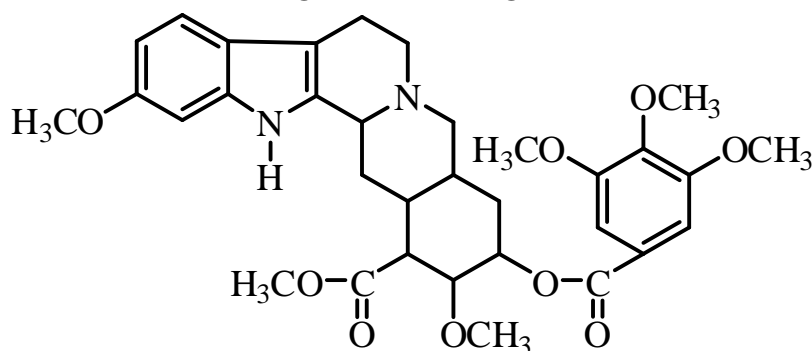
К алкалоидам, производным индола и имеющим токсикологическое значение, относятся стрихнин, бруцин, резерпин.



Стрихнин
Эстрихнин



Бруцин
2,3-
диметоксистрихнин



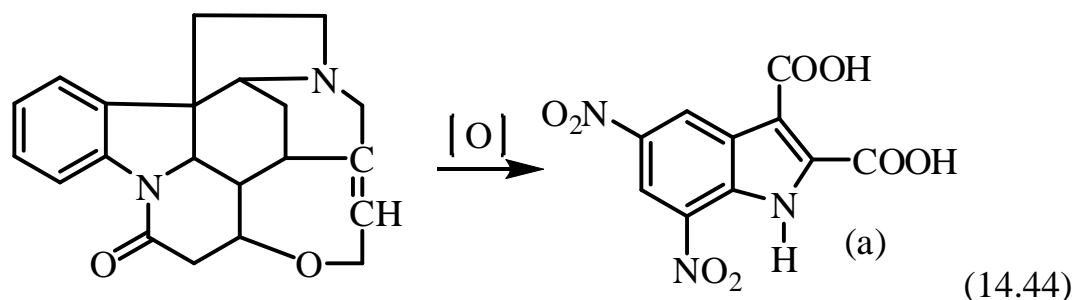
Резерпин
3,4,5-
триметокси-
бензоат метил-
резерпата,
раусерпин,
рауседил,
ортосерпин, ме-
татензин.

14.15.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных индола

В основе химической структуры алкалоидов этой группы лежит бициклическая система – индол. Важнейшее токсикологическое значение имеют алкалоиды стрихнин и бруцин. Впервые эти алкалоиды бы-

ли выделены из семян *Strychnos Nux vomica* (рвотные орешки) тропического растения рода чилибуха.

Наличие индольной группировки в молекуле стрихнина и бруцина было доказано при действии на них 20% раствора азотной кислоты. При этом происходило образование 5,7-динитроиндол-2,3-дикарбоновой кислоты (а), которая имеет в своей структуре цикл индола.



Основание стрихнина и бруцина растворимо в хлороформе и этаноле, мало растворяется в эфире и воде. Соли стрихнина представляют собой белые кристаллические порошки или прозрачные кристаллы, растворимые в воде и этаноле, мало растворяется в эфире и хлороформе.

Резерпин относится к алкалоидам, которые содержатся в различных видах раувольфии. В корнях раувольфии змеиной содержится около 0,11% резерпина. Резерпин представляет собой белый или желтоватый порошок, растворимый в хлороформе, мало в этаноле, практически нерастворимый в воде и диэтиловом эфире.

Стрихнин возбуждает центральную нервную систему и повышает рефлекторную возбудимость. Под влиянием стрихнина рефлекторные реакции становятся более генерализованными, при больших дозах стрихнина различные раздражители вызывают появление сильных болезненных тетанических судорог.

В терапевтических дозах стрихнин оказывает стимулирующее действие на органы чувств (обостряет зрение, вкус, слух, тактильное чувство), возбуждает сосудодвигательный и дыхательный центры, тонизирует скелетную мускулатуру, а также мышцу сердца, стимулирует процессы обмена, повышает также чувствительность сетчатки глаза.

Действие стрихнина связано с облегчением проведения возбуждения в межнейронных синапсах спинного мозга. Он действует преимущественно в области вставочных нейронов. По современным представлениям стрихнин блокирует действие химических веществ, играющих роль тормозящих факторов в передаче возбуждения в постсинаптических нервных окончаниях в спинном мозге. Блокируя торможение, стрихнин оказывает таким образом «возбуждающий» эффект.

Применяют стрихнин как тонизирующее средство при общем понижении процессов обмена, быстрой утомляемости, гипотонической болезни, ослаблении сердечной деятельности на почве интоксикаций и инфекций, при парезах и параличах (в частности, дифтерийного происхождения у детей), при атонии желудка и т. п.

Бруцин в медицине не применяется, но он входит в состав настойки чилибухи, которая применяется в качестве лекарственного средства. Поэтому при отравлении этой настойкой проводят судебно-химическое исследование не только на стрихнин, но и на бруцин.

При отравлении стрихнином и бруцином наблюдаются потягивания, ригидность, подергивания основных групп мышц, вытягиваются конечности. Судороги повторяются при малейшем сенсорном раздражении. Особую опасность представляет стрихнин для лиц, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, заболеваниями печени, почек. Летальный исход наступает в результате удушья, истощения от судорог или прекращения сердечно-сосудистой деятельности.

Резерпин оказывает успокаивающее влияние на центральную нервную систему и гипотензивное действие. Он углубляет и усиливает физиологический сон, потенцирует действие барбитуратов и других снотворных средств. Резерпин обладает также симпатолитическим, нейролептическим и антипсихотическим действием.

При отравлениях резерпином появляется брадикардия, снижается артериальное давление, развивается отек слизистых оболочек носа и глаз, слюнотечение. Дыхание замедленное, поверхностное, возможен бронхоспазм.

Всасывание лекарственных веществ происходит через желудочно-кишечный тракт. Действие резерпина развивается только после латентного периода (2–3 суток).

Основные фармакокинетические параметры представлены в таблице 14.15.

Таблица 14.15

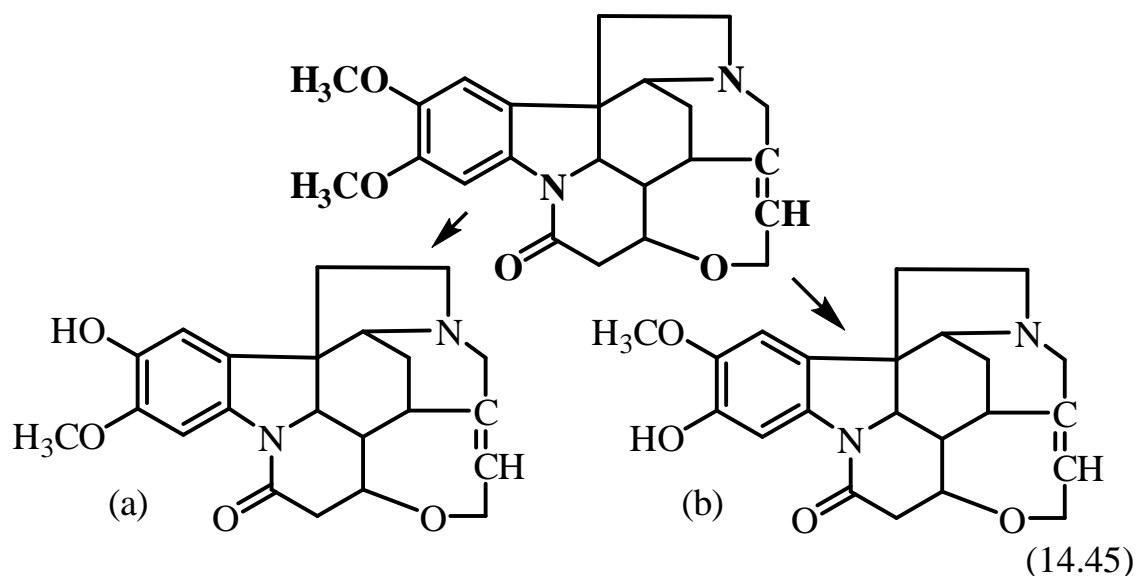
**Основные фармакокинетические параметры
производных индола**

Вещество	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Стрихнин	2,3; 8,0	-	-	-	-
Бруцин	2,3; 8,3	-	-	-	-
Резерпин	6,6	260	-	-	40

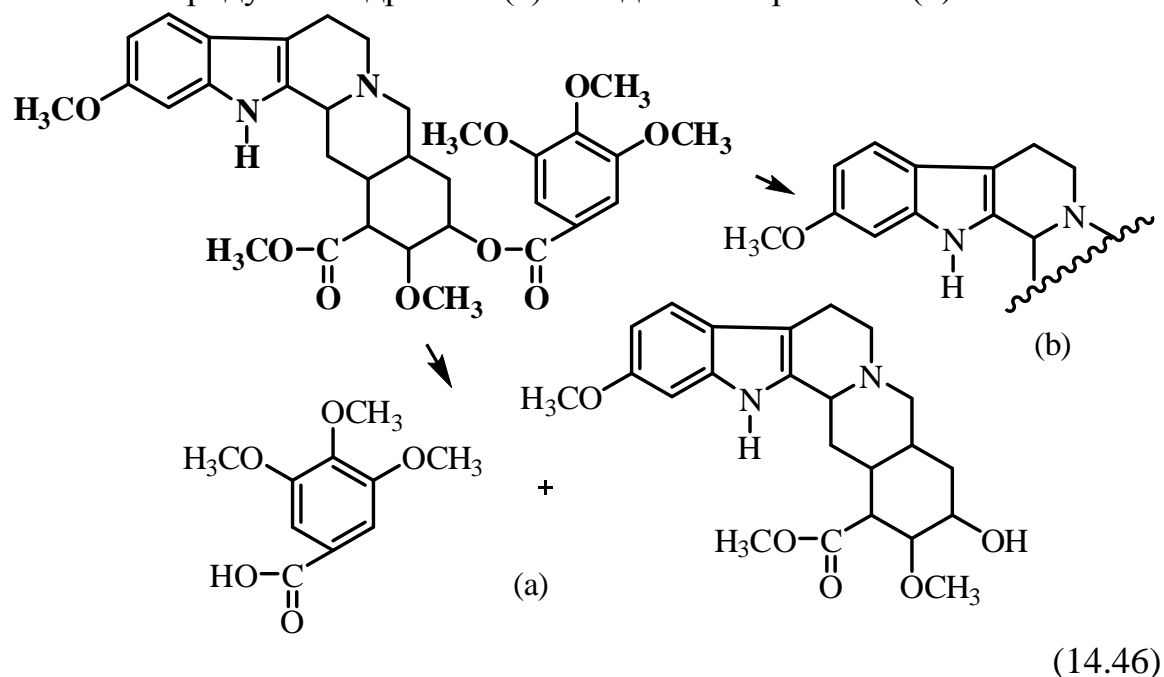
Выведение производных индола из организма осуществляется с мочой в неизменном виде и в виде метаболитов.

При метаболизме стрихнина образуется 2-гидроксистрихнин, который затем взаимодействует с глюкуроновой кислотой с образованием глюкуронида 2-гидроксистрихнина.

При метаболизме бруцина образуются метокси-2-окси-3-стрихнин (а) и окси-2-метокси-3-стрихнин (б), которые взаимодействуют с глюкуроновой кислотой и выводятся с мочой в виде конъюгатов.



Резерпин метаболизируется медленно, поэтому при частом приеме он может кумулироваться в организме. Основными метаболитами являются продукты гидролиза (а) и O-деметиляции (б).



После приема токсических доз производных индола проводят промывание желудка, (при отравлении стрихнином для избежания су-

дорог промывание проводят под наркозом). Для удаления яда вскоре после его приема дают выпить подсоленную воду или раствор перманганата калия и вызывают рвоту. В качестве слабительного назначают сульфат натрия. Далее проводят симптоматическое лечение.

При тяжелых отравлениях стрихнином применяют наркоз, миорелаксанты. Проводят искусственную вентиляцию легких. При отравлениях резерпином и сильном снижении артериального давления проводят инфузию с норадреналином.

14.15.2. Изолирование и определение производных индола

Изолирование проводят методом Стаса – Отто, Крамаренко, Швайковой – Васильевой в зависимости от вида анализа (общий или направленный). Максимальные количества стрихнина экстрагируются хлороформом при значении рН 9,0–12,0; бруцина – рН 7,5–12,0, резерпина – рН 9,0–11,0.

Обнаружение производных индола

Реакция производных индола с реактивом Драгендорфа: 0,5 мл исследуемой органической фазы упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю реактива Драгендорфа. При наличии стрихнина (бруцина, резерпина) образуются осадки характерной окраски и с характерной формой кристаллов.

Реакция стрихнина с дихроматом калия и серной кислотой: в фарфоровую чашку вносят несколько капель исследуемого хлороформного экстракта и упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют смесь концентрированной серной кислоты и воды (5:1), перемешивают и прибавляют кристаллик дихромата калия, который передвигают в растворе стеклянной палочкой. При наличии стрихнина появляется синяя окраска в виде струек, которая затем переходит в фиолетовую, красную и исчезает. Этой реакции мешают морфин, бруцин, хинин и др. Для обнаружения стрихнина в присутствии бруцина последний разрушают серной и азотной кислотами, а затем жидкость подщелачивают раствором гидроксида натрия и экстрагируют эфиром. Экстракт упаривают и в полученном остатке определяют стрихнин по реакции с дихроматом калия с серной кислотой. Чувствительность реакции – 1 мкг стрихнина.

Реакция Витали–Морена (стрихнин): в фарфоровую чашку вносят 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта и при комнатной температуре упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и на кипящей водяной бане упаривают досуха. При этом сухой остаток приобретает желтую окраску. К сухому остатку с одной стороны прибавляют каплю ацетона, с другой

стороны – каплю 10% этанольного раствора гидроксида калия. При соприкосновении указанных растворов с сухим остатком появляется быстро исчезающая фиолетовая окраска.

Микрористаллоскопические реакции стрихнина с пикриновой и платино-хлороводородной кислотой позволяют обнаружить стрихнин с чувствительностью 0,17 и 0,5 мкг соответственно.

Реакция бруцина с азотной кислотой и хлоридом олова (II): к остатку, полученному после выпаривания исследуемого раствора, прибавляют несколько капель концентрированной азотной кислоты. При наличии бруцина появляется кроваво-красная окраска, переходящая в желтую. Если к раствору, имеющему желтую окраску, прибавить несколько капель 5% раствора хлорида олова (II), то появляется фиолетовая окраска. Большой избыток азотной кислоты приводит к ослаблению фиолетовой окраски. Чувствительность реакции – 14 мкг бруцина. Стрихнин не мешает этой реакции.

Реакция бруцина с реактивом Манделина, Фреде и Эрдмана: на предметное стекло помещают исследуемое вещество и соответствующий реактив. Через 1–2 минуты наблюдают красную окраску, переходящую в желтую. Для продукта реакции стрихнина с реактивом Манделина характерна фиолетовая окраска, переходящая в красную. С реактивами Фреде, Эрдмана и Марки стрихнин не дает окрашиваний. С реактивом Марки не дает окрашивания и бруцин.

Чувствительность микрористаллоскопической реакции бруцина с дихроматом аммония составляет 1,5 мкг.

Реакция резерпина с ванилином и хлороводородной кислотой: к анализируемому раствору прибавляют 2–3 капли 2% раствора ванилина в концентрированной серной кислоте. При наличии резерпина появляется фиолетовая окраска. Чувствительность реакции – 0,6 мкг.

Флуоресценция резерпина: несколько капель хлороформного экстракта исследуемого вещества вносят в фарфоровую чашку и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 2–3 капли 1% раствора уксусной кислоты, а затем раствор облучают УФ-светом. Появление желто-зеленой флуоресценции указывает на наличие резерпина в исследуемом растворе. Чувствительность реакции – 0,1 мкг резерпина.

Реакция резерпина с роданидом аммония: на предметное стекло наносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в одной капле 1% раствора уксусной кислоты и к полученному раствору прибавляют каплю 5% раствора роданида аммония. В присутствии резерпина образуются сростки кристаллов в виде дендритов. Чувствительность реакции – 0,1 мкг резерпина.

Реакция резерпина с раствором хлорида ртути (II) в растворе хлорида натрия: несколько капель исследуемого раствора наносят на предметное стекло и прибавляют каплю реактива (раствор, содержащий 1 г хлорида натрия и 0,5 г хлорида ртути (II) в 10 мл воды). В присутствии резерпина через несколько минут появляются кристаллы, имеющие форму сферолитов, состоящих из тонких пластинок. Чувствительность реакции – 0,1 мкг резерпина.

Фармакологическая проба (характерная поза лягушки, см. «Приложения»).

УФ- и ИК-спектры. В таблице 14.16 приведены спектральные характеристики производных индола.

Таблица 14.16

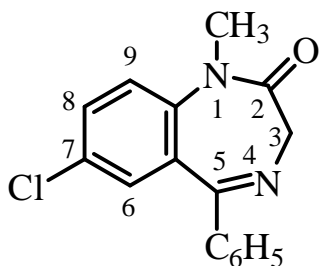
Спектральные характеристики производных индола

Вещество	УФ-область, нм	ИК-область, см ⁻¹
Бруцин	261 и 301 (этанол) 265 и 300 (0,05 М Н ₂ SO ₄)	1190, 1285, 1400, 1450, 1500, 1649
Резерпин	267 и 294 (этанол)	1120, 1220, 1330
Стрихнин	255 (этанол, Н ₂ SO ₄)	764, 1392, 1480, 1664

Тонкослойная хроматография. Неподвижная фаза – силикагель, подвижные фазы: хлороформ-диэтиламин (9:1), хлороформ-ацетон-25% раствор аммиака (30:30:2)»; реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье.

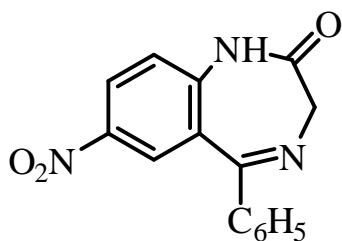
Количественное определение: ВЭЖХ, УФ-спектрометрия.

14.16. Лекарственные вещества группы бензодиазепина



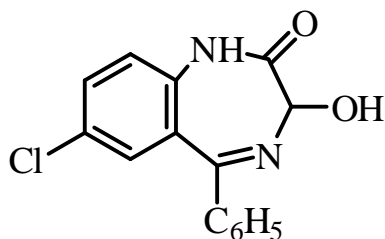
Диазепам

Сибазон, реланиум, антекс, апозепам, диапам, римапам, валиум; 7-хлор-1,3-дигидро-1-метил-5-фенил-2H-1,4-бензодиазепин-2-он



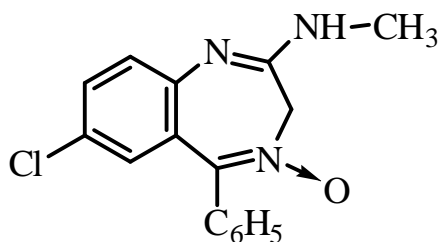
Нитразепам

Эуноктин, алодорм, дормалон, радедорм, сонербон, унисомния; 1,3-дигидро-7-нитро-5-фенил-2H-1,4-бензодиазепин-2-он



Оксазепам

Нозепам, алепам, анксиолит, бензотран, мурелакс, оксабенз, серенал, ускан; 7-хлор-1,3-дигидро-3-гидрокси-5-фенил-2*H*-1,4-бензодиазепин-2-он



Хлордiazепоксид

Хлозепид, элениум, метаминодиазепоксид, либриум, силлибрин, менриум; 7-хлор-*N*-метил-5-фенил-3*H*-1,4-бензодиазепин-2-амин-4-оксид

14.16.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных 1,4-бензодиазепина

Высокая фармакологическая активность, широкий спектр терапевтического действия и малая токсичность позволяет производным бензодиазепина занимать ведущее место среди транквилизаторов. Производные бензодиазепина используются не только как транквилизаторы, но и как снотворные (нитразепам) и противосудорожные средства (мидазолам). В настоящее время применяется около 100 лекарственных средств группы бензодиазепинов. Перечень бензодиазепинов постоянно расширяется. Наряду с применением производных 1,4-бензодиазепина в клиническую практику внедряются новые производные 1,5- и 2,3-бензодиазепина.

Большинство производных 1,4-бензодиазепинов представляют собой бесцветные (нитразепам – желто-зеленый), хорошо кристаллизующиеся вещества, практически нерастворимые в воде (хлозепид хорошо растворяется в воде). Соли производных 1,4-бензодиазепина хорошо растворимы в воде.

Производные 1,4-бензодиазепина поглощают свет в УФ-области, причем форма спектров поглощения зависит от значения рН водной фазы. В спектрах поглощения производных 1,4-бензодиазепина выделяют три характерные полосы с максимумами при 200–215, 220–240 и 290–330 нм. Две первые полосы соответствуют возбуждению ароматических хромофоров, третья полоса соответствует поглощению азометиновой связи, сопряженной с бензогруппой.

Поглощение производных 1,4-бензодиазепинов в УФ-области изменяется в зависимости от величины рН. В кислой среде происходит протонирование атома азота 1 (хлозепид) и 4 (дiazепам, нитразепам,

оксазепам), а в щелочной среде изменяется хромоформная система, в результате увеличения сопряжения за счет лактим-лактамной таутомерии азометиновой связи 1,2 (нитразепам, оксазепам).

В таблице 14.17 представлены значения максимумов поглощения производных 1,4-бензодиазепаина.

Таблица 14.17

Максимумы спектров поглощения производных 1,4-бензодиазепинов в УФ-области, нм

Соединение	Этанол	0,1 М HCl	0,1 М NaOH
Диазепам	230, 255	241, 285, 360	229
Нитразепам	220, 258, 312	280	226, 258, 357
Оксазепам	229, 324	234, 281	234, 340
Хлозепид	245, 267	245, 310	243, 261

В ИК-спектрах производных 1,4-бензодиазепаина наблюдается много полос поглощения. Достоверное отнесение полос можно сделать только для некоторых характерных полос (таблица 14.18).

Таблица 14.18

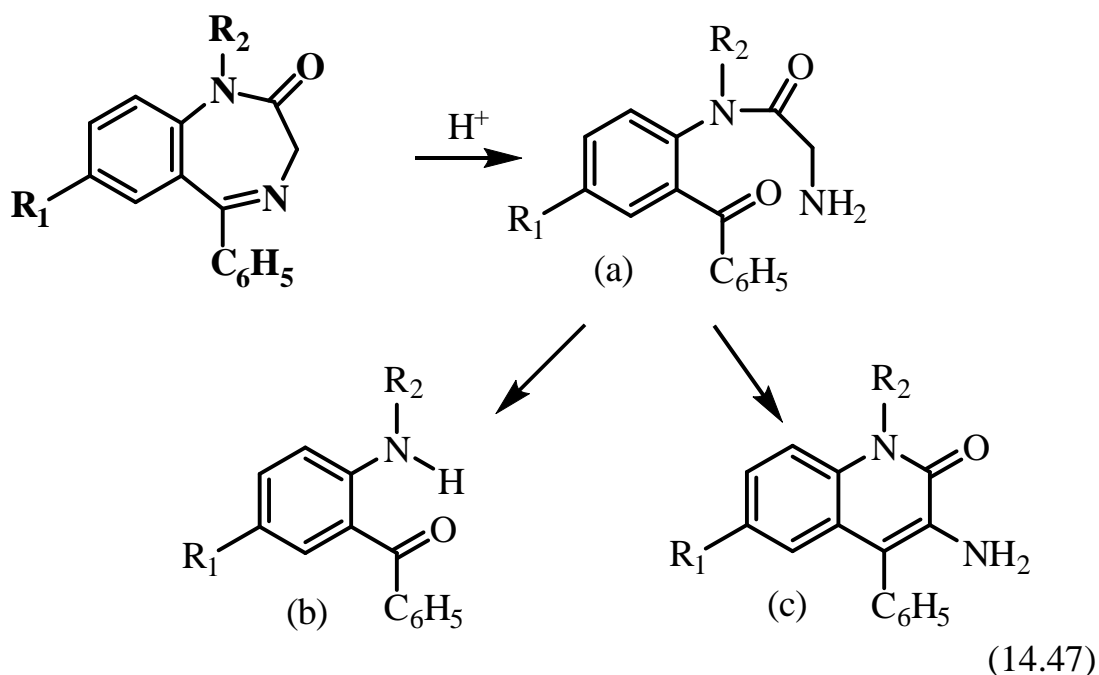
Основные характеристические частоты ИК-спектров производных 1,4-бензодиазепаина (см⁻¹)

Хлозепид	Диазепам	Нитразепам	Оксазепам
1700		1710	1706
1625	1680	1685	1687
1590			1578
1260		1255	
850	840		830
760	740	748	
690	705		693

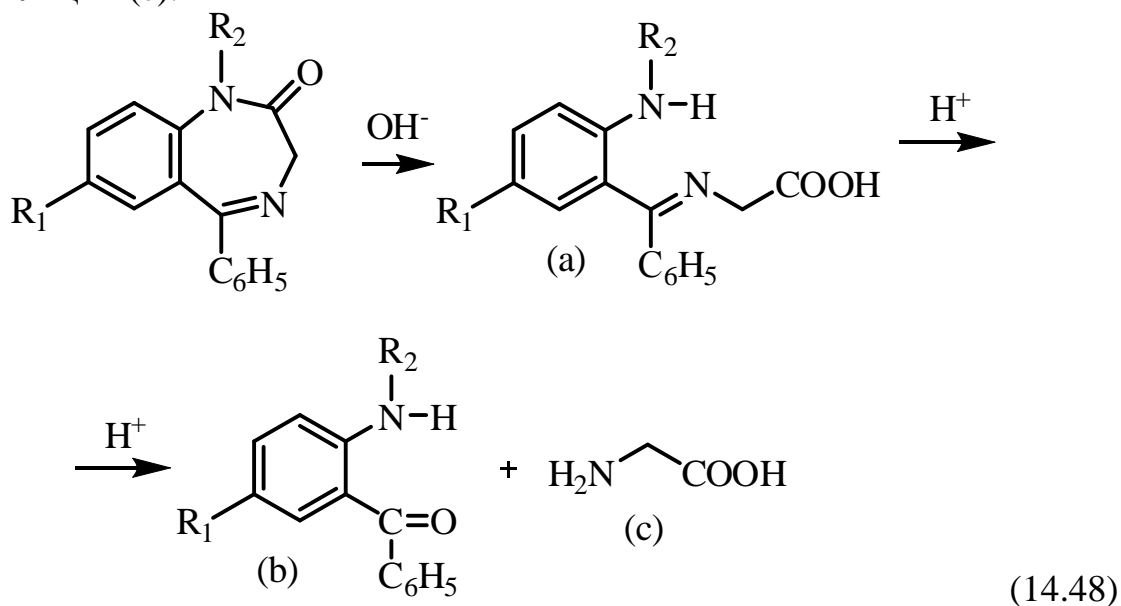
По кислотно-основным свойствам производные 1,4-бензодиазепаина представляют собой слабые основания. Основность данных соединений зависит от характера заместителей. Введение нитро-, карбонильных, гидроксид- и карбоксильных групп в молекулу снижает основной характер этих соединений. Нитразепам и оксазепам проявляют кислотные свойства за счет амидной группы, т.е. являются амфолитами. При сравнении констант ионизации 1,2-дигидропроизводных 1,4-бензодиазепаина (нитразепам и оксазепам) видно, что электронодонорные заместители увеличивают плотность электронов у атома азота 4 и повышают основность, а электроноакцепторные заместители снижают основность. Снижение основности со-

единений при введении заместителей в положение 3 и 1 связано за счет стерического экранирования атома азота 4, что затрудняет его протонирование. Кислотность амидной группы понижают электронодонорные заместители и повышают электроноакцепторные заместители.

Производные 1,4-бензодиазепина подвергаются гидролизу. В кислой среде происходит разрыв семичленного цикла с образованием промежуточного соединения (а), затем образуются аминобензофеноны (b) и аминохинолоны (c).



В щелочной среде образуется промежуточное соединение (а), которое при взаимодействии с кислотами образует аминобензофеноны (b) и глицин (c).



Устойчивость растворов производных 1,4-бензодиазепаина зависит от растворителя и химической природы соединения. Более устойчивы спиртовые растворы по сравнению с водными. В кислых растворах производные 1,4-бензодиазепаина со временем гидролизуются (особенно оксазепам и диазепам) с образованием продуктов, имеющих желтую окраску. Сохраняемость производных 1,4-бензодиазепаина в биологических объектах различается в зависимости от структуры соединения. Диазепам в плазме устойчив в течение трех недель при комнатной температуре, а при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 года. При длительном хранении 1,4-бензодиазепинов при комнатной температуре они разлагаются. Например, нитразепам восстанавливается до 7-аминопроизводного и гидролизуется до 2-амино-5-нитробензофенона.

Хлордiazепоксид оказывает успокаивающее действие на центральную нервную систему, вызывает мышечную релаксацию, обладает противосудорожной активностью, потенцирует действие снотворных и анальгетиков, оказывает умеренный снотворный эффект (обычно проявляющийся при непрерывном применении только в первые 3–5 дней).

Характерной особенностью хлордiazепоксида является способность подавлять чувство страха, тревоги, напряжения при невротических состояниях. Антипсихотического действия не оказывает. В больших дозах может уменьшать психомоторное возбуждение.

Применяют хлордiazепоксид при невротических состояниях, сопровождающихся тревогой, возбуждением, напряженностью, повышенной раздражительностью, бессонницей. Может применяться при органических неврозах (функциональные неврозы сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта), мигрени, при климактерических расстройствах и др. В анестезиологии может применяться для предоперационной подготовки больных и в послеоперационном периоде. В связи со способностью понижать мышечный тонус применяют также при спастических состояниях, связанных с поражениями головного и спинного мозга.

Диазепам по фармакологическому действию близок к хлордiazепоксиду, но обладает более выраженным транквилизирующим действием и эффективен в меньших дозах. Применяется в основном при лечении невротических, неврозоподобных и психопатоподобных состояний.

Оксазепам по строению и фармакологическим свойствам сходен с хлордiazепоксидом и диазепамом, однако по сравнению с диазепамом оказывает менее резкое действие; вместе с тем он несколько менее токсичен, оказывает менее выраженный миорелаксантный эффект, обладает слабыми противосудорожными свойствами. В некоторых случаях он лучше переносится, чем диазепам и хлордiazепоксид.

Характерной особенностью нитразепама является более выраженное по сравнению с остальными производными 1,4-бензодиазепина снотворное действие. Поэтому он относится к группе снотворных средств.

По продолжительности действия различают производные бензодиазепина длительного, среднего и короткого действия. Например, к первой группе ($T_{1/2}$ более 24 часа) относятся диазепам, клоназепам, нитразепам, феназепам и др.), ко второй ($T_{1/2}$ около 10–24 часа) – алпразолам, лоразепам, оксазепам и др., к третьей ($T_{1/2}$ менее 10 часов) – мидазолам, триазолам. Однако следует иметь в виду, что продолжительность действия бензодиазепинов зависит как от $T_{1/2}$ принятого лекарственного средства, так и от $T_{1/2}$ образующихся фармакологически активных метаболитов. Например, $T_{1/2}$ медазепама составляет 1–2 часа, но при метаболизме медазепама образуется фармакологически активный нордазепам и поэтому медазепам относят к бензодиазепинам длительного действия.

Острые отравления производными бензодиазепина сопровождаются тахикардией, снижением артериального давления, гипотонией мышц. Смерть может наступить из-за угнетения дыхательного центра (редко).

Всасывание производных бензодиазепина происходит хорошо и относительно быстро через желудочно-кишечный тракт (максимальная концентрация в крови наступает через 1–2 часа после приема). Поступая в кровь, производные бензодиазепина примерно на 90% связываются с белками плазмы.

Распределение производных 1,4-бензодиазепина по органам происходит в три стадии: накопление производных в паренхиматозных органах и падение концентрации в крови; накопление во всех органах и тканях; накопление в органах выделения (печени и почках), третья стадия – самая продолжительная во времени.

Основные фармакокинетические параметры производных 1,4-бензодиазепина представлены в таблице 14.19

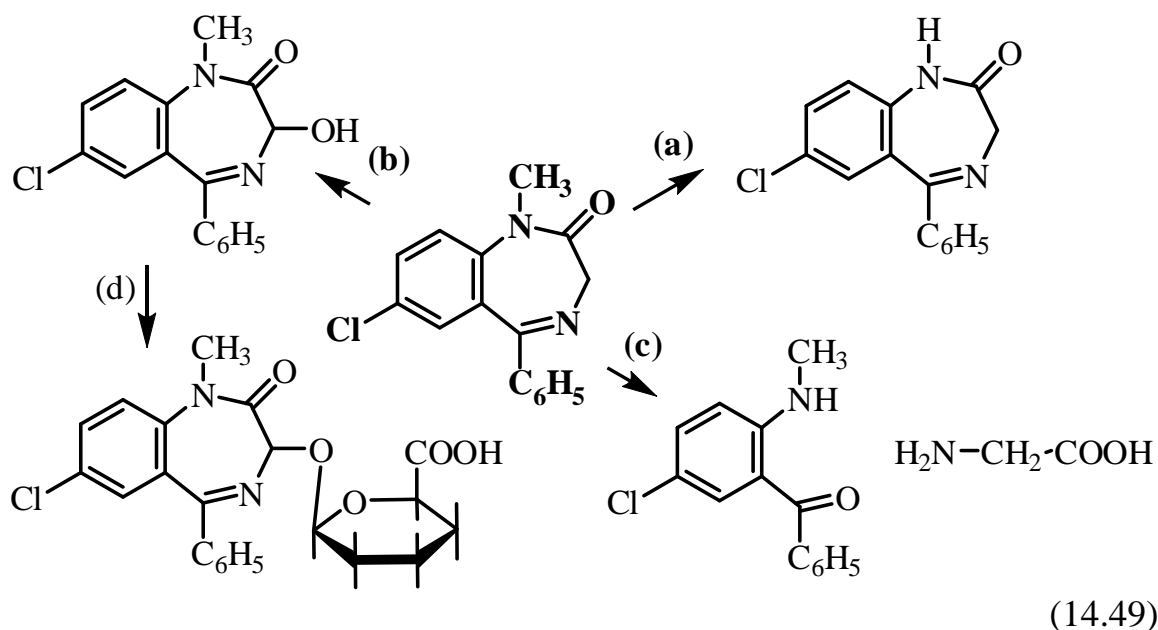
Таблица 14.19

**Основные фармакокинетические параметры
производных 1,4-бензодиазепина**

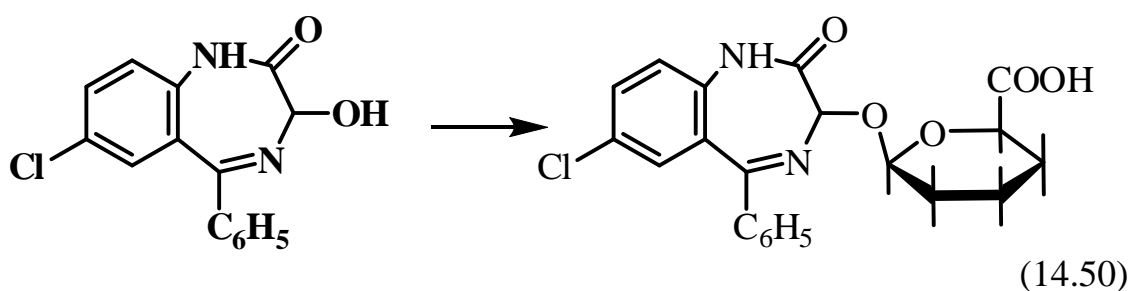
Соединение	pK_{BH}^+	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Диазепам	3,3	20-40	0,5-2,5	0,3-0,5	98-99
Нитразепам	3,2; 10,8	18-38	2-3	1	85-88
Оксазепам	1,7; 11,6	4-15	0,5-2,0	1-2	95
Хлозепид	4,8	5-30	0,3-0,6	0,5	96

Выведение производных 1,4-бензодиазепина происходит в неизменном виде и в виде метаболитов преимущественно почками. Ос-

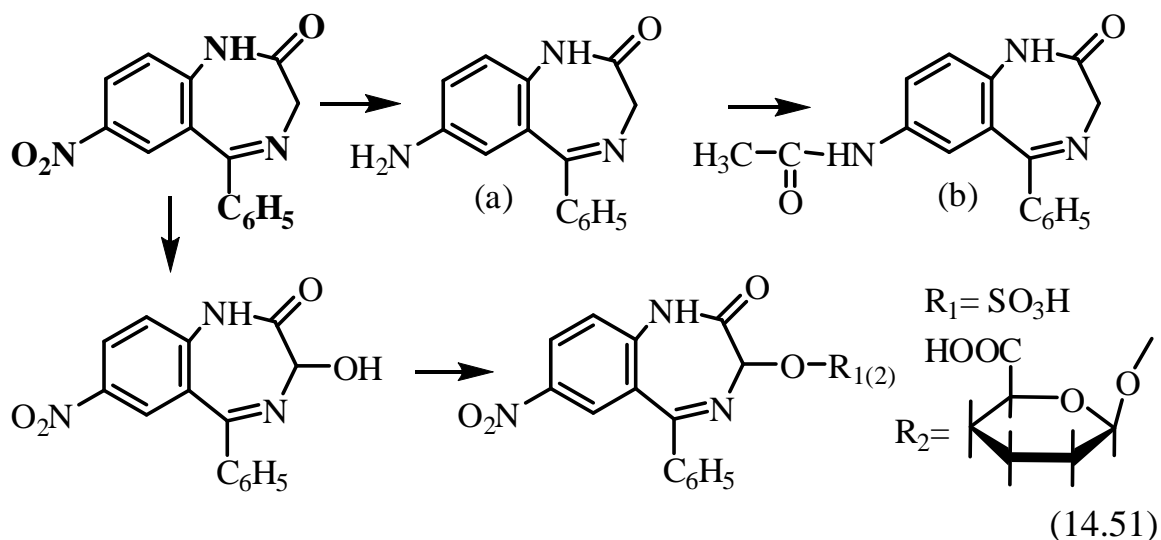
новные пути метаболизма диазепема – N-деметилирование (а), гидроксилирование (b), гидролиз (c) и глюкуронизация (d).



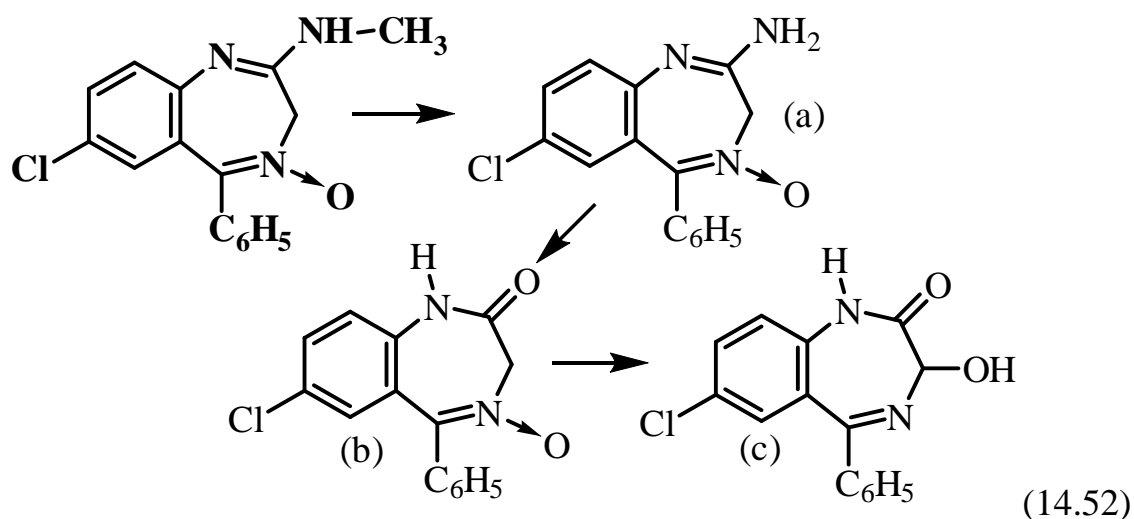
Основной метаболит оксазепема – O-глюкуронид.



Для нитразепема характерны восстановление (а), ацетилирование (b), окисление (c), конъюгация с глюкуроновой или серной кислотами (d).



Основные метаболиты хлорзепада образуются в результате деметилирования (а), дезаминирования (b) и реакции окисления (с).



Особенно быстро метаболизируют диазепам, нитразепам, медленно – феназепам. Свет активирует процессы разложения. Метаболиты различаются по активности. Фармакологически активны метаболиты, образующиеся при окислении и восстановлении. Глюкурониды и продукты гидролиза не проявляют фармакологической активности.

После приема внутрь токсической дозы производных 1,4-бензодиазепина промывают желудок, затем назначают раствор сульфата натрия с активированным углем. Далее проводится симптоматическое лечение: при дыхательной недостаточности необходимо дыхание кислородом.

14.16.2. Изолирование и определение производных 1,4-бензодиазепина

Основными объектами исследования на производные 1,4-бензодиазепина являются лекарственные средства, биожидкости (кровь и моча), секционный материал (печень, почки, ЖКТ). В моче и секционном материале содержатся как основное соединение, так и метаболиты. Кровь содержит в основном неизмененное соединение.

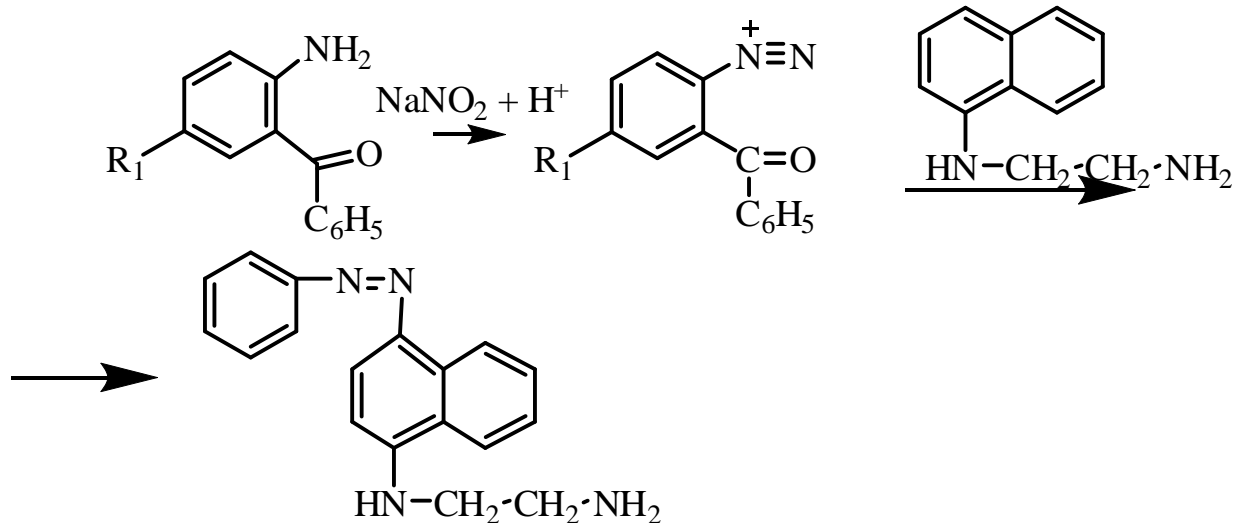
Изолирование производных 1,4-бензодиазепина из секционного материала проводят подкисленным спиртом или подкисленной водой, а затем экстрагируют хлороформом при $\text{pH} = 2$ и $\text{pH} = 10$.

Химико-токсикологический анализ на производные 1,4-бензодиазепина проводится по двум направлениям: а) по продуктам гидролиза (2-аминобензофенонам); б) по нативным соединениям совместно с метаболитами. Исследования производных 1,4-бензодиазепина по продуктам гидролиза позволяет суммарно определить нативные соединения и метаболиты. Такое исследование имеет отрицательное судебно-химическое значение. При получении положительного результата продолжают исследования по второму направлению (определение нативного соединения и метаболитов), что позволяет уточнить природу токсиканта.

Основными этапами исследования по продуктам гидролиза 1,4-бензодиазепинов являются:

- 1) изолирование полярными растворителями
- 2) гидролиз производных 1,4-бензодиазепина да 2-аминобензофенонов ($120\text{--}140\text{ }^\circ\text{C}$, 30–60 минут в зависимости от структуры бензодиазепинов, 6 М HCl)
- 3) жидкость-жидкостная (хлороформ или гептан, pH 6–8) или твердофазная экстракция
- 4) ТСХ (подвижная фаза – бензол)
- 5) Подтверждающее исследование (ГХ, ВЭЖХ, УФ).

Исследование производных 1,4-бензодиазепинов по 2-аминобензофенонам проводят по собственной окраске бензофенонов, по образованию азокрасителя с солью диазония аминобензофенонов и щелочным раствором β -нафтола или *N*-2-нафтилэтилендиамина (реакция Браттона–Маршалла), а также по характерной флуоресценции в УФ-свете (254–360 нм).



азокраситель (розово-сиреневый) (14.53)

Реакция образования азокрасителей характерна для бензофенонов, содержащих первичную аминогруппу. Такие бензофеноны образуются при гидролизе нитразепама, оксазепама, хлордiazепоксиды и др. Некоторые бензодиазепины (дiazепам, камазепам, кетазолам, медазепам, ниметазепам, темазепам и др.) при гидролизе образуют бензофеноны, не содержащие первичную аминогруппу, и соответственно такие бензофеноны не образуют азокрасители. Известны бензодиазепины (алпразолам, бротизолам, лопразолам, триазолам, эстазолам), которые не образуют бензофеноны. Поэтому реакция образования азокрасителей для идентификации бензофенонов имеет ограниченное применение.

Окраска зон, в которых находятся бензофеноны, зависит от химической природы исследуемых производных 1,4-бензодиазепина (таблица 14.20)

Таблица 14.20

Окраска зон, содержащих бензофеноны

Производные 1,4-бензодиазепина	Бензофеноны	Окраска зоны
Хлордiazепоксид	2-амино-5-хлорбензофенон	Фиолетовая
Клоназепам	2-амино-5-нитро-2'-хлорбензофенон	Красно-фиолетовая
Хлоразепам	2-амино-5-хлорбензофенон	Фиолетовая
Дiazепам	2-метиламино-5-хлорбензофенон	Желтоватая

Нитразепам	2-амино-5-нитробензофенон	Красно-фиолетовая
Оксазепам	2-амино-5-хлоробензофенон	Фиолетовая
Пиназепам	2-(2-пропинамино)-5-хлоробензофенон	Желтая

Исследования по нативному соединению и основным метаболитам состоит из следующих этапов:

- 1) изолирование полярными растворителями;
- 2) концентрирование (ЖЖЭ или ТФЭ);
- 3) ТСХ;
- 4) Подтверждающее исследование (ГХ, ВЭЖХ, УФ).

Для хроматографического разделения и идентификации производных 1,4-бензодиазепина методом ТСХ в качестве подвижной фазы используют системы:

- 1) хлороформ-ацетон (9:1);
- 2) хлороформ-метанол (9:1);
- 3) этилацетат-метанол- 25% раствор аммиака (85:10:5);
- 4) хлороформ-пропанол-ацетон (45:2:5) и др.

Пятна на пластинах силикагеля или «силуфол» проявляют с помощью реактивов Драгендорфа, Марки, Фреде, FPN, а также по образованию азокрасителя после гидролиза соединений на хроматограмме. При взаимодействии производных 1,4-бензодиазепина с реактивами Марки, Фреде или FPN образуются продукты, имеющие желтую окраску. Возможна и детекция производных 1,4-бензодиазепина на хроматографических пластинках, содержащих флуоресцентные добавки. Чувствительность обнаружения – 1–5 мкг производных 1,4-бензодиазепина.

Применение инструментальных методов (ГХ, ВЭЖХ, УФ-спектрометрия) позволяет провести внутригрупповую идентификацию производных 1,4-бензодиазепина и подтвердить результаты анализа по бензофенонам.

При ВЭЖХ-определении производных 1,4-бензодиазепина в моче по нативным соединениям проводят ЖЖЭ при pH 5–8. При анализе по соответствующим бензофенонам проводят предварительную (перед экстракцией) обработку биологического объекта кислотой при нагревании с целью перевода нативных соединений и их метаболитов в аминобензофеноны. Полученный сухой экстракт после пробоподготовки растворяют в 100 мкл подвижной фазы и вводят в хроматографическую колонку.

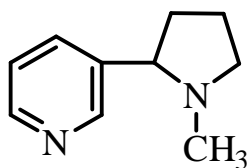
Разделение производных 1,4-бензодиазепина методом ВЭЖХ проводится в следующих условиях: хроматографическая колонка, за-

полненная обращенно-фазным сорбентом «Сепарон С-18»; в качестве подвижной фазы используется смесь 0,05 М раствора двузамещенного фосфата аммония и ацетонитрила (65:35) для разделения нативных бензодиазепинов и в соотношении (45:55) – для разделения бензофенонов; детектирование нативных бензодиазепинов проводится при 230 нм, а бензофенонов – при 220 нм. Идентификация бензодиазепинов и бензофенонов, содержащихся в биопробах, производится путем сопоставления времени (объемов) удерживания и коэффициентов емкости определяемого компонента и образцов сравнения индивидуальных бензодиазепинов и бензофенонов, а также сопоставлением УФ-спектров определяемого компонента и образца сравнения. Чувствительность обнаружения производных 1,4-бензодиазепина методом ВЭЖХ – 3–15 мкг.

Количественное определение производных 1,4-бензодиазепина *методом ВЭЖХ* проводят по нативным соединениям или бензофенонам (используют методы добавок, внешнего и внутреннего стандарта). *Спектрометрическое определение* производных 1,4-бензодиазепина основано на гидролизе производных 1,4-бензодиазепина до аминокбензофенонов и проведении реакции Браттона-Маршалла (образование азокрасителя).

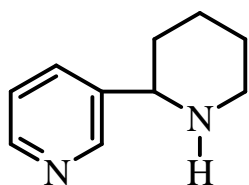
14.17. Алкалоиды, производные пиридина и пиперидина

Из алкалоидов, производных пиридина и пиперидина, токсикологическое значение имеют никотин, анабазин, конииин и пахикарпин.



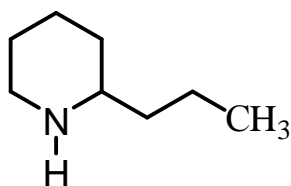
Никотин

Хабитрол, никабат, николан, никотранс, 3-[(2*S*)-1-метил-2-пирролидинил]пиридин



Анабазин

2-(3-пиридил)пиперидин



Кониин

Кониин, цикутин, (2*S*)-2-пропилпиперидин



Пахикарпин
d-спартеин

14.17.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных пиридина и пиперидина

Никотин, анабазин, конииин и пахикарпин представляют собой бесцветные маслянистые жидкости, быстро темнеющие на воздухе. Никотин при температуре ниже 60 °С и выше 120 °С неограниченно смешивается с водой, относится к слабым основаниям ($pK_{\text{BH}^+} = 7,8; 3,1$). Анабазин, конииин и пахикарпин также растворимы в воде. Производные пиридина и пиперидина перегоняются с водяным паром из щелочных растворов, экстрагируются хлороформом из кислых и щелочных растворов, однако большие количества этих алкалоидов экстрагируются из щелочных растворов.

Конииин содержится в растении болиголов пятнистый. Это растение широко произрастает в зоне умеренного климата. Анабазин содержится в ежовнике безлистном, никотин – алкалоид различных видов табака. Анабазин входит в состав лекарственных средств (таблетки), облегчающих отвыкание от курения.

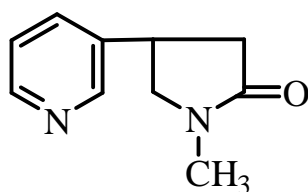
Пахикарпин – алкалоид, выделенный из надземных частей софоры толстоплодной. В медицинской практике применяется гидрохлорид пахикарпина.

Конииин, никотин и анабазин в малых дозах возбуждают центральную нервную систему, усиливают дыхание, повышают кровяное давление. При увеличении дозы происходит паралич нервной системы и дыхательной мускулатуры. Конииин более токсичен, чем анабазин, поэтому он в медицине не применяется. Никотин находит применение в сельском хозяйстве в качестве контактных инсектофунгицидов, входит в состав лекарственного средства «Никоретто» для лечения никотиновой зависимости.

Пахикарпин оказывает ганглиоблокирующее действие и применяется при спазмах периферических сосудов, при облитерирующем энтертериите. Пахикарпин повышает тонус и усиливает сокращение мускулатуры матки, поэтому применяется для усиления родовой деятельности. Пахикарпин не кумулируется в организме и в течении суток почти полностью выводится из организма. Признаками отравления, которые появляется через 0,5–3 часа, могут быть тошнота, рвота, головокружение, затрудненное дыхание, помрачнение сознания, расширение зрачков, судороги. Смерть наступает от асфиксии.

Поступление алкалоидов, производных пиридина и пиперидина, в организм может происходить через желудочно-кишечный тракт, легкие и неповрежденную кожу. При курении около 90–98% никотина попадает в легкие, а затем – в кровь. Никотин легко проникает в молоко курящих женщин, которые кормят детей молоком. Выведение производных пиридина и пиперидина осуществляется в виде метаболитов с мочой, калом, легкими, потовыми и слюнными железами.

Метаболизм никотина происходит путем метилирования, *N*-деметилирования и окисления. В результате метаболизма образуются норникотин, *N*-метилникотин и котинин:



(14.54)

Продукты окисления никотина с глюконовой кислотой образуют конъюгаты.

14.17.2. Изолирование и определение производных пиридина и пиперидина

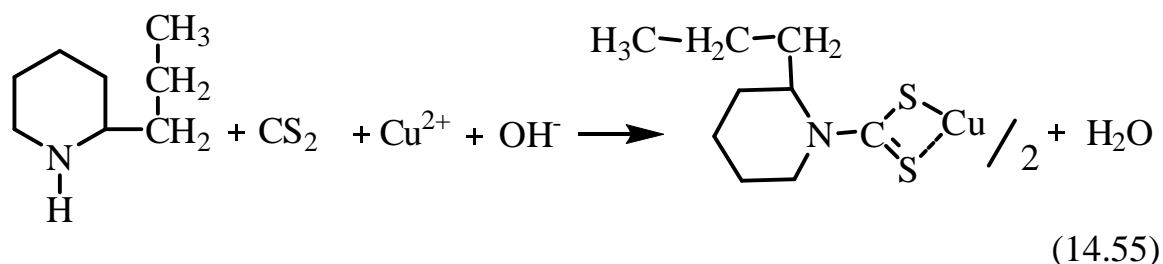
Изолирование производных пиридина и пиперидина осуществляется методом перегонки с водяным паром, при этом биоматериал подщелачивают 20% раствором карбоната натрия, а дистиллят собирают в 5% раствор хлороводородной кислоты. Собирают 50–75 мл дистиллята, в котором обнаруживаются малые количества веществ.

Выделение этих алкалоидов из биологического материала производят также водой, подкисленной серной кислотой. Полученную вытяжку подщелачивают (рН 8–10) и взбалтывают с хлороформом, в который переходят основания алкалоидов.

Обнаружение производных пиридина и пиперидина

Реакция с реактивом Драгендорфа: 0,5 мл исследуемого хлороформного экстракта упаривают на предметном стекле до появления маслянистого остатка, и прибавляют каплю реактива Драгендорфа. При наличии никотина, анабазина или кониина образуются осадки темно-оранжевой или темно-красной окраски с характерной формой кристаллов. Чувствительность реакции: 1 мкг (никотин, анабазин), 3,5 мкг (кониин).

Реакция образования дитиокарбамата меди (II). Кониин и анабазин с сероуглеродом и аммиачным раствором сульфата меди(II) образуют нерастворимые в воде дитиокарбаматы.



Методика выполнения реакции: в микропробирку вносят каплю подкисленного раствора исследуемого вещества, каплю 5% раствора сульфата меди и 5% раствора аммиака до щелочной реакции. Содержимое пробирки взбалтывают и прибавляют 2 капли смеси сероуглерода с бензолом (1:3). При наличии кониина или анабазина бензольный слой приобретает коричневую или желтую окраску. Чувствительность реакции – 1 мкг кониина (анабазина).

Реакция получения сублимата хлоргидрата кониина: несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества вносят в тигель и выпаривают досуха при комнатной температуре. К остатку прибавляют 2–3 капли 1% раствора хлороводородной кислоты. Жидкость оставляют при комнатной температуре почти до полного выпаривания. Затем тигель накрывают предметным стеклом и 20–30 мин нагревают на песчаной бане (120–130 °С), постоянно охлаждая предметное стекло влажным ватным тампоном. После этого образовавшийся на предметном стекле сублимат рассматривают под микроскопом. При наличии кониина в поле зрения микроскопа видны бесцветные игольчатые кристаллы. Чувствительность реакции – 0,33 мкг кониина.

Реакция анабазина (никотина) с пероксидом водорода: к 1 мл исследуемого раствора прибавить 1 мл пергидроля, 2–3 капли концентрированной серной кислоты. При наличии анабазина или никотина появляется красная окраска.

Реакция анабазина (никотина) с ванилином: к 1 мл исследуемого раствора прибавляют кристаллик ванилина и 1–2 капли концентрированной хлороводородной кислоты. Появление красной или вишнево-красной окраски указывает на наличие анабазина или никотина.

Реакция никотина с формальдегидом: на часовое стекло наносят 1–2 капли исследуемого раствора, 2 капли 4% раствора формальдегида и нагревают. Затем прибавляют каплю концентрированной азотной кислоты. Появление красной окраски характерно для никотина (анабазин такую реакцию не дает).

Реакция никотина с *n*-диметиламинобензальдегидом: на часовое стекло наносят каплю исследуемого раствора и рядом с этой каплей помещают каплю концентрированной хлороводородной кислоты, в которую вносят кристаллы *n*-диметиламинобензальдегида. Капли со-

единяют стеклянной палочкой и наблюдают появление красной, а затем фиолетовой окраски в месте соприкосновения капель.

Реакция анабазина (никотина) с солью Рейнеке: к сухому остатку на предметном стекле прибавляют по одной капле 0,1 М раствора HCl и 1% раствора соли Рейнеке. Под микроскопом наблюдают сферические сростки из призматических кристаллов (никотин) и сростки из мелких игольчатых кристаллов (анабазин). Чувствительность реакции: 1,2 мкг (никотин) и 0,7 мкг (анабазин).

Предложенные **микрориспаллоскопические реакции пахикарпина с тиоцианатом кобальта, реактивом Бушарда, пикриновой кислотой, реактивом Марме, золотобромоводородной кислотой** позволяют проводить обнаружение пахикарпина с чувствительностью 1,5; 4,2; 5; 16 и 20 мкг соответственно.

Реакция окисления пахикарпина бромом. Часть хлороформного экстракта упаривают до 1–2 мл и переносят этот раствор на полоску фильтровальной бумаги (несколько раз помещают края полоски в раствор). Обрабатывают бумагу парами брома – появляется желтое окрашивание, которое исчезает через 20–30 секунд. При обработке аммиаком (бумагу держат над парами аммиака) при последующем нагревании полоски бумаги появляется в присутствии пахикарпина красное пятно. Чувствительность реакции – 0,16 мг основания пахикарпина.

Фармакологическая проба на никотин. При нанесении пробы, содержащей никотин, на спинку лягушки наблюдается характерная поза лягушки (см. «Приложения»).

Тонкослойная хроматография. Подвижные фазы – хлороформ-ацетон (9:1), хлороформ-диэтиламин (9:1); неподвижная фаза – силикагель, проявитель – реактив Драгендорфа.

Количественное определение. ВЭЖХ (УФ-спектрометрический детектор).

Любой вид зависимости плох,
будь то зависимость от алкоголя,
наркотиков или идеализма.
Карл Юнг

ГЛАВА 15

НАРКОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

15.1. Наркомания и токсикомания

Вещества, способные давать психотропные эффекты (эйфория, возбуждение, галлюцинации, сон), относят к психоактивным веществам. Это понятие включает в себя наркотические, психотропные (лекарственные средства, действующие на ЦНС) вещества, а также вещества, не относящиеся к наркотическим и психотропным (например, органические растворители, табак и др.). Психоактивные вещества вызывают заболевания (токсикомании), связанные с употреблением психоактивных веществ.

Наркомания – заболевание, для которого характерно патологическое влечение к немедицинскому употреблению веществ наркотического действия (наркотические вещества, наркотики), изменяющих психику человека. При многократном применении человек привыкает к ним. На Западе и в США наркотические средства называют «белой чумой», «белой смертью» (героин и кокаин имеют белый цвет).

Термин «наркотическое средство» содержит в себе три критерия: медицинский, социальный, юридический. Медицинские последствия при злоупотреблении наркотических средств проявляются в расстройствах психики наркоманов, подавлении умственной деятельности, нарушении функций внутренних органов и т.д. Социальные последствия злоупотреблений наркотиками проявляются в совершении уголовных преступлений, снижении трудоспособности наркоманов, распаде семьи и т.д. Немедицинское употребление наркотиков представляет опасность как для наркоманов, так и для других членов семьи и общества.

К наркотикам относят только те вещества, злоупотребление которыми имеют отрицательные медицинские, социальные последствия, юридически признаны наркотиками и включены в список наркотиков. При отсутствии хотя бы одного из критериев психоактивное вещество относят к средствам, вызывающим токсикоманию.

В соответствии с конвенцией ООН по борьбе с незаконным оборотом наркотических средств и психотропных веществ и Резолюцией Генеральной Ассамблеи ООН по вопросу о международном сотрудничестве в борьбе с незаконным оборотом и распространением наркотических и психотропных средств под контролем стран-участниц находятся: 1) производство, изготовление, склонение к употреблению, предложение с целью продажи, распространение, продажа, поставка на любых условиях, посредничество, транспортировка, импорт или экспорт любого наркотического средства; 2) культивирование опийного мака, кокаинового куста, конопли либо других запрещенных к возделыванию наркотикосодержащих культур в целях производства наркотических средств; 3) изготовление, транспортировка, распространение и продажа оборудования и полупродуктов для производства наркотических средств.

При приеме наркотических веществ развивается психическая и физическая зависимость. *Психическая зависимость* – человек получает удовлетворение от приема наркотиков и требует периодического или постоянного введения наркотиков.

Физическая зависимость – сильное физическое расстройство при задержке приема наркотических веществ, т.е. абстинентный синдром (повышенная раздражительность, потливость, бессоница и др.). Для любого вида наркоманий характерно развитие толерантности организма к применяемому препарату и больной вынужден увеличивать его дозу, чтобы достичь эйфории и не допустить возникновения абстинентного синдрома. *Толерантность* – состояние адаптации, привыкания к наркотическим и токсикоманическим веществам, проявляющееся во все менее выраженной реакции на очередное введение их прежнего количества.

В развитии наркоманий любой формы выделяют три стадии:

- 1) адаптация;
- 2) абстинентные явления;
- 3) истощение.

Виды наркоманий:

- 1) опийная;
- 2) обусловленная препаратами гашиша;
- 3) кокаиновая;
- 4) наркомания психомиметическими средствами (галлюциногены: ЛСД, фенциклидин, псилоцин и др.);
- 5) фенилалкиламиновая;
- 6) наркомания препаратами барбитуровой кислоты;

7) этанольная;

8) полинаркомания (прием двух и более наркотиков).

В настоящее время по данным Управления по наркотикам и преступности ООН около 5% населения в мире употребляют наркотики (препараты конопли, фенилалкиламины, опиаты, кокаин и др.). В возрастной группе 20–25 лет наблюдается наибольшее число смертельных и острых отравлений. Основным потребителем стимуляторов группы фенилалкиламина является молодежь.

Предложено несколько классификаций наркотиков. Например, седативные – опиаты, опиоиды, барбитураты, алкоголь и др.; стимуляторы – фенилалкиламины, кокаин; галлюциногены (ЛСД, мескалин и др.).

В зависимости от развития толерантности, физической и психической зависимости различают наркотики, для которых характерны:

- выраженная и сильная толерантность – опиаты, барбитураты, алкоголь, фенилалкиламины, ЛСД;

- выраженная и сильная физическая и психическая зависимость – опиаты, барбитураты, алкоголь;

- слабая до явно выраженной психической зависимость – кокаин, каннабиноиды, ЛСД, фенилалкиламины;

- отсутствие физической зависимости – кокаин, каннабиноиды (незначительная), ЛСД, фенилалкиламины (незначительная).

Токсикомания – состояние, при котором развивается болезненное пристрастие к психоактивным веществам, которые не относятся к наркотикам (производные 1,4-бензодиазепа; стимуляторы ЦНС и анальгетики – кофеин, анальгин, и др.; антипаркинсонические препараты – тригексифенидил и др.; антигистаминные средства – прометазин, дифенгидрамин; средства бытовой и промышленной химии – бензин, ацетон, хлороформ, эфиры, дезодоранты и др.). Систематическое применение психоактивных веществ также имеет медицинские и социальные последствия.

Политоксикомании: употребление транквилизаторов и снотворных, транквилизаторов и алкоголя, кофеина и алкоголя.

Табакокурение считают вредной привычкой и не относят к токсикоманиям. Однако, психическое привыкание к никотину сопровождается развитием влечения к курению. Согласно МКБ-10 никотиновая зависимость признана психической зависимостью. У лиц в возрасте 12–17 лет, которые курят, в 10 раз повышается риск употребления в будущем наркотиков. Известно, что наиболее значимым мотивом возникновения наркомании является любопытство. Вероятность развития алкоголизма у курильщиков значительно выше, чем у некурящих. Развитию алкоголизма обычно предшествует регулярное курение.

В некоторых странах среди молодежи популярностью пользуется *насвай*. Такое название, очевидно, связано с тем, что раньше для изготовления насвая использовали растение *нас*. Основными компонентами

насвая являются махорка или табак (а иногда и табачная пыль), гашеная известь, зола растений, верблюжий кизяк или куриный помет, масло, клей, а также могут быть сухофрукты и приправы. Добавки вносят с целью получения определенной формы (шарики). Свежий насвай представляет собой крупные, зеленые шарики; лежалый насвай похож на порошок черного цвета. Готовят насвай в домашних условиях при наличии определенных компонентов.

В официальных документах «насвай» – это некурительный табак для сосания, его закладывают под нижнюю или верхнюю губу, под язык или в носовую полость. В ряде стран насвай продают на рынках (насвай ташкентский, ферганский, андижанский; насыбай, нацвай, анасвай, асмай, атмай и другие названия). При краткосрочном и длительном употреблении насвая наблюдаются сильное жжение слизистой ротовой полости, апатия, резкое слюноотделение, головокружение, расслабленность мышц. При глотании обильно выделяющейся слюны появляются тошнота, рвота, понос. Сочетание насвая с алкогольными напитками приводит к непредсказуемым последствиям.

Узбекские онкологи отмечают, что 80% случаев рака языка, губы, гортани связаны с потреблением насвая. Наличие экскрементов животных в составе насвая является причиной паразитарных заболеваний, в том числе вирусным гепатитом.

Насвай разрушает зубы. У подростков, употребляющих насвай, снижается восприятие, ухудшается память, нарушается психика, характерны неуравновешенность и состояние растерянности. Развивается не только сильная никотиновая зависимость, но и зависимость от других веществ. Такое состояние способствует переходу к употреблению более сильных психотропных веществ.

Особенности химико-токсикологического анализа наркотических и одурманивающих средств. В качестве объектов исследования на психоактивные вещества могут быть:

- биологические объекты (внутренние органы, кровь, моча, слюна, волосы, ногти, промывные воды);
- объекты растительного происхождения (листья, цветы, семена) и их экстракты;
- порошки, таблетки, драже;
- растворы для инъекций.

При осмотре объектов растительного происхождения отмечают степень измельченности, цвет, запах.

Пробоподготовка биожидкостей (кровь, моча) состоит из различных этапов: экстракция органическими растворителями, хроматографическое разделение, твердофазная экстракция. Проводят прямое концентрирование мочи (упаривание до небольшого объема) на водяной бане или роторном испарителе. С целью уменьшения энзиматической активности рекомендуется хранить кровь в холодильнике в замороженном виде. Экстракцию психоактивных веществ проводят как из цель-

ной крови, так и из плазмы или сыворотки. Основными методами разрушения волос являются кислотный или щелочной гидролиз, ферментативное разрушение, экстракция органическими растворителями при сверхкритических условиях и др.

Химико-токсикологический анализ наркотических и одурманивающих веществ проводится по двум основным направлениям: судебно-правовое (установление факта присутствия и употребления наркотика) и клиническое (диагностика, лечение, реабилитация). При судебно-правовой направленности для предварительного исследования используется один метод, а для подтверждающего – другой.

Химико-токсикологический анализ, имеющий судебно-правовую направленность, должен сопровождаться контролем каждой стадии анализа (применение эталонных образцов, калибровка проведенных операций, проверка правильности, статистическая обработка результатов, контроль за условиями анализа (рН, температура и др.).

На первом этапе скрининга наркотических веществ должно быть получено минимальное количество ложноотрицательных результатов, которые связаны с недостаточной чувствительностью метода, недостаточной квалификацией эксперта, преднамеренной фальсификацией пробы, систематическими ошибками исследований.

На втором этапе следует свести до минимума ложноположительные результаты, обусловленные малой специфичностью метода, недостаточной квалификацией эксперта, грязными реагентами, систематическими ошибками и другими причинами.

При скрининге наркотических средств главным является добиться минимума отрицательных и максимума положительных результатов, а это зависит от чувствительности и специфичности применяемых методов. Высокая чувствительность метода позволяет детектировать наркотическое вещество спустя несколько дней или недель после употребления. Выбор метода определяется видом анализируемого объекта.

Предварительный скрининг проводится с использованием хромогенных и микрокристаллоскопических реакций, иммунохимических методов (ИФА, ПФИА, РИА и др.), ТСХ. Подтверждающие методы (ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ) имеют одинаковую или более высокую чувствительность, что уменьшает количество ложноотрицательных результатов, и обладают более высокой специфичностью (снижается количество ложноположительных результатов).

По чувствительности инструментальные методы определения наркотических и одурманивающих веществ в моче можно расположить в такой последовательности: ГХ-МС (0,01–0,1 мкг/мл), ИФА (0,3 мкг/мл), ГХ и ТСХ (0,5–1,0 мкг/мл).

Основными этапами исследования объектов на наличие наркотических веществ являются: отбор и хранение проб; подготовка пробы к анализу; выбор предварительного, подтверждающего метода анализа и анализ; обработка (интерпретация) полученных результатов.

К химико-токсикологическому анализу наркотических и одурманивающих средств предъявляются определенные требования:

- Внешнее профессиональное тестирование и аттестация лаборатории.

- Химики-эксперты должны пройти внутренний контроль и доказать свой профессиональный уровень.

- Используемые реагенты и эталонные вещества сравнения (стандарты) должны быть паспортизированы. Приборы должны иметь инструкции по эксплуатации.

- Методики анализа должны быть подробно описаны и иметь метрологическую характеристику (линейность, воспроизводимость, предел обнаружения и др.).

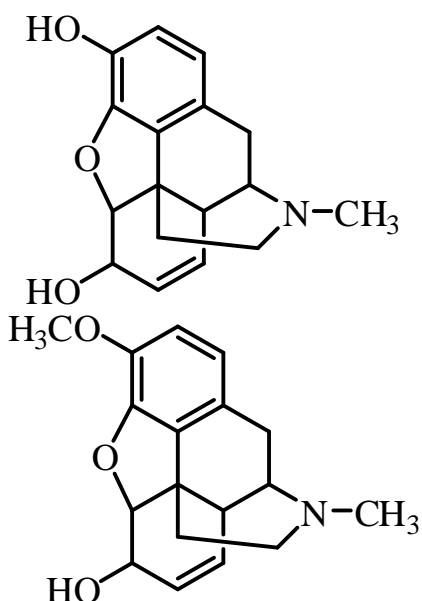
- Должны быть известны пределы обнаружения анализируемых веществ по каждому используемому методу.

- Должны быть регламентированы правила отбора и хранения исследуемых объектов, а также должна быть известна степень стабильности анализируемых веществ при хранении.

- При количественном определении сначала проводится холостой, а затем контрольный опыт. Величина концентрации вещества в контрольном опыте должна находиться в линейном пределе градуировочного графика.

Вещества, близкие по строению к морфину, относят к **опиатам** (морфин, кодеин, героин, 6-моноацетилморфин – основной метаболит героина). **Опиоиды** – вещества, подобные на морфин по механизму действия (взаимодействуют с опиоидными рецепторами), но имеющие иную химическую структуру (метадон, фентанил, промедол, этонитазен и др.).

Опиаты

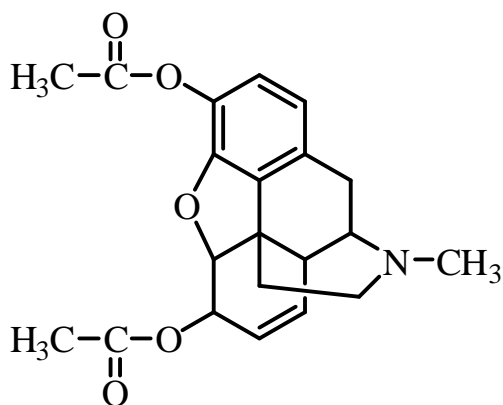


Морфин

(5 α ,6 α)-7,8-дидегидро-4,5-эпокси-17-метилморфинан-3,6-диол

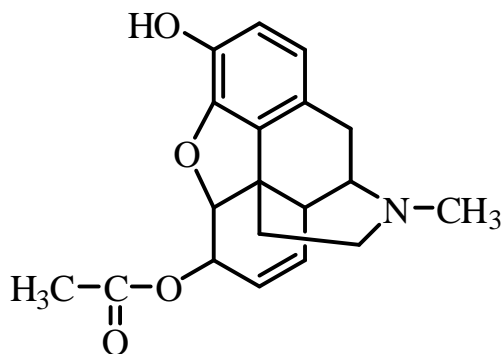
Кодеин

пневмогенол, зулиптан, кодипакс; (5 α ,6 α)-7,8-дидегидро-4,5-эпокси-3-метокси-17-метилморфинан-6-ол



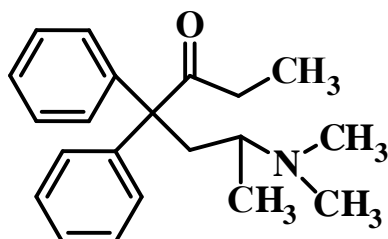
Героин

диацетилморфин, диаморфин;
(5 α ,6 α)-7,8-дидегидро-4,5-
эпокси-3,6-ацетокси-17-
метилморфинан



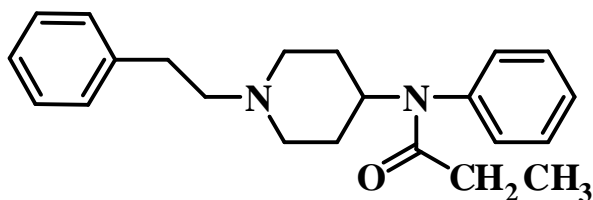
6-Моноацетилморфин

Опиоиды



Мегадон

(6-метиламино-4,4-
дифенил-3 гептанон)
синтезирован в Гер-
мании во время Вто-
рой мировой войны,
применяется как за-
менитель морфина и
отличается более про-
должительным дейст-
вием (до 24 часов) по
сравнению с морфи-
ном.



Фентанил

(N-Фенил-N[1-(2-
фенилэтил)-4-(1-
фенэтил)-4-
пиперидинил] про-
пионамид) активнее
(в 10 раз) героина, от-
личается коротким
действием (до 30
мин). Для аналогов
фентанила (алфента-

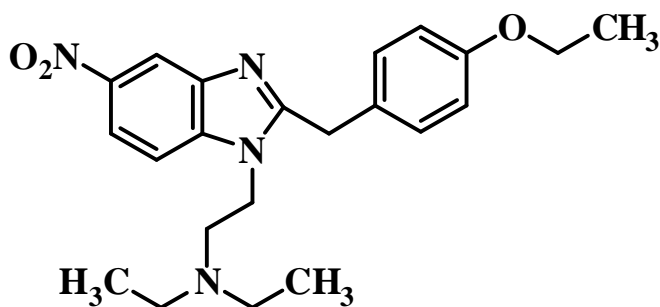
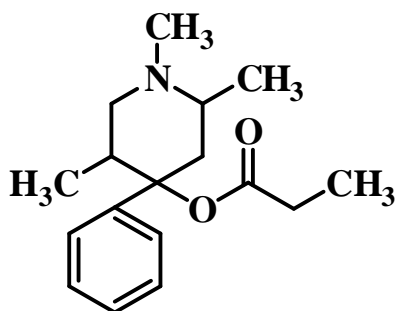
нил, лофентанил и др.) характерно более сильное обезболивающее действие по сравнению с фентанилом. Различают аналоги фентанила короткого действия (10 мин для фентанила) и длительного (до 48 часов для лофентанила).

Промедол

(1,2,5-триметил-4-пропионилокси-4-фенилпиперидин) обладает сильной анальгезирующей активностью. Действие на организм продолжается 3-4 часа.

Этонитазен

(1-(2-диэтиламино-этил)-2-(4-этоксибензил)-5-нитробензимидазол) по действию в 1500 раз сильнее морфина, входит в состав курительной смеси.

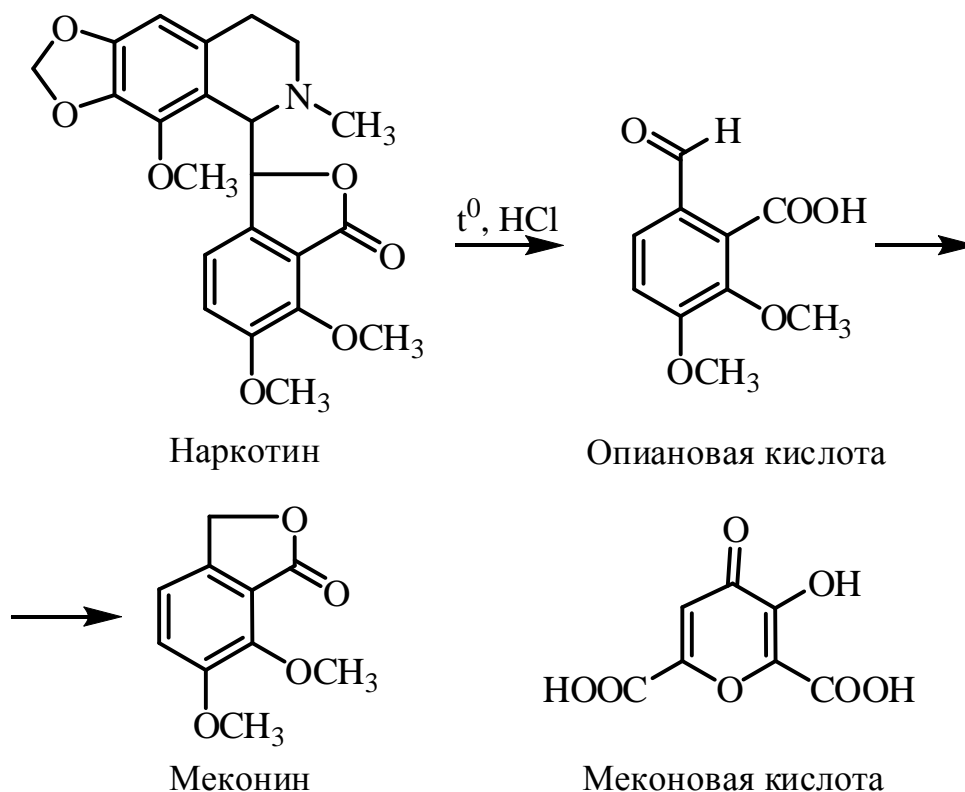


Изолирование опиоидов из биологических объектов проводят методами ЖЖЭ и ТФЭ. Специфических реакций обнаружения опиоидов нет. Для обнаружения опиоидов используют ТСХ и цветные тесты с реактивами Марки, Манделина, Фреде. Количественное определение опиоидов проводят методами ВЭЖХ, ГЖХ и ГХ-МС.

15.2. Производные фенантренизохинолина

Производные фенантренизохинолина (морфин и кодеин) являются алкалоидами, содержащимися в опиумном продукте, выделяемом из надрезанных недозревших головок опийного мака. Алкалоиды (их более 20) в опиумном продукте находятся в виде солей меконовой, серной и молочной кислот. Содержание алкалоидов колеблется от 2–3 до 15–20% в зависимости от сорта растения, условий произрастания. Гидрохлориды ал-

калоидов опия входят в состав опнопа (пантопон): около 50% морфина и 32–35% других алкалоидов. При исследовании биологического материала на наличие опнопа определяют морфин, кодеин, а при исследовании биоматериала на наличие опия определяют опиные алкалоиды, меконовую кислоту и меконин, который образуется из наркотина при изолировании:



Вещество, выделенное в 1803 г. из опия, Сертюрнер назвал морфином в честь греческого бога сна Морфея. Через 150 лет был осуществлен синтез морфина, который оказался дорогостоящим. Поэтому морфин получают из опия-сырца.

Содержание кодеина в опио невелико (0,2–2,0%), поэтому его получают метилированием морфина. Героин является полусинтетическим аналогом морфина, получаемым путем ацетилирования морфина. В настоящее время большая часть героина производится в подпольных лабораториях (запрещен к использованию в 1924 г). Поэтому продаваемый на черном рынке героин загрязнен уксусной кислотой, органическими растворителями и другими продуктами, используемыми в технологической схеме производства героина.

15.2.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных фенантренизохинолина

По физическим свойствам производные фенантренизохинолина (морфинана) представляют собой белые кристаллические порошки.

Соли производных морфина хорошо растворимы в воде (за исключением кодеина фосфата, который медленно растворим в воде). В этаноле и хлороформе хорошо растворимо основание кодеина и героина, основание морфина мало растворяется в воде, в эфире, хлороформе, бензоле.

Благодаря наличию третичного атома азота, морфин и его аналоги обладают основными свойствами. Морфин имеет в молекуле свободный фенольный гидроксил, обуславливающий кислотные свойства. Поэтому морфин является амфолитом. В таблицах 15.1 и 15.2 приведены значения максимумов спектров поглощения производных фенантренизохинолина в УФ-области и основные полосы поглощения в ИК-области.

Таблица 15.1

Спектральные характеристики производных фенантренизохинолина в УФ-области

Вещество	Растворитель	λ , нм	$A_{1\text{см}}^{1\%}$
Морфин	0,1 М НСl	285	50
	0,1 М NaOH	298	202
Кодеин	Этанол	286	50
	0,1 М НСl	285	54
	0,1 М NaOH	284	49
Героин	0,1 М НСl	278	39
	0,1 М H ₂ SO ₄	279	52
	Этанол	281	54
	0,1 М NaOH	278	47

Таблица 15.2

Основные полосы поглощения производных фенантренизохинолина в ИК-области

Вещество	Основные полосы поглощения, см ⁻¹
Морфин	1243, 1118, 1086, 945, 833, 805
Кодеин	1500, 1268, 1111, 1052, 934, 793
Героин	1764, 1736, 1245, 1215, 1178, 911

Морфин оказывает сильное болеутоляющее действие. Понижая возбудимость болевых центров, он оказывает также противошоковое действие при травмах. В больших дозах вызывает снотворный эффект, этот эффект более выражен при нарушениях сна, связанных с болевыми ощущениями.

Морфин вызывает выраженную эйфорию, и при его повторном применении быстро развивается зависимость (морфинизм).

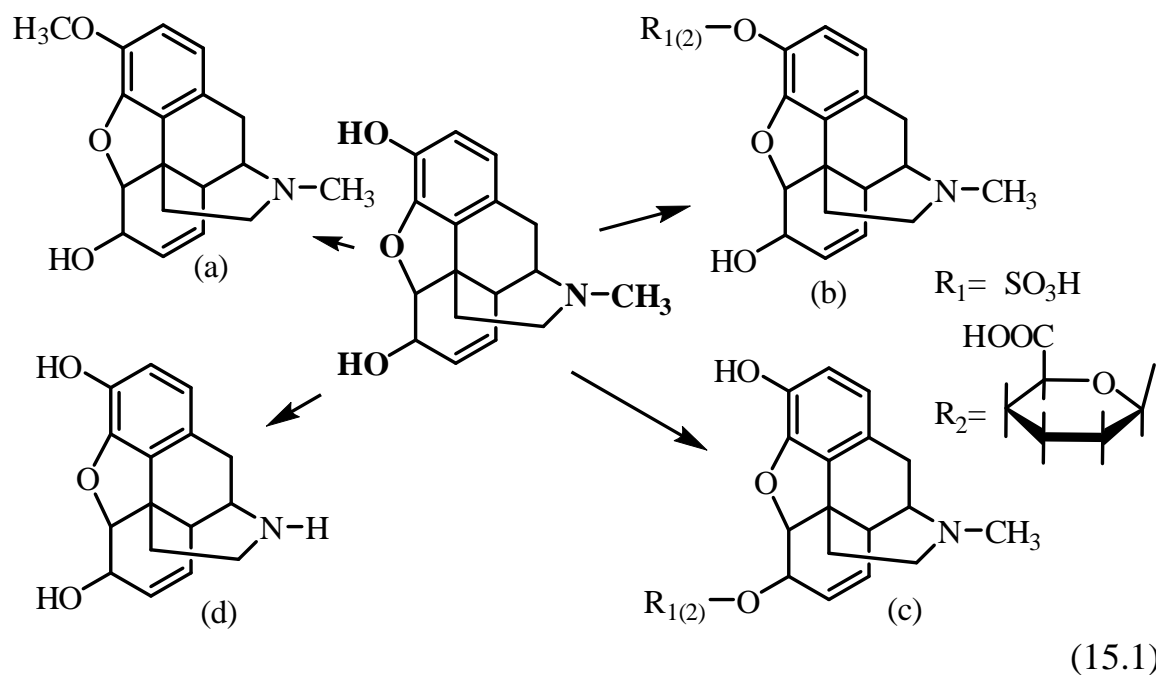
Морфин оказывает тормозящее влияние на условные рефлексy, усиливает действие наркотических, снотворных и местноанестезирую-

ших средств. Он понижает возбудимость кашлевого центра, угнетает дыхательный центр. Морфин вызывает также возбуждение центра блуждающих нервов с появлением брадикардии. В результате активации нейронов глазодвигательных нервов морфин вызывает у людей миоз. Рвота, которая может наблюдаться при применении морфина, связана с возбуждением хеморецепторных пусковых («триггерных») зон продолговатого мозга. Морфин угнетает рвотный центр, поэтому повторные дозы морфина и рвотные средства, вводимые после морфина, рвоты не вызывают.

Под влиянием морфина повышается тонус гладкой мускулатуры внутренних органов. Наблюдается повышение тонуса сфинктеров желудочно-кишечного тракта, повышается тонус мускулатуры желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, ослабляется перистальтика, замедляется продвижение пищевых масс, что приводит к развитию запора. Наблюдается спазм мускулатуры желчевыводящих путей, повышается тонус сфинктеров мочевого пузыря. В течение суток с мочой выводится 80–90% морфина, в неизменном виде 3–10%.

Применяется морфин преимущественно для купирования боли.

Основные пути метаболизма морфина – метилирование с образованием кодеина (а), глюкуронизация с образованием морфин-3 (b) и морфин-6- (c) глюкуронидов и сульфатов, N-деметилирование с образованием норморфина (d). Накапливается морфин в печени, почках, мозге, легких. Обнаруживается в волосах и ногтях наркоманов, которые длительное время применяли морфин.

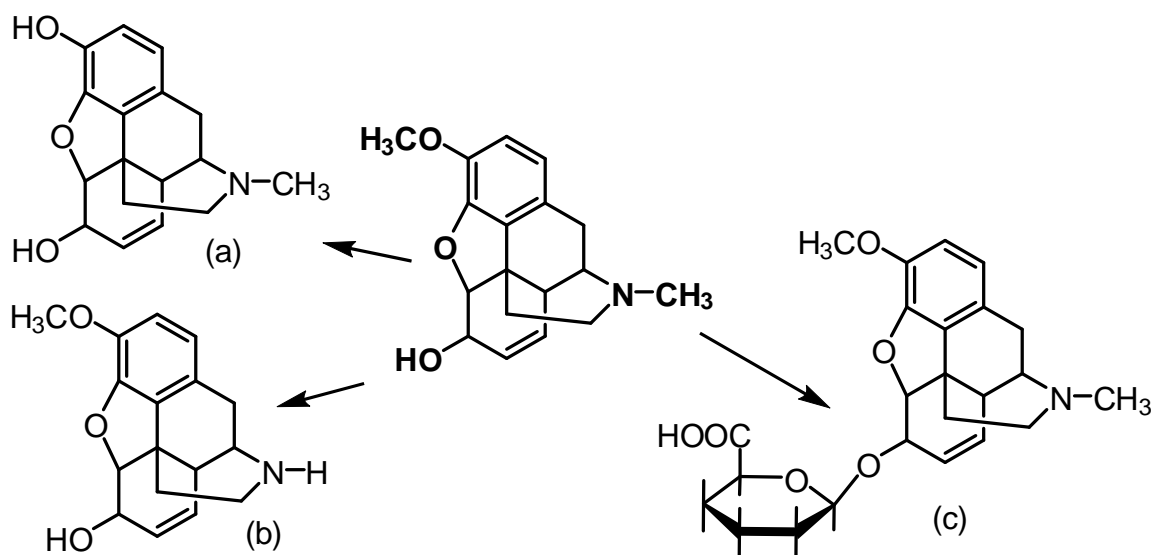


Кодеин по действию близок с морфином, однако болеутоляющие свойства у него выражены слабее, более сильно выражена способность уменьшать возбудимость противокашлевого центра, в меньшей степе-

ни, чем морфин он угнетает дыхание, меньше тормозит деятельность желудочно-кишечного тракта.

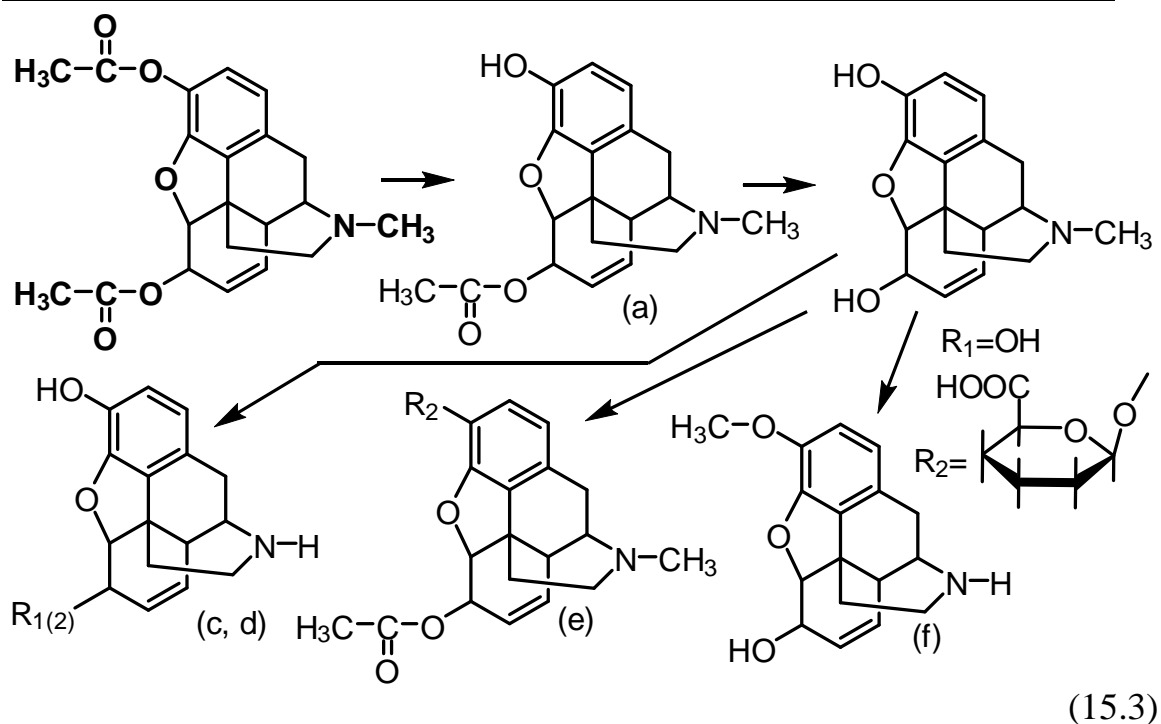
Применяется кодеин преимущественно как противокашлевое лекарственное средство.

Кодеин метаболизируется с образованием морфина (а), который подвергается дальнейшему метаболизму, норкодеина (b), 6-О-глюкуронида кодеина (с). В течение 20 минут в моче обнаруживаются в основном конъюгаты кодеина, а затем конъюгаты морфина.



(15.2)

Героин более липофилен, чем морфин. Это способствует быстрому всасыванию и легкому прохождению героина через гематоэнцефалический барьер. Основные способы введения героина – вдыхание паров, курение, внутривенное введение и ингаляция. «Уличный» героин обычно содержит около 5% героина, остальное – барбитураты, кофеин, производные пиразола, бензодиазепина, органические кислоты и различные наполнители (глюкоза, крахмал, хлорид натрия и др.). Период полувыведения героина составляет 3–5 мин (внутривенно) и 1–1,5 ч (перорально). В крови героин быстро метаболизируется до 6-О-ацетилморфина (а), затем до морфина (b), который образует морфин-6-глюкуронид и морфин-3-глюкуронид. Обнаружены также норморфин (с), его глюкуронид (d), 6-ацетил-3-глюкуронид (e), норкодеин (f). Около 80% принятой дозы выделяется с мочой в течение первых суток. 6-Моноацетилморфин является основным метаболитом героина и служит маркером его употребления.



На основании результатов исследования биоматериала на содержание производных фенантренизохинолина и их метаболитов можно сделать выводы о лекарственном и нелекарственном употреблении опиатов. Наличие морфина или его конъюгатов в моче указывает на использование морфина или злоупотребление героином одним или двумя днями ранее. Наличие в моче одновременно морфина и кодеина может свидетельствовать о лекарственном употреблении кодеина. При использовании терапевтических доз кодеина (до 30 мг) морфин и кодеин детектируются только в течение нескольких часов после употребления. Другие метаболиты обнаруживаются через 2–3 дня после употребления. Низкие концентрации морфина и кодеина в моче не позволяют сделать однозначный вывод о том, какой опиат был употреблен (морфин, кодеин или героин). Доказательством употребления героина является обнаружение его основного метаболита – 6-О-ацетилморфина, который образуется только при метаболизме героина.

Центральное фармакологическое действие героина заключается в седативном эффекте, снижении уровня сознания, ощущении тепла, сонливости и эйфории. В настоящее время героин в качестве лекарственного средства не применяется.

При отравлении алкалоидами опия и их синтетическими аналогами развивается гиперемия лица, головокружение, ощущение жары и жажды, тошнота. Затем развивается бледность кожи, брадикардия, гипотермия. Больной впадает в кому, для которой характерно поверхностное нерегулярное дыхание, сужение зрачков, цианоз, арефлексия. В результате спазма сфинктеров происходит переполнение мочевого пузыря и кишечника. Летальный исход наступает вследствие прекращения дыхания.

Поступление в организм производных фенантренизохинолина происходит через желудочно-кишечный тракт или парентерально. Выведение из организма происходит главным образом путем метаболизма в печени и выведения через почки, отчасти через кишечник.

Основные фармакокинетические параметры представлены в таблице 15.3.

Таблица 15.3

**Основные фармакокинетические параметры
производных фенантренизохинолина**

Соединение	pK_a	pK_{BH^+}	$T_{1/2}$, ч	V_d , л/кг	CL, мл/мин/кг	P_b , %
Морфин	9,9	8,0	2-3	3-5	15-20	20-35
Кодеин	–	8,2	2-4	2,5-3,5	10-15	7-25
Героин	–	7,6	0,05	–	–	–

При отравлении алкалоидами опия и их синтетическими аналогами промывают желудок 0,05-0,1% раствором перманганата калия, затем назначают обильное питье с добавлением касторового масла или сульфата натрия с активированным углем.

15.2.2. Изолирование и определение производных фенантренизохинолина

Изолирование алкалоидов опия и их производных проводят частными и общими методами изолирования в зависимости от вида анализа и состояния исследуемого объекта. Экстракцию производных морфина из водной вытяжки проводят при pH 8–10.

Морфин является амфолитом, поэтому при $pH < 8$ и $pH > 10$ он находится в ионизированном состоянии. Хотя при значении pH 8–10 происходит образование максимального количества неионизированной формы морфина, однако при этих значениях pH хлороформом экстрагируется 20–30% морфина. Изоамиловый спирт при pH 8,5–9,5 экстрагирует 70–80% морфина. В настоящее время в качестве экстрагента в основном используют смесь, состоящую из полярного и неполярного органического растворителя (хлороформ-бутанол (9:1), хлороформ-изопропанол (9:1), хлороформ-этанол (2:1)).

В моче основные количества опийных алкалоидов находятся в виде конъюгатов. Поэтому образец мочи (20 мл) подвергают кислотному гидролизу (4 мл конц. HCl) на водяной бане в течение 15 минут. Раствор переносят в стакан, прибавляют твердый гидрокарбонат натрия до pH 8,5–9,0 и экстрагируют (дважды по 10 мл) смесью хлороформ-изопропанол (9:1). Экстракты объединяют, фильтруют через безводный Na_2SO_4 и упаривают досуха в токе теплого воздуха или азота.

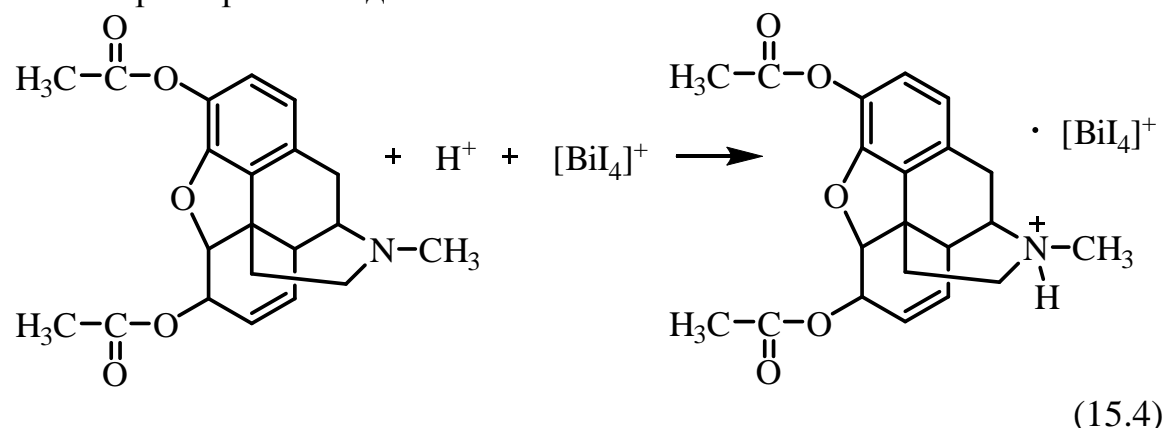
Изолирование опиатов (морфин, кодеин) из крови несколько отличается. После кислотного гидролиза осаждают белки с помощью

трихлоруксусной кислоты, центрифугируют и водный супернатант очищают от липидов экстракцией гексаном. Кислую водную фазу отделяют, с помощью карбонатного буфера создают рН 9,4, экстрагируют опиаты смесью хлороформ–*n*-бутанол (9:1) и центрифугируют. Исследуемую кровь хранят в замороженном состоянии при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а исследуемые экстракты – при температуре не выше $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Применение фторида натрия в качестве консерванта способствует сохранности морфина в крови в течение 2 лет.

Метод ГХ-МС позволяет определять морфин и кодеин в волосах: 10-30 мг волос промывают 5×1 мл метанолом (этанолом) и водой. Образец высушивают и измельчают в ступке с добавлением битого стекла и 1 мл 6 М НСl. Гомогенат выдерживают при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30-45 минут, в охлажденную смесь добавляют 0,5–1 мл воды и 25% раствор аммиака до рН 10. Экстракцию проводят 4×2 мл смесью хлороформ-изопропанол (9:1). Органическую фазу сушат над безводным Na_2SO_4 и упаривают в токе воздуха.

Реакция с общеалкалоидными осадительными реактивами

Морфин, кодеин и героин содержат в молекуле третичный атом азота и вступают в реакцию с общеалкалоидными реактивами, такими, как реактив Драгендорфа, Майера, Бушарда, соль Рейнеке с образованием характерных осадков.

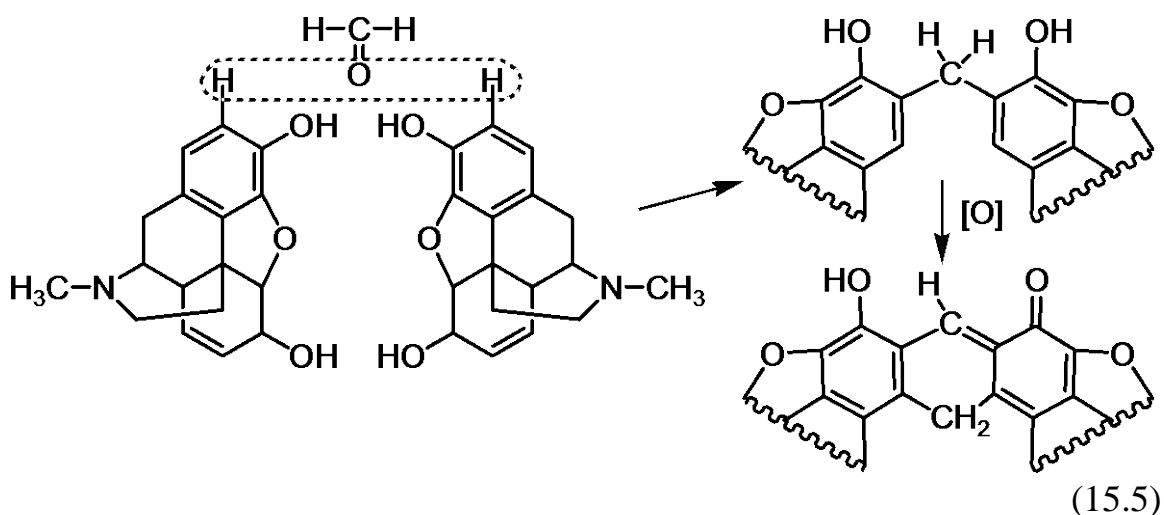


Методика выполнения реакции: 0,5 мл исследуемой органической фазы упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю общеалкалоидного реактива. При наличии производных фенантренизохинолина образуются осадки характерной окраски и с характерной формой кристаллов.

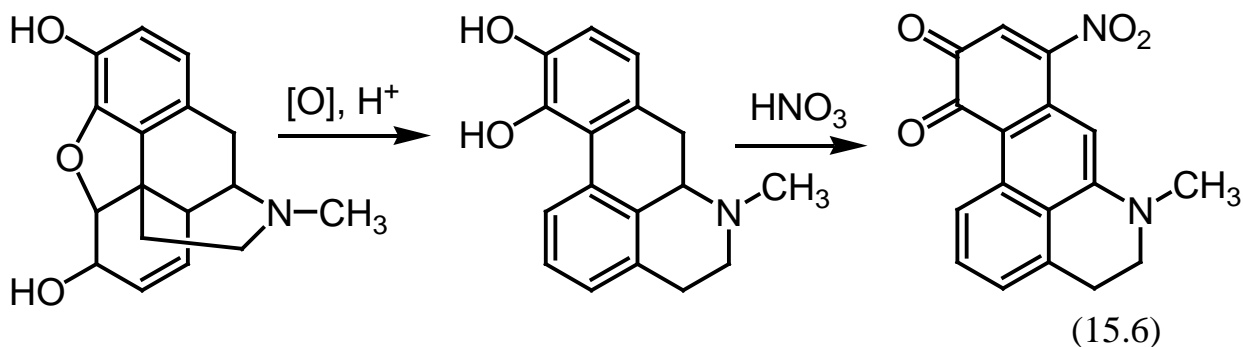
Реакция морфина и кодеина с реактивами Эрдмана, Манделина, Фреде, Марки. Морфин и кодеин дают цветные реакции с реактивом Марки (концентрированная серная кислота, содержащая формальдегид), реактивом Фреде (концентрированная серная кислота, содержащая молибденовую кислоту), реактивом Манделина (концентрированная серная кислота, содержащая ванадиевую кислоту).

При взаимодействии морфина с реактивом Фреде появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в синее, а затем в зеленое. Чувствительность реакции – 0,05 мкг морфина. Кодеин в этих условиях дает продукт фиолетового цвета.

При взаимодействии морфина с реактивом Марки развивается пурпурное окрашивание, переходящее в фиолетовое. Кодеин в таких условиях дает сине-фиолетовую окраску. Чувствительность реакции – 0,05 мкг морфина (кодеина).

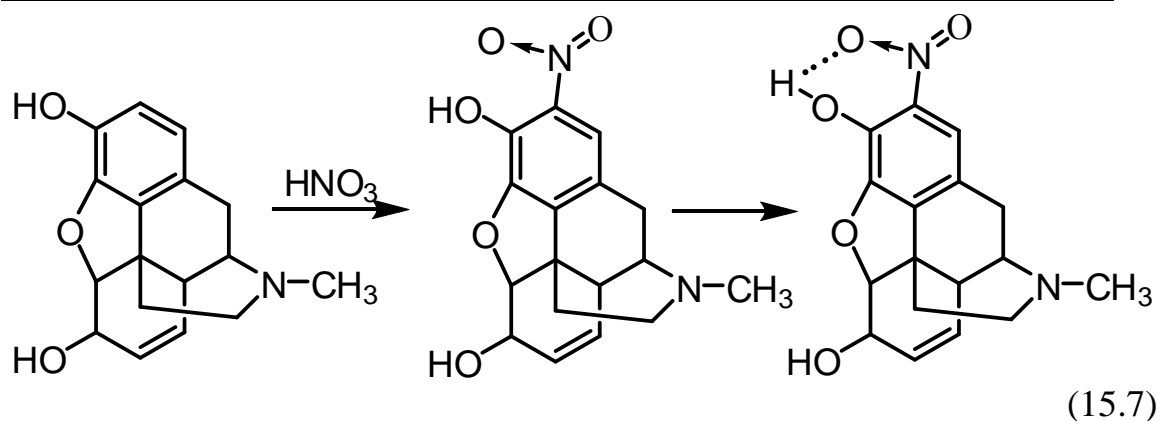


При взаимодействии морфина и кодеина с реактивом Эрдмана (концентрированная серная кислота, содержащая азотную кислоту) образуется продукт красного цвета.



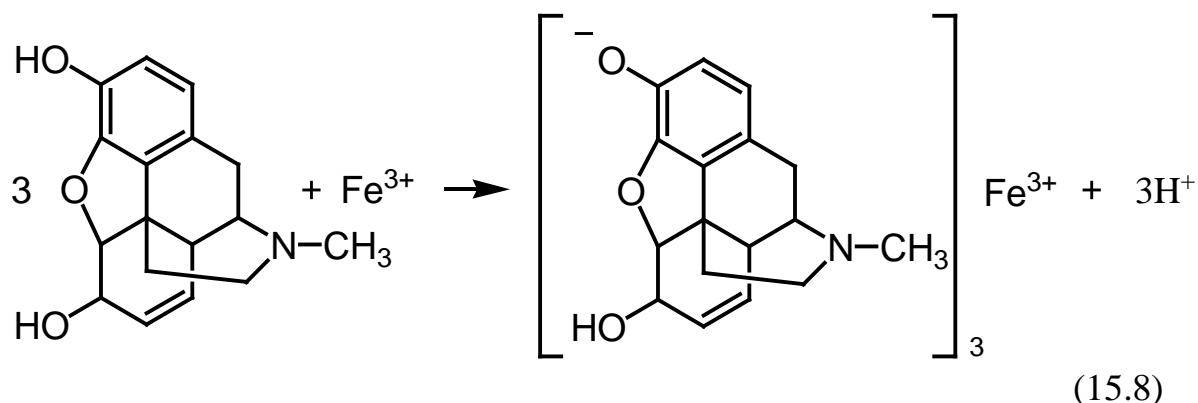
Методика выполнения реакции: несколько капель исследуемого хлороформного экстракта упаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 каплю реактива Эрдмана.

Реакция опиатов с концентрированной азотной кислотой. С концентрированной азотной кислотой опиаты образуют внутримолекулярные комплексы с характерной окраской.



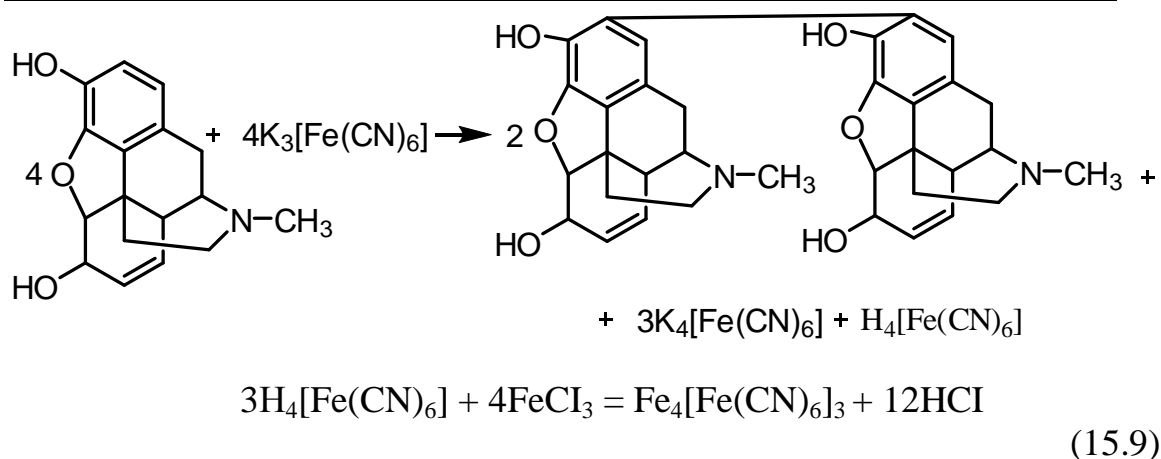
Применение теста с азотной кислотой позволяет предположительно отличить героин от морфина и кодеина. Медленное изменение желтой окраски до светло-зеленой указывает на возможное присутствие героина; быстрый переход оранжевой окраски в красную, а затем медленно в желтую – на присутствие морфина; медленный переход оранжевой окраски в желтую – на присутствие кодеина.

Реакция морфина с хлоридом железа (III). Наличие фенольного гидроксила в молекуле морфина способствует образованию комплекса с хлоридом железа (III). Эта реакция позволяет отличить морфин от кодеина и героина.



Методика выполнения реакции: в фарфоровую чашку вносят несколько капель исследуемого экстракта и упаривают при комнатной температуре досуха. К сухому остатку прибавляют 1–2 капли свежеприготовленного 2% раствора хлорида железа (III). При наличии морфина появляется синяя окраска.

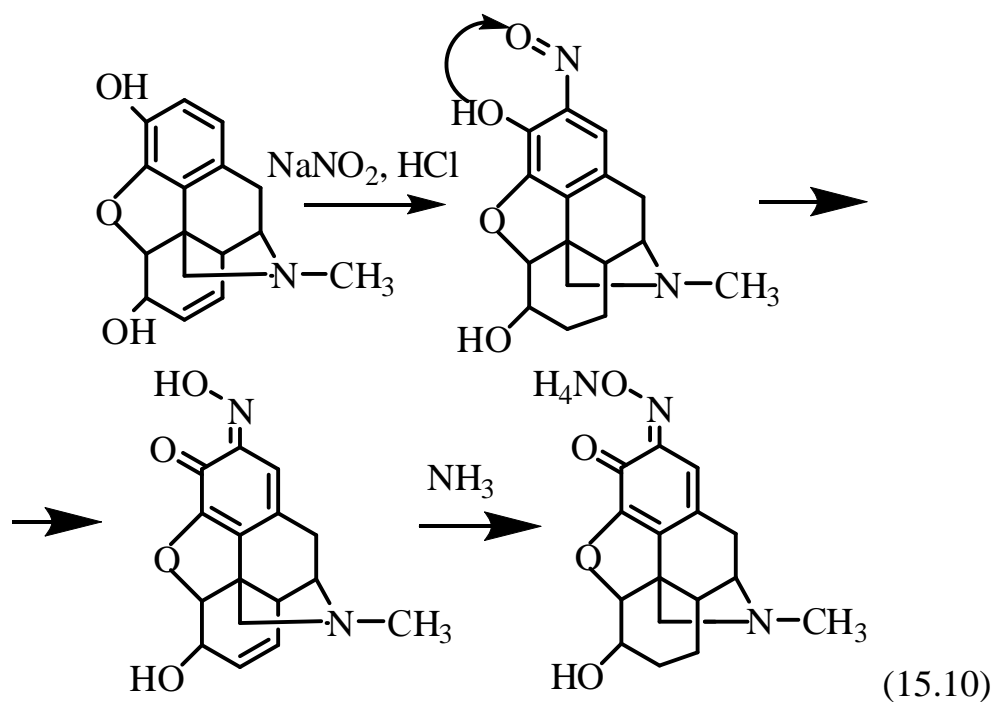
Реакция образования берлинской лазури. Благодаря наличию фенольного гидроксила морфин способен легко окисляться. При действии на него в кислой среде гексацианоферрата (III) калия морфин окисляется в дегидроморфин (псевдоморфин), а гексацианоферрат (III) калия восстанавливается в гексацианоферрат (II) калия. Последний вступает в реакцию с хлоридом железа (III) с образованием берлинской лазури – $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ или $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.



Методика выполнения реакции: к водному раствору исследуемого вещества прибавляют несколько капель смеси растворов гексацианоферрата (III) калия и хлорида железа (III). При наличии морфина появляется синяя окраска раствора или выпадает осадок синего цвета.

Реакцию с гексацианоферратом (III) калия применяют для обнаружения морфина в лекарственных смесях и в хорошо очищенных вытяжках из биологического материала, так как мешают примеси из биоматериала.

Характерной реакцией для обнаружения морфина является *реакция с раствором нитрита натрия* в кислой среде при последующем прибавлении раствора аммиака. Появление окраски раствора обусловлено образованием окрашенной аммонийной соли:



Этой реакции не мешает кодеин, так как он является метиловым эфиром морфина и не вступает в реакцию с натрия нитритом.

При обнаружении морфина, кодеина и подозрении на отравление опиумом проводят исследование биоматериала (органы трупа, рвотные массы и др.) на меконую кислоту. Изолирование проводят спиртом, подкисленным хлороводородной кислотой. Полученный раствор выпаривают досуха, остаток растворяют в воде, фильтруют и фильтрат взбалтывают с бензолом. Бензольный экстракт используют для дальнейшего исследования. К водной фазе прибавляют избыток оксида магния и нагревают. К слабо подкисленному (НСI) фильтрату прибавляют 1% раствор хлорида железа (III) – при наличии меконовой кислоты появляется кроваво-красное окрашивание. Такой способ позволяет обнаружить меконую кислоту при наличии 0,05 г опия. В опиуме в значительных количествах (до 10%) содержится наркотин, который при изолировании переходит в меконин, экстрагируемый бензолом. Для обнаружения меконина бензольный экстракт выпаривают, к сухому остатку прибавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. Появление зеленого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие меконина.

Обнаружение производных фенантренизохинолина методом ТСХ проводят на хроматографических пластинках Silufol UV, Merck 60, Sorbfil UV в системах: хлороформ-гексан-триэтиламин (9:1:1), бензол-этанол-триэтиламин (9:1:1), эфир-ацетон-25% раствор аммиака (40:20:2), хлороформ-ацетон-диэтиламин (50:30:2), этилацетат-метанол-25% раствор аммиака (17:2:1). Проявление хроматографических пятен проводят раствором иодплатината калия, реактивом Драгендорфа, реактивом Марки. Предложены и другие способы обнаружения производных фенантренизохинолина методом ТСХ.

УФ и ИК-спектметрия. В таблицах 15.1 и 15.2 представлены максимумы характерных полос поглощения морфина, кодеина и героина.

Методы **газовой хроматографии и ВЭЖХ** используются для *идентификации и количественного определения* производных морфина в биологических объектах. Выделение опиатов из биологических жидкостей проводят методами ЖЖЭ или ТФЭ после предварительного гидролиза конъюгатов. В качестве детекторов при газохроматографическом определении опиатов применяют ДИП, ЭЗД, МС-детектор. Иногда используют прием дериватизации (триметилсилилирование или с трифторуксусным ангидридом), так как при кислотном гидролизе разрушаются метаболиты героина.

В качестве подвижной фазы при ВЭЖХ-определении опиатов используют различные смеси. Например, смесь 0,01 М водного раствора ацетата аммония и ацетонитрила (65:35) или смесь 0,05 М раствора двузамещенного фосфата аммония и метанола (60:40). Хроматографи-

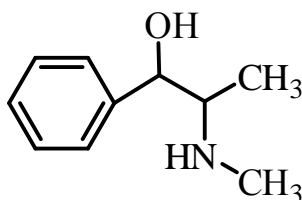
ческая колонка заполнена обращенно-фазовым сорбентом «Сепарон С-18».

Описанные в литературе методики экстракционно-фотометрического определения морфина, кодеина и других опийных алкалоидов, основанные на реакциях образования ионных ассоциатов с оксиксантоновыми, сульфопфталеиновыми красителями и азореагентами являются неизбирательными и в химико-токсикологическом анализе в настоящее время не применяются.

15.3. Производные фенилалкиламина

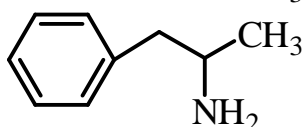
Различают фенилалкиламины (ФАА) природного и синтетического происхождения. Природные ФАА содержатся в эфедре (эфедрин), кате съедобном (катин и катинон), пейоте (мескалин).

Синтетические ФАА в настоящее время получили широкое распространение среди молодежи, так как вызывают психическое состояние, при котором обостряются чувства и повышается эмоциональная свобода. Широкое распространение получили около 20 производных амфетамина и метамфетамина.



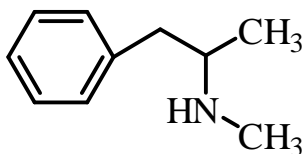
Эфедрин

1-фенил-2-метиламинопропанол-1



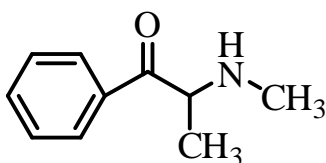
Амфетамин

фенамин, 2-амино-фенилпропан



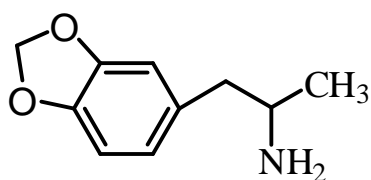
Метамфетамин

первитин, амфедроксин, геровит, дезамин, метедрин, неодрин, премодрин, сондрокс, тонедрон; 2-(метиламино)-фенилпропан

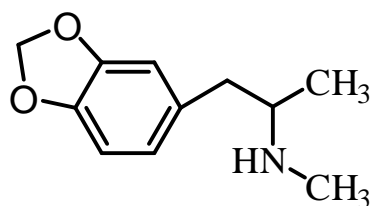


Эфедрон

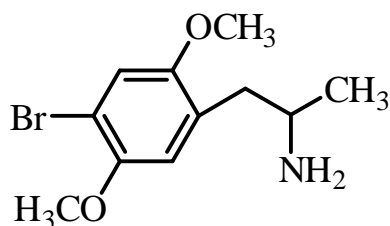
Меткатинон; 2-(метиламино)-1-фенилпропан-1-он



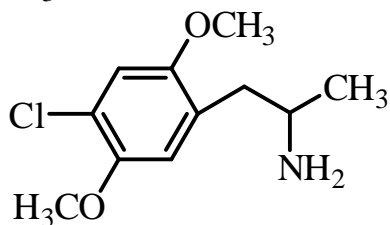
3,4-метилендиоксиамфетамин
(МДА)



3,4-метилендиоксиметамфетамин
(МДМА)



2,5- диметокси-4-бромамфетамин
(ДОБ)



2,5-диметокси-4-хлорамфетамин
(ДОХ)

15.3.1. Общая характеристика и токсикологическое значение фенилалкиламинов

Эфедрин является алкалоидом, содержащимся в растениях семейства эфедровых. Гидрохлорид эфедрина представляет собой белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде, этаноле, практически нерастворим в эфире. Основание эфедрина растворимо в воде, эфире, хлороформе и этаноле.

Основание амфетамина – бесцветная, подвижная, слаболетучая жидкость. Поглощает CO_2 из воздуха и переходит в летучую соль – карбонат. Соли амфетамина представляют собой белые кристаллические порошки, растворимые в воде и спиртах. Не растворимы в хлороформе или эфире. Гидрохлорид амфетамина сильно гигроскопичен. Амфетамин обладает свойством стереоизомерии.

Соли метамфетамина представляют собой белые кристаллические вещества, хорошо растворимые в воде, этаноле, хлороформе, практически нерастворимы в эфире.

В таблицах 15.4 и 15.5 представлены спектральные характеристики и основные характеристические частоты ИК-спектров фенилалкиламинов (ФАА).

Таблица 15.4

УФ-спектральные характеристики фенилалкиламинов

Вещество	ϵ	λ_{\max} , нм	Вещество	ϵ	λ_{\max} , нм
Амфетамин	14	251, 257, 263	Норэфедрин	11,7	251, 257, 262
Метамфетамин	12,1	251, 257, 263	Эфедрон	878	251
Эфедрин	12	251, 257, 263			

Таблица 15.5

Основные характеристические частоты ИК-спектров ФАА, см⁻¹

Амфетамин	Метамфетамин	Эфедрин	Норэфедрин	Эфедрон
700	698	699	700	702
740	747	754	746	757
825	1060	760	1030	
1090	1085	994	1055	
		1242	1201	
1495	1491	1400	1500	1510
1605	1590	1480	1590	1590
		1605		1695

По фармакологическим свойствам эфедрин близок к адреналину, стимулирует α - и β -адренорецепторы. Вызывает сужение сосудов, повышение артериального давления, расширение бронхов, торможение перистальтики кишечника, расширение зрачков, повышение содержания сахара в крови.

Сравнительно с адреналином эфедрин оказывает менее резкое, но значительно более продолжительное действие. В связи с большей стойкостью эфедрин эффективен при введении внутрь и удобен для применения при курсовом лечении (например, при аллергических заболеваниях).

Эфедрин оказывает возбуждающее действие на центральную нервную систему, повышает возбудимость дыхательного центра. При отравлении наркотическими и снотворными средствами оказывает пробуждающее действие. В этом отношении он близок к амфетамину; последний действует, однако, значительно сильнее. Применяют эфедрин при бронхиальной астме, сенной лихорадке, крапивнице, сывороточной болезни и других аллергических заболеваниях, для сужения сосудов и уменьшения воспалительных явлений при ринитах, как средство для повышения артериального давления при оперативных вмешательствах (особенно при спинномозговой анестезии), при травмах, гипотонической болезни. Применяют также при нарколепсии, отравлениях снотворными и наркотиками, при энурезе. Действие при энурезе связано с влиянием на центральную нервную систему, в связи с чем

сон становится менее глубоким и облегчается просыпание при появлении позывов на мочеиспускание.

Амфетамин и метамфетамин (синтезированы в 1887 г. и 1919 г. соответственно) являются сильными стимуляторами ЦНС. Стимулирующее действие препаратов связано в значительной мере с их влиянием на стволовую часть мозга. В нейрохимическом механизме действия амфетамина и метамфетамина большую роль играет его способность вызывать высвобождение из гранул пресинаптических нервных окончаний норадреналина и дофамина и стимулировать, таким образом, центральные норадренергические и в большей степени дофаминергические рецепторы. Они оказывают также небольшое ингибирующее влияние на активность моноаминоксидазы и тормозят обратный нейрональный захват дофамина и норадреналина.

Амфетамины обладают также периферической адренергической активностью (стимулируют α - и β -адренорецепторы); они вызывают сужение периферических сосудов, усиление сокращений сердца, повышение артериального давления, расслабление мускулатуры бронхов, расширение зрачков. Эти эффекты более продолжительны, но менее выражены, чем у адреналина и эфедрина.

При правильном дозировании амфетамины, усиливая процессы возбуждения в ЦНС, уменьшают чувство утомления, оказывают общее возбуждающее влияние, выражающееся в улучшении настроения, ощущении прилива сил, бодрости, повышении работоспособности, уменьшении потребности во сне.

Ранее амфетамины применялись для борьбы со сном во время несения боевых дежурств. В настоящее время широко применяются наркоманами под названием первитин или винт (смесь, получаемая сравнительно простым полусинтезом из эфедринсодержащих лекарственных средств).

Эфедрон – продукт деятельности «уличных» наркоманов. «Кайф» от приема эфедрона более примитивен и груб, чем при приеме амфетаминов, – он ограничивается подъемом настроения и приливом сил. Опьянение очень короткое – не более 30 минут. Эфедрон быстро вызывает слабоумие. Его считают плохим вариантом амфетамина.

Метилendioксипроизводные фенилалкиламина (МДА, МДМА) вызывают психическую зависимость средней и высокой силы и распространяются под названием «экстази».

Диметоксипроизводные ФАА (ДОБ, ДОХ) оказывают галлюциногенное действие, превосходящее в 100 раз по сравнению с 3,4-метилendioксиамфетамином. По наркотическому эффекту они приближаются к ЛСД (диэтиламид d-лизергиновой кислоты).

При отравлении производными фенилалкиламинов наблюдается возбуждение, затем тошнота, рвота, сердцебиение, потоотделение, бледность, подъем артериального давления. В тяжелых случаях артери-

альное давление напротив падает, наступает мерцание желудочков сердца, коллапс, отек легких, судороги, потеря сознания, смерть.

Поступление в организм производных фенилалкиламина происходит через желудочно-кишечный тракт, органы дыхания и инъекционным путем. Из места введения препараты быстро всасываются и немедленно начинают оказывать действие.

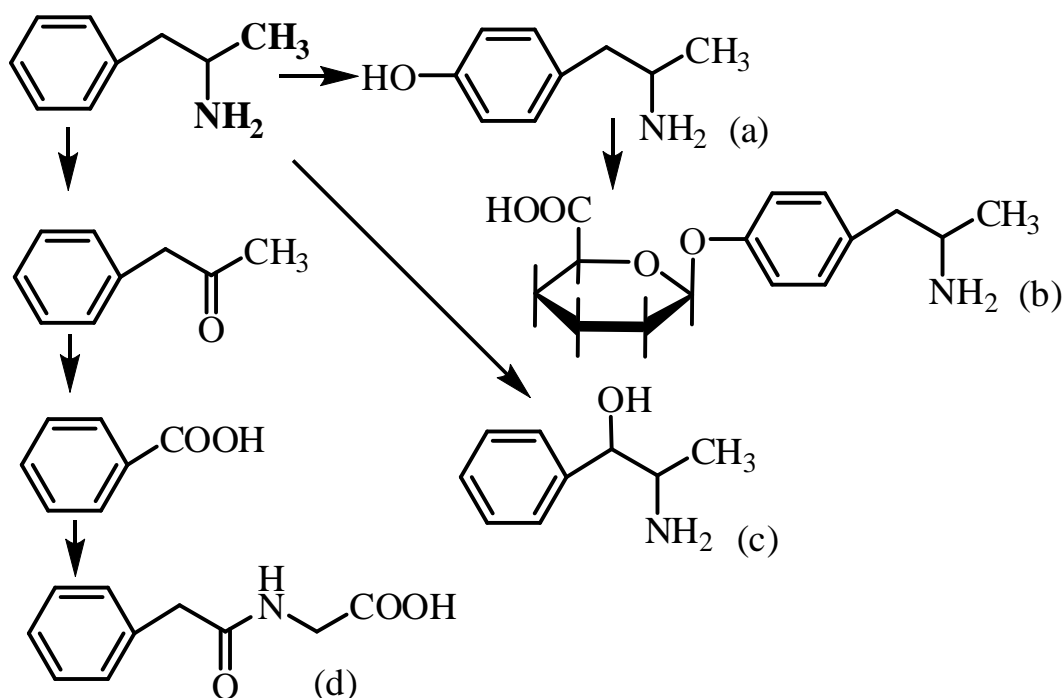
Основные фармакокинетические параметры производных фенилалкиламинов представлены в таблице 15.6.

Таблица 15.6

Основные фармакокинетические параметры производных фенилалкиламинов

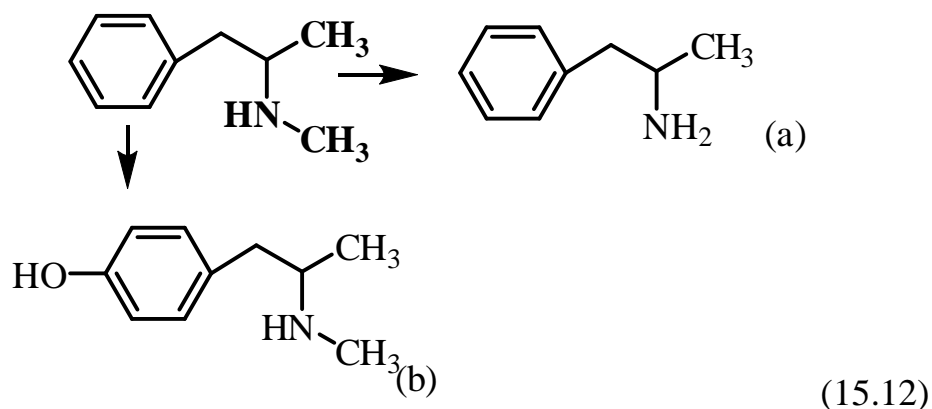
Соединение	pK_{BH^+}	Концентрация в плазме мг/л		$T_{1/2}$, дней	Выделение в неизменном виде, %
		C_{tox}	C_{let}		
Амфетамин	9,9	0,2-3,0	до 41,0	8-12	30-70
Метамфетамин	10,1	0,1-2,0	до 43,0	9	45
Норэфедрин	9,4			4	90
Эфедрин	9,6	0,15-10,0		3-11	55-75
Эфедрон	9,0	0,2-30,0		3-8	15-20

Основными метаболитами амфетамина являются 4-гидроксиамфетамин (а) и его глюкуронид (b), норэфедрин (с), продукты его окислительного дезаминирования, которые через ряд стадий превращаются в гиппуровую кислоту (d). Образуются также α -гидроксиамфетамин, фенилацетон и другие соединения.

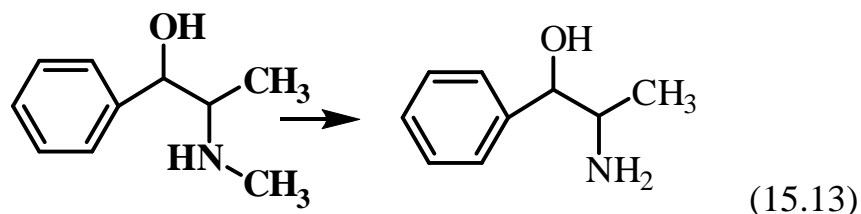


(15.11)

Метамфетамин метаболизируется до амфетамина (a) и 4-гидроксиметиламфетамина (b).

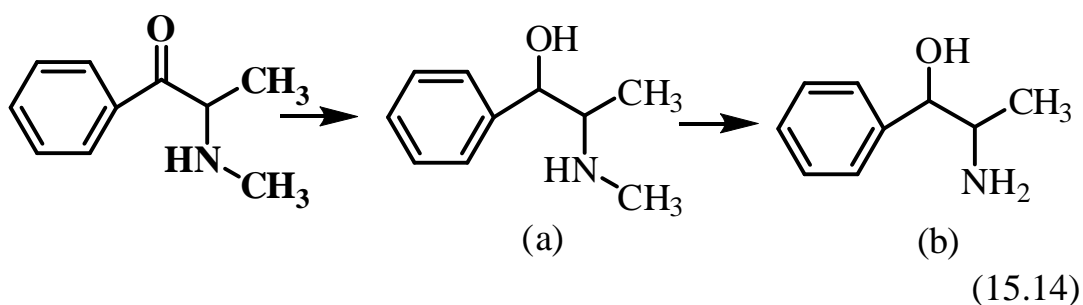


Основным метаболитом эфедрина является норэфедрин (фенилпропаноламин):



55–75% принятой дозы эфедрина выводится через 24 часа с мочой в неизменном виде.

Эфедрон в организме восстанавливается в эфедрин (a), который подвергается деметилированию с образованием норэфедрина (b).



Гидроксированные метаболиты с глюкуроновой и серной кислотами образуют конъюгаты.

Выведение фенилалкиламинов и их метаболитов осуществляется преимущественно с мочой, причем при кислом значении pH мочи максимален выход вещества в неизменном виде, а при щелочном – увеличивается выход метаболитов и снижается период полувыведения.

При отравлении производными фенилалкиламинов больному необходимо придать горизонтальное положение для разгрузки кровообращения и предупреждения ишемии головного мозга, следует поддерживать жизненно важные функции организма. После приема токсичной

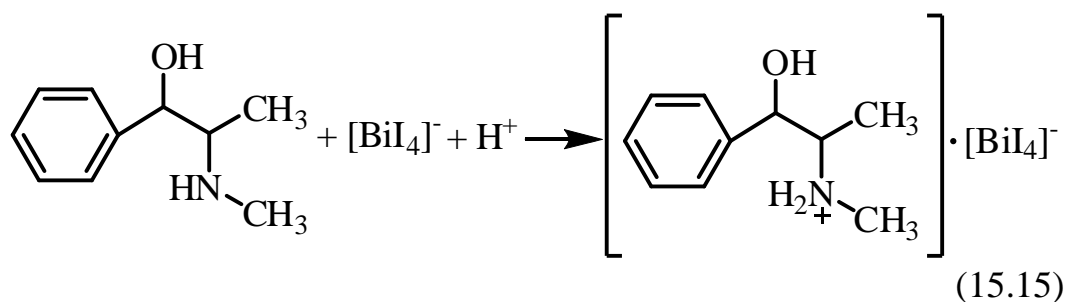
дозы внутрь необходимо вызвать рвоту и промыть желудок, а потом назначить сульфат натрия и активированный уголь.

15.3.2. Изолирование и определение производных фенилалкиламинов

Выбор метода изолирования зависит от вида объекта исследования (органы трупа или биожидкости). При исследовании трупных органов изолирование ФАА проводят полярными растворителями (подкисленным спиртом или подкисленной водой). Жидкость-жидкостная экстракция ФАА проводится хлороформом, эфиром или толуолом из щелочной среды (рН 8–10 при общем анализе и при рН = 12 при направленном анализе).

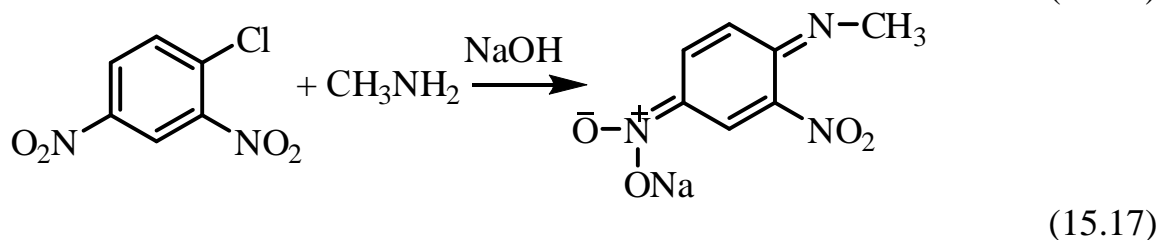
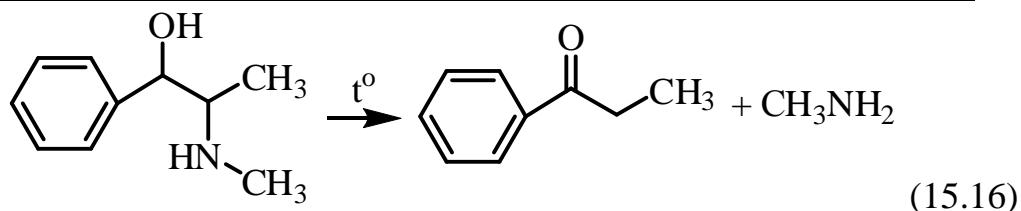
Обнаружение производных фенилалкиламина

Реакция эфедрина с реактивом Драгендорфа. Эфедрин образует характерные кристаллы с общеалкалоидными реактивами.



Методика выполнения реакции: 0,5 мл исследуемой органической фазы упаривают на предметном стекле досуха, сухой остаток растворяют в 1 капле 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, прибавляют каплю реактива Драгендорфа. При наличии эфедрина образуется осадок характерной окраски и с характерной формой кристаллов. Чувствительность реакции – 0,5 мкг эфедрина.

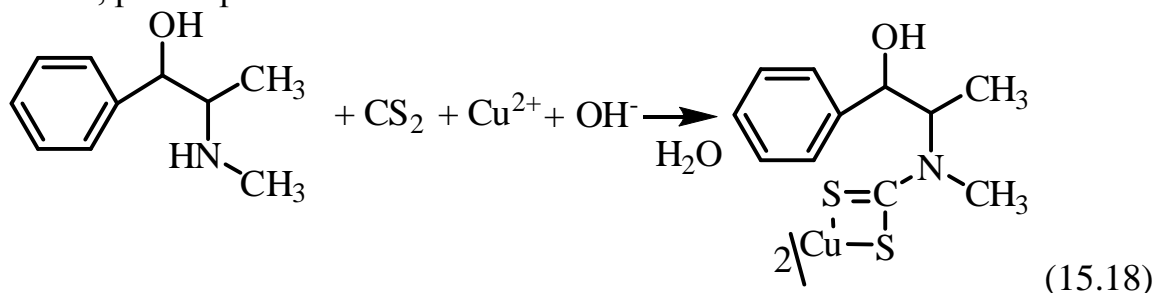
Реакции фенилалкиламинов с 2,4-динитрохлорбензолом. Эфедрин и другие соединения, имеющие ОН-группу в α-положении и аминогруппу в β-положении по отношению к ароматическому кольцу, при нагревании претерпевают гидраминное расщепление. При этом образуются фенилэтилкетон и амин. Последний при реакции с 2,4-динитрохлорбензолом образует соединение желтого цвета, экстрагирующееся хлороформом.



Методика выполнения реакции: к 1–2 каплям исследуемого раствора прибавляют каплю 5 М раствора NaOH и каплю 5% спиртового раствора 2,4-динитрохлорбензола, нагревают в течение 5 минут на водяной бане. При появлении желто-коричневой окраски к охлажденному раствору прибавляют 2–5 капель хлороформа и взбалтывают – наблюдают желтую окраску хлороформного слоя. Чувствительность реакции – 5 мкг эфедрина.

Реакция эфедрина с сульфатом меди и сероуглеродом.

При взаимодействии эфедрина с сероуглеродом и щелочным раствором сульфата меди образуется производное дитиокарбаминовой кислоты, растворимое в бензоле.



Выполнение реакции: в пробирку вносят каплю исследуемого раствора, подкисленного уксусной кислотой, прибавляют каплю 5% раствора сульфата меди (II) и раствор аммиака до щелочной реакции. Затем к полученному раствору прибавляют 2 капли смеси сероуглерода и бензола (1:3), взбалтывают. При наличии эфедрина бензольный слой приобретает коричневую или желтую окраску. Чувствительность реакции – 2 мкг эфедрина.

Реакции фенилалкиламинов с реактивами окрашивания.

При проведении реакций с реактивами окрашивания на предметное стекло помещают исследуемый раствор, прибавляют соответствующий реактив и через 1–2 минуты наблюдают аналитический эффект (таблица 15.7). Если реактив двухкомпонентный, то последовательно прибавляют первый и второй компоненты.

**Окраска продуктов реакции производных
амфетамина с различными реактивами**

	Нингидрин	Реактив Марки	Реактив Симона	Модифициро- ванный реактив Симона
Амфетамин	розовая	желтая	–	пурпурная
Метамфетамин	зеленая	желто- зеленая	голубая	–
Эфедрин	сине- фиолетовая	–	–	–
Эфедрон	фиолетовая	–	–	–

УФ- и ИК-спектметрия основана на исследовании спектральных характеристик анализируемых растворов (таблицы 15.4 и 15.5).

Тонкослойная хроматография. В качестве подвижных фаз используют:

- 1) бензол-этанол-диэтиламин (9:1:1);
- 2) толуол-этанол-триэтиламин (9:1:1);
- 3) хлороформ-ацетон-этанол- 25% раствор аммиака (20:20:3:1).

Неподвижная фаза – силикагель. Для проявления используют свежеприготовленный раствор нингидрина в ацетоне, реактив Драгендорфа.

ГХ-МС и ВЭЖХ используют для подтверждения результатов, полученных химическим методом и ТСХ. Прием дериватизации фенилалкиламинов (с трифторуксусным ангидридом) значительно улучшает результаты анализа, полученные методами ГХ и ГХ-МС.

При определении ФАА в моче *методом ВЭЖХ* изолирование ФАА проводят экстракцией бензолом из растворов с рН = 11 (используют 5% раствор гидроксида натрия). Затем бензольный экстракт упаривают в токе холодного воздуха. Сухой экстракт растворяют в подвижной фазе (смесь водного 0,2 М раствора ортофосфорной кислоты, метанола и диэтиламина в соотношении 75:20:1). Добавления диэтиламина улучшает форму пика и позволяет сократить время анализа. Используется хроматографическая колонка, заполненная обращенно-фазным сорбентом «Сепарон С-18».

Идентификация фенилалкиламинов производится сопоставлением времени (объема) удерживания и коэффициентов емкости определяемого компонента и образца сравнения (эталонный раствор) индивидуальных фенилалкиламинов, сравнением УФ-спектров предполагаемого компонента и образца сравнения. Значительное различие коэффициентов молярного поглощения эфедрона и других ФАА при 250 нм

позволяет проводить селективный анализ эфедрона в смеси с другими ФАА. Детектирование проводят при двух длинах волн: 210 и 250 нм. Если при 210 нм детектируются все ФАА, то при 250 нм наблюдается селективная чувствительность спектрофотометрического детектора к эфедрону и практическое полное отсутствие чувствительности к сопутствующим компонентам.

Количественное определение: ГЖХ, ВЭЖХ. Предложена также методика экстракционно-спектрофотометрического определения эфедрина с сульфатом меди и сероуглеродом. Оптическую плотность окрашенного в желтый цвет толуольного экстракта измеряют при 440 нм.

15.4. Каннабиноиды

Наркотические средства, полученные из различных листьев конопли, относятся к каннабиноидам (марихуана, гашиш, гашишное масло).

Марихуана (каннабис, «травка», «божья травка», «сено» и др.) – смесь высушенных верхушек с листьями и цветками. Содержание тетрагидроканнабинола (ТГК) колеблется в пределах 0,5–5%, хотя некоторые сорта конопли содержат 20–30% ТГК.

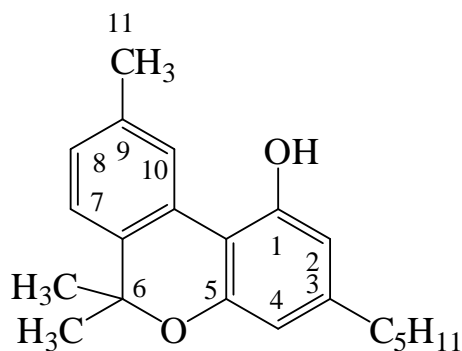
В марихуане содержится более 400 химических веществ, из которых 70 относятся к каннабиноидам.

К основным активным компонентам марихуаны относятся каннабинол, каннабидиол, изомеры тетрагидроканнабинола (Δ^9 -ТГК и Δ^8 -ТГК), а также Δ^9 (Δ^8)-тетрагидроканнабиноловые кислоты. Высокой активностью отличается Δ^9 -ТГК (в десять раз активнее каннабинола). Каннабидиол не обладает психоактивностью.

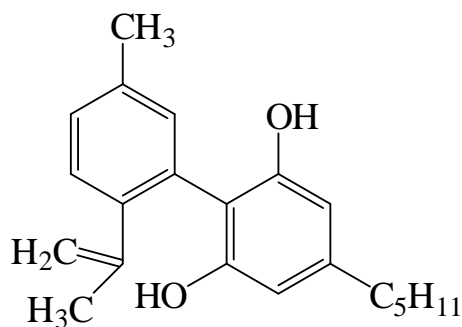
Используется марихуана как галлюциноген, обычно марихуану курят. Марихуану относят к «легким» наркотикам («тяжелый» наркотик – героин).

Гашиш (анаша, смола каннабиса, «чернушка» и др.) – смолы и пыльцы растения конопли, имеет цвет от зеленого до темно-коричневого. Содержание ТГК – от 2 до 9–10%.

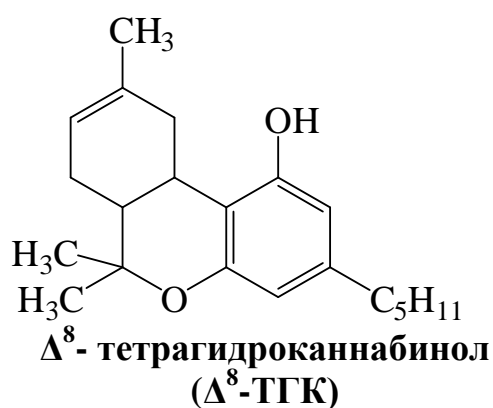
Гашишное масло (масло каннабиса, жидкий каннабис, «химка» и др.) получают экстракцией из частей растений конопли. В гашишном масле содержится 10–60% ТГК. Смесь с молоком или растительным маслом употребляют per os. На сигареты или табак наносят гашишное масло и курят.



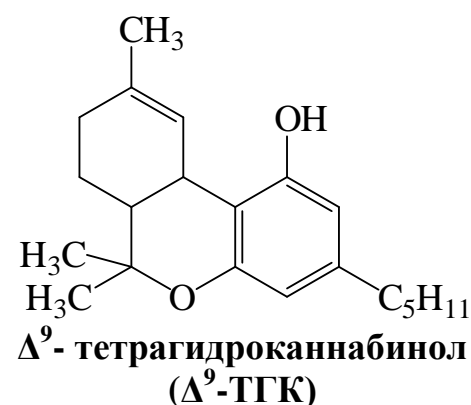
Каннабинол (КБ)



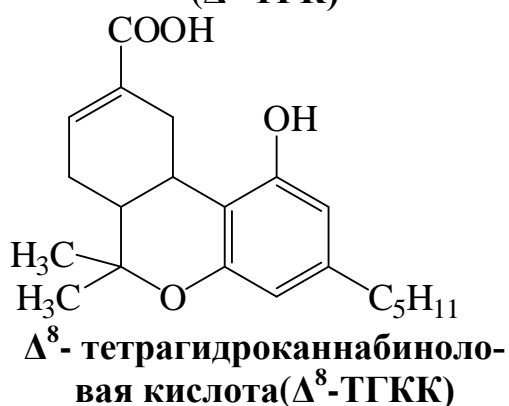
Каннабидиол (КБД)



Δ⁸-тетрагидроканнабинол (Δ⁸-ТГК)



Δ⁹-тетрагидроканнабинол (Δ⁹-ТГК)



Δ⁸-тетрагидроканнабиноловая кислота (Δ⁸-ТГКК)



Δ⁹-тетрагидроканнабиноловая кислота (Δ⁹-ТГКК)

15.4.1. Общая характеристика и токсикологическое значение каннабиноидов

Каннабиноиды хорошо растворимы в этаноле, ацетоне. Δ⁹-тетрагидроканнабиноловая кислота ограниченно растворима в хлороформе и диэтиловом эфире, практически нерастворима в воде, бензоле, петролейном эфире. Этанольные растворы Δ⁹-тетрагидроканнабинола и Δ⁹-тетрагидроканнабиноловой кислоты имеют характерные спектры поглощения в УФ-области с максимумами 283, 276 и 283, 278 нм соответственно.

Δ⁸-ТГК-кислота относится к слабым кислотам (pK_a = 10,6).

Действие гашиша в большей степени, чем других наркотиков, зависит от установки на ожидаемый эффект. Нередко человек, который выкуривает папиросу с гашишем, не зная об этом, может не испытывать эйфории. Лишь после 2–3-го раза возникает эйфория. Кроме того, первые пробы курения могут сопровождаться неприятными ощущениями: чувством сухости во рту и носоглотке, стеснения в груди, затрудненностью дыхания. Возможны учащенное сердцебиение, головокружение, звон и шум в ушах, тошнота и рвота. Настроение может быть подавленным или тревожным.

Опьянение, как правило, сопровождается приподнятым настроением. Смех возникает по любому поводу. Мышление утрачивает свою последовательность, начинает преобладать поверхностность ассоциаций. Общение в группе курящих носит формальный характер, заданные друг другу вопросы не находят ответа.

Состояние опьянения сопровождается вегетативными нарушениями (сухость во рту, блеск глаз, гиперемия склер, расширение зрачков). Длительность легкого опьянения зависит от дозы поступивших в организм каннабиноидов, продолжается от 30 мин до нескольких часов. По выходе из интоксикации возникает резкое чувство голода, которое, по-видимому, связано с гипогликемией, развивающейся во время гашишной интоксикации. В дальнейшем отмечаются усталость, повышенная сонливость.

В последующие 3–4 суток наблюдаются астения, эмоциональная лабильность, раздражительность, пониженный фон настроения. В некоторых случаях возникновению эйфории предшествует кратковременное состояние тревоги. Увеличение дозы гашиша приводит к смене эйфории страхом и растерянностью, появлению неудержимого и плохо контролируемого потока бессвязных мыслей, грубому нарушению восприятия времени и пространства.

При ежедневном или почти ежедневном курении гашиша уже через 1–2 месяца появляются признаки психической зависимости. В отсутствие наркотика у больных возникают вялость, сонливость, снижается настроение, мысли неотступно возвращаются к наркотическому средству и желанию покурить. Начинает расти толерантность. Количество папирос с гашишем, выкуренных за день, постепенно увеличивается (от 2–3 до 4–5 и более), употребляются все более крепкие его сорта и курение становится более интенсивным.

Особенностью ТГК является способность к кумуляции.

Физическая зависимость формируется через 2–3 года регулярного злоупотребления наркотиком. При длительном злоупотреблении каннабиноидами наблюдается снижение памяти и интеллекта.

Хроническое употребление препаратов конопли приводит к развитию соматических нарушений. У гашишеманов отмечается повышенный риск развития рака дыхательных путей, а также рождения детей с небольшой массой тела (при употреблении каннабиса во время

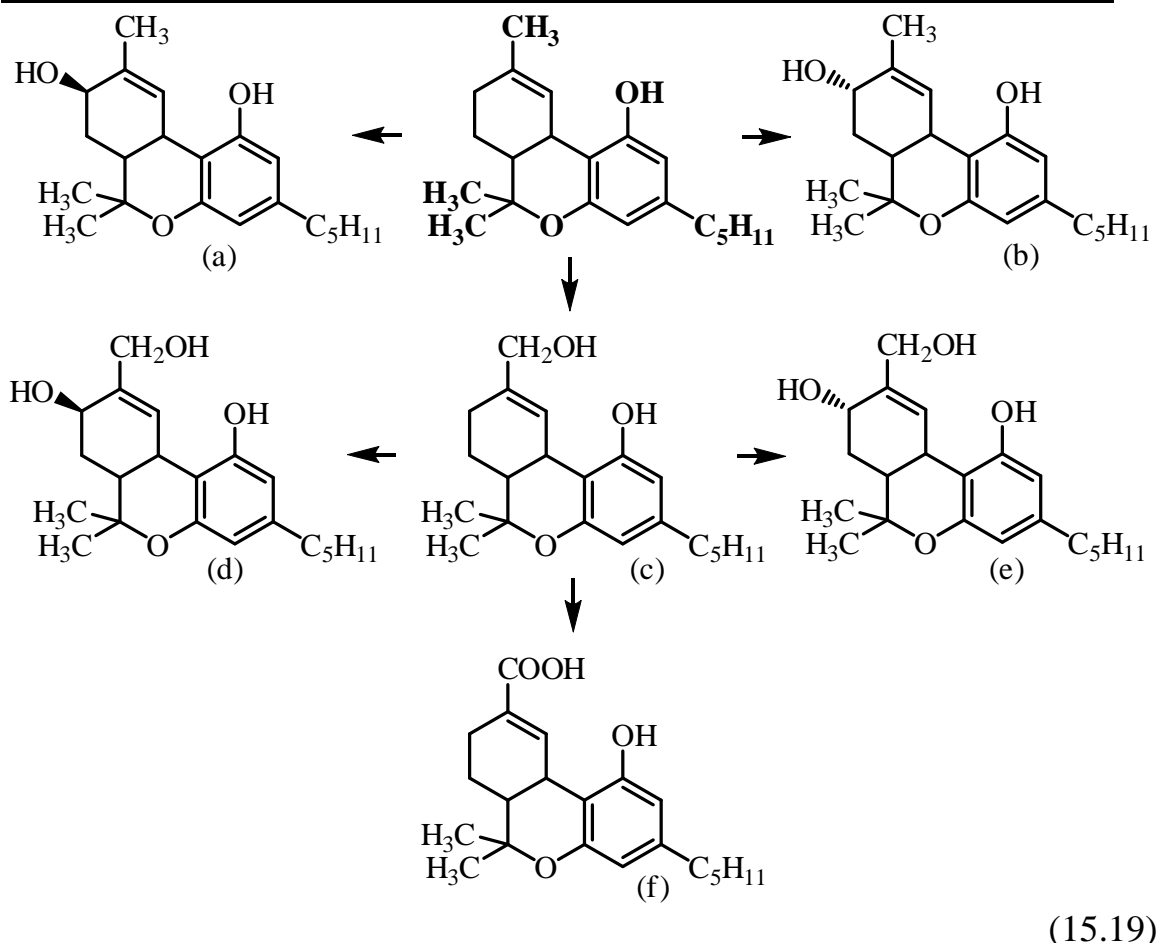
беременности). При курении марихуаны снижается внутриглазное давление. Однако побочные эффекты (гипертензия, тахикардия) не позволяют широко применять каннабис для лечения глаукомы.

Наиболее распространенный способ употребления конопли — курение. Этот наркотик употребляют и внутрь с пищей, напитками.

При курении каннабиноиды всасываются быстрее, чем при приеме внутрь. Фармакологическое действие наступает немедленно и достигает пика в пределах 30 мин. Определенных дозировок не существует, ибо дозы определяются качеством наркотика, числом затяжек, умением использовать вдыхаемый дым; имеют также значение местность, из которой привезен гашиш, и сорт конопли. О толерантности судят по числу выкуренных папирос.

Каннабиноиды хорошо растворяются в жирах и поэтому накапливаются в жировых тканях человека. Механизм действия их заключается в подавлении синтеза, освобождении и разрушении ацетилхолина. В конце 80-х и начале 90-х годов были открыты в головном мозге специфические рецепторы к каннабиноидам. Эти рецепторы распределены в разных участках мозга неодинаково. Большинство из них расположено в базальных ядрах, гиппокампе и коре головного мозга. Обнаружена некоторая связь между локализацией каннабиноидных рецепторов и действием каннабиса. Был открыт и эндогенный лиганд каннабиноидных рецепторов. Он действует подобно каннабиноидам, но действие его менее сильное и более кратковременное. Все эти данные позволили предположить существование особой "каннабиноидной" нейрохимической системы в головном мозге, аналогичной опиоидной системе.

Метаболизируются каннабиноиды в печени и легких. Метаболизм Δ^9 - тетрагидроканнабинола происходит с образованием 8β -гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола(a), 8α -гидрокси- Δ^9 - тетрагидроканнабинола (b), 11-гидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола (c), 8β , -11-дигидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола (d), 8α , -11-дигидрокси- Δ^9 -тетрагидроканнабинола(e), Δ^9 -тетрагидроканнабиноловой кислоты (f).



Выделение метаболитов происходит в основном с мочой, калом. Около 80–90% Δ^9 -тетрагидроканнабинола выводится за пять дней после приема, из них преимущественно 65% – с калом и 20% с мочой. С мочой выводятся преимущественно глюкурониды и сульфаты. С калом – Δ^9 -тетрагидроканнабинол и Δ^9 -тетрагидроканнабиноловая кислота, связанные с желчными и жирными кислотами. Метаболиты каннабиноидов выделяются также с секретом подчелюстных и молочных желез.

15.4.2. Изолирование и определение каннабиноидов

Ввиду высокой растворимости в липидах и низкой концентрации каннабиноидов в биологических жидкостях (кровь, моча) обнаружение каннабиноидов проводят в смывах с пальцев рук и ротовой полости курящих. Смывы производят ватным тампоном, смоченным этанолом. Затем каннабиноиды экстрагируют этилацетатом, гексаном или петролейным эфиром. Полученный экстракт исследуют методом ТСХ.

Исследование проводят в системе петролейный эфир – диэтиловый эфир (4:1) на пластинках «Силуфол». Проявляют хроматографические пятна 0,5% раствором прочного синего Б в 10% растворе карбоната натрия. Значения R_f хроматографических пятен каннабинола и тетрагидроканнабинола в этих условиях составляют около 0,76 и 0,84 со-

ответственно. Обнаружение каннабиноидов в смывах с рук не является основанием для заключения, что данное лицо курило гашиш (возможно случайное соприкосновение с гашишем).

Цветные тесты (предварительные пробы):

1) К аликвоте этанольного смыва добавляют смесь соли прочного синего Б с сульфитом натрия, 1 мл хлороформа и 1–2 капли 0,1 М раствора NaOH – появление красного окрашивания хлороформного слоя указывает на наличие каннабиноидов.

2) К аликвоте прибавляют 2 мл реактива (0,4 г ванилина растворяют в 20 мл 96% этанола и прибавляют 0,5 мл бензальдегида), встряхивают 1 минуту и прибавляют 2 мл концентрированной хлороводородной кислоты. После встряхивания оставляют на 2–5 минут, добавляют хлороформ и встряхивают. При наличии каннабиноидов появляется сине-фиолетовая окраска хлороформного слоя.

Обнаружение каннабиноидов в крови, моче, волосах проводят инструментальными методами анализа (ГЖХ, ГХ-МС и др.). При определении каннабиноидов в моче методами ГЖХ и ГХ-МС предварительно проводят щелочной гидролиз конъюгатов Δ^9 -ТГК-кислоты, экстракцию ТГК-кислоты и переводят ее в метиловый эфир. При анализе крови гидролиз не проводится, экстрагируют ТГК толуолом.

При определении каннабиноидов в слюне курильщика гашиша каннабиноиды экстрагируют этилацетатом. Экстракт упаривают до небольшого объема и исследуют методом ТСХ. Отрицательный результат не является основанием для вывода, что данное лицо не употребляло гашиш (следы гашиша сохраняются в полости рта до 1 часа, а на коже – до 24 часов).

Количественное определение. ГЖХ, ВЭЖХ.

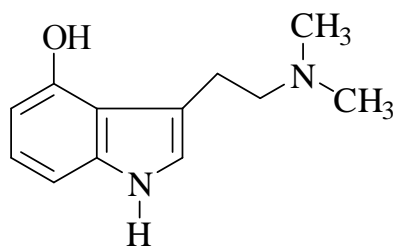
15.5. Галлюциногены

К веществам, обладающим галлюциногенной активностью, относятся как вещества растительного происхождения (псилоцин, псилоцибин, буфотенин, мусказон, мускарин, мусцимол и др.), так и синтетические препараты (ЛСД, фенциклидин, фенилалкиламины и др.).

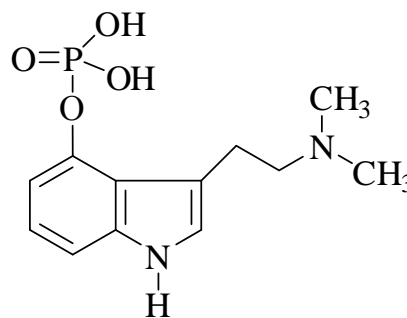
Псилоцин и псилоцибин содержатся в грибах рода *Psilocybe*, *Inocybe*, *Panaeolus* и др. В пересчете на сухой вес в грибе содержится от менее 0,004 до 0,2% псилоцина и от менее 0,08 до 0,3% псилоцибина. Содержание токсинов в грибах зависит от вида и мест произрастания грибов.

Основной способ приема таких галлюциногенов – употребление в пищу свежих или высушенных грибов, содержащих галлюциногены. Психические эффекты характеризуются зрительными и слуховыми галлюцинациями, расстройством мышления, беспричинным страхом и депрессией. Наблюдается деградация личности. В некоторых странах учащиеся школ и студенты употребляют псилоцибинсодержащие гри-

бы с целью повышения умственной деятельности. Однако при этом может развиваться психологическая (но не психическая) зависимость.

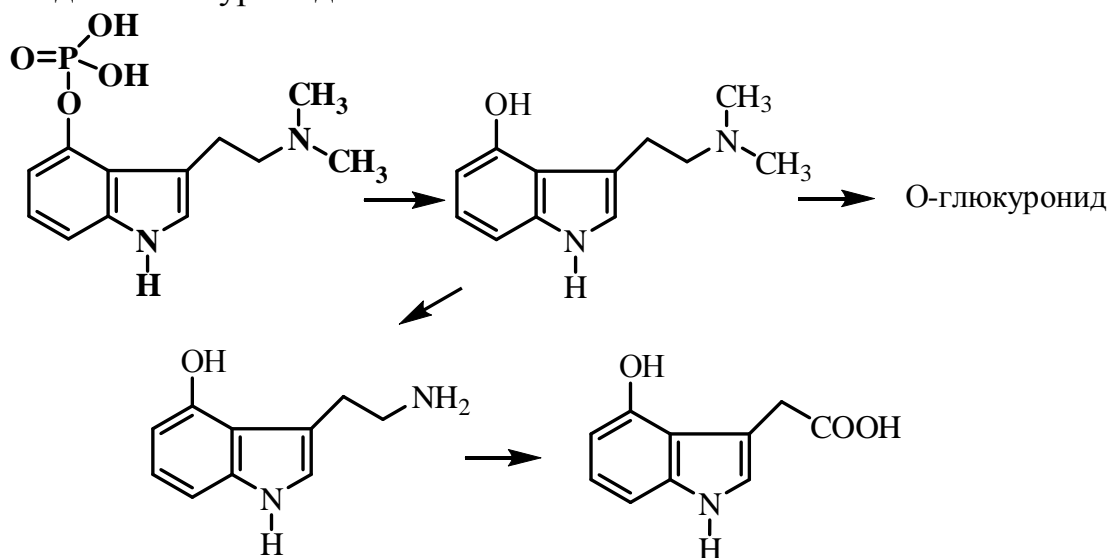


Псилоцин
(4-гидрокси-N,N-диметилтриптамин)



Псилоцибин
(4-фосфорилокси-N,N-диметилтриптамин)

В результате метаболизма псилоцибина разрушается сложноэфирная связь. Образующийся псилоцин подвергается деметилированию, дезаминированию и окислению. Выводится псилоцин, в основном, в виде О-глюкуронида.



(15.20)

Изолирование, обнаружение и количественное определение псилоцина, псилоцибина и других грибных токсинов.

Из биологической жидкости (5 мл крови, 50 мл мочи) грибные токсины извлекают равным объемом смеси хлороформ-этанол (4:1), хлороформный слой отделяют, испаряют, остаток растворяют в 1 мл этанола.

Из внутренних органов (50 г) извлечение грибных токсинов проводят 100 мл этанола в течение 2 часов. К центрифугату прибавляют по 100 мл воды и хлороформа, встряхивают. Хлороформный слой отделяют, испаряют и остаток растворяют в этаноле.

Для обнаружения псилоцина и псилоцибина используют реактив Драгендорфа и реакции окрашивания с 4-аминоантипирином, хлоридом железа (III) и др.

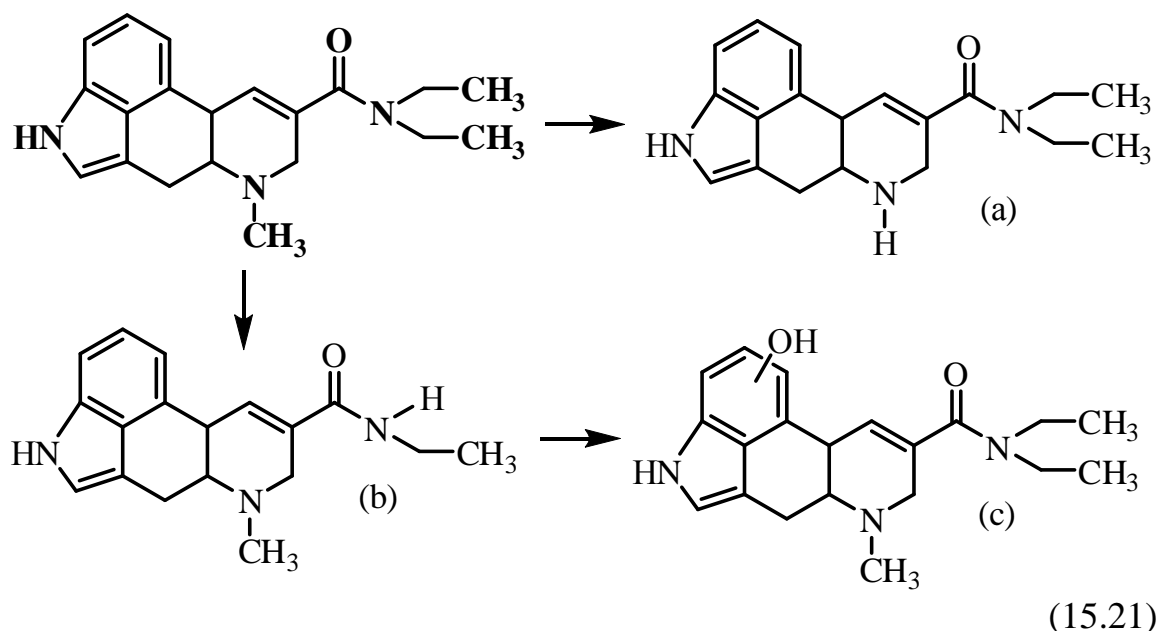
В качестве подвижной фазы в тонкослойной хроматографии (пластины «Силуфол») используют смесь хлороформ-метанол-5М уксусная кислота (35:14:1), реагенты – FPN, бромтимоловый синий и др.

УФ-спектрометрия (характерные полосы поглощения псилоцина и псилоцибина в области 266-292 нм), *ГХ-МС* и *ВЭЖХ* используются как для идентификации, так и для количественного определения псилоцина, псилоцибина и других грибных токсинов.

Диэтиламид лизергиновой кислоты (LSD, ЛСД) был синтезирован Хофманом в 1938 г. В качестве лекарственного средства не применяется, так как обладает сильной галлюциногенной активностью. 10–30 мкг ЛСД является минимальной действующей дозой.

Основной способ приема ЛСД – пероральный, так как ЛСД быстро проникает через гематоэнцефалический барьер и достигает мозга. $T_{1/2}$ составляет 3–5 ч. Применяется в виде порошков, таблеток, капсул и др.

Основные пути метаболизма ЛСД – деалкилирование (а, б) и образование гидроксипроизводных (с), которые взаимодействуют с глюкуроновой кислотой и в виде конъюгатов выводятся из организма с мочой. В моче обнаруживается около 1% ЛСД в неизмененном состоянии.



Изолирование и определение ЛСД.

Для изолирования ЛСД из биологических жидкостей чаще используют смесь растворителей «метиленхлорид-толуол». Реакции окрашивания проводят с остатком, полученным после испарения органических растворителей.

Основные реакции окрашивания: с реактивом Марки появляется коричневое окрашивание, переходящее в фиолетовое; с реактивом Ван-Урка (п-диметиламинобензальдегид, серная кислота и хлорид железа (III)) появляется фиолетовое окрашивание. Для обнаружения ЛСД применяются также реактив Фреде и концентрированная серная кислота.

Из *спектрометрических* методов для обнаружения ЛСД применяются УФ-спектрометрия (максимум поглощения в области 310-315 нм), ИК-спектрометрия, флуориметрия (растворы ЛСД обладают интенсивной флуоресценцией).

Тонкослойная хроматография: подвижные фазы – хлороформ-ацетон-этанол-25% раствор аммиака (20:20:3:1); толуол-ацетон-этанол-25% раствор аммиака (45:45:7:3); метанол-25% раствор аммиака (100:1,5) и др.; хроматографические пластины «Силуфол», фирмы Merck. Способы проявления хроматограмм: флуоресценция, реактив Эрлиха (п-диметиламинобензальдегид, концентрированная фосфорная кислота, метанол), реактив Драгендорфа.

Подтверждающие методы определения диэтиламида лизергиновой кислоты – *ВЭЖХ и ГХ-МС*.

Фенциклидин [1-(1-фенилциклогексил)-пиперидин] был предложен в 1957 г в качестве внутривенного анестезирующего средства. Однако развитие тяжелых психических нарушений (галлюцинации, дезориентация, путаница мыслей и др.) явилось причиной запрета на использование этого лекарственного средства в медицинской практике.

Фенциклидин синтезируется в подпольных химических лабораториях и распространяется в виде порошка, жидкости, таблеток, капсул. Применяется как перорально, так и используется для курения в смеси с табаком, марихуаной и растениями (петрушка, мята и др.), содержащими пахучие вещества. Фенциклидин вызывает у подростков более сильный эффект, чем LSD или марихуана. Нарушение восприятия окружающего и галлюцинации приводят к тяжелым последствиям (состояние паранойи, бред, тяжелые несчастные случаи на транспорте, совершение актов вандализма и др.).

При метаболизме фенциклидина происходит гидроксилирование пиперидинового (а) и циклогексанового (b) колец, а также разрыв пиперидинового кольца и образование 5-(1-фенилциклогексиламино)-валериановой кислоты (с). Основное количество фенциклидина выделяется из организма в виде конъюгатов с глюкуроновой кислотой. При биотрансформации фенциклидина, принятого в больших количествах, образуется синильная кислота, которая вносит определенные изменения в клиническую картину интоксикации (тошнота, рвота, боли в животе, судороги).

Смертельные концентрации фенциклидина в плазме крови колеблются от 0,3 до 12 мкг/л, острый интоксикационный психоз наблю-

дается в среднем при концентрации фенциклидина в плазме крови 0,6 мкг/л.

Изолирование фенциклидина из биологических жидкостей проводят методом ЖЖЭ (фенциклидин – слабое основание, $pK_{BH^+} = 8,5$).

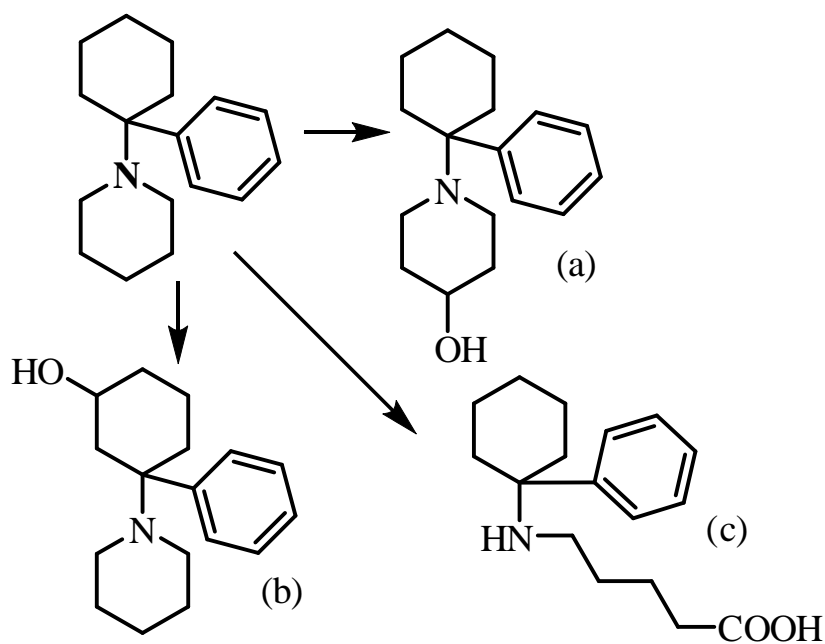
Для обнаружения фенциклидина используют реакции окрашивания и инструментальные методы.

Реакции окрашивания (проводят с сухим остатком): с реактивом Марки (розовое окрашивание), с реактивом Манделина (оранжевое окрашивание), с реактивом Эрлиха (красное окрашивание).

Тонкослойная хроматография: подвижные фазы – этилацетат-метанол-25% раствор аммиака (85:10:5), циклогексан-толуол-диэтиламин (75:15:10), хлороформ-метанол (9:1); неподвижная фаза – силикагель; реактив Драгендорфа.

УФ-спектр фенциклидина имеет три максимума поглощения в области 250-270 нм.

Подтверждающие методы определения фенциклидина – ГЖХ, ГХ-МС и ВЭЖХ.



(15.22)

ГЛАВА 16

ПЕСТИЦИДЫ

К группе токсических веществ, изолируемых из биоматериала при помощи неполярных или малополярных органических растворителей относятся вещества, применяемые в качестве ядохимикатов, средств бытовой химии, взрывчатых веществ и др. Наибольшее токсикологическое значение имеют ядохимикаты (или пестициды), которые находят широкое применение в сельском хозяйстве и в быту.

Ядохимикаты или пестициды (pestis – зараза, caedere – убивать) – вещества (или смесь веществ) химического или биологического происхождения, предназначенные для уничтожения или предотвращения развития вредных насекомых, грызунов, возбудителей болезней растений и животных, сорняков, а также используемые в качестве дефолиантов и десикантов.

Современные пестициды качественно отличаются от ядохимикатов, использовавшихся в сельском хозяйстве в XX в. Основные требования, предъявляемые к пестицидам:

- высокая биологическая активность;
- селективность действия на организм данного вредителя;
- нетоксичность для человека и домашних животных;
- быстрая инактивация под влиянием почвенных микроорганизмов.

При синтезе новых пестицидов не все требования выполняются. Большая часть применяемых в настоящее время пестицидов оказывает токсическое действие на людей, домашних животных. Отравления могут происходить при попадании ядохимикатов в пищевые продукты и воду, на кожу и слизистые оболочки, при вдыхании.

16.1. Классификация пестицидов

Различают следующие классификации ядохимикатов: по химической природе, по назначению (применению) и различные биологические классификации – по токсичности, по способности к кумуляции и др.

По химической классификации пестициды бывают:

- неорганические (сера, соли меди(II), ртути(II), оксид мышьяка (III), арсениты, хлораты, бораты щелочных металлов);

- органические (рис. 16.1);
 - металлоорганические (органические соединения ртути и олова).
- Неорганические пестициды имеют определенные недостатки:

- невысокая токсичность и, следовательно, высокая дозировка;
- отсутствие селективности;
- стойкость во внешней среде.



Рис. 16.1. Классификация органических пестицидов

Классификация пестицидов по назначению дана в таблице 16.1:

Таблица 16.1

Классификация пестицидов по назначению

Пестициды	Назначение
Акарициды	Уничтожают клещей
Антисептики	Против микроорганизмов, разрушающих неметаллические изделия
Бактерициды	Уничтожают бактерии
Гербициды	Уничтожают сорные растения: альгициды (для борьбы с водорослями); арборициды (уничтожение деревьев и кустарников)
Дефолианты	Ускоряют опадание листьев у растений
Десиканты	Высушивание надземных частей растений
Зооциды	Уничтожение вредителей из числа позвоночных: родентициды (уничтожение грызунов); ратициды (уничтожение крыс); авициды (для борьбы с птицами); ихтиоциды (уничтожение сорной рыбы)

Инсектициды	Убивают насекомых
Лимакиды	Для борьбы с вредными моллюсками
Нематоциды	Для борьбы с круглыми червями
Репелленты	Отпугивают насекомых
Фунгициды	Для борьбы с фитопатогенными грибами

В зависимости от путей поступления насекомых в организм инсектициды делят на 4 группы:

- Контактные инсектициды проявляют действие после контакта с насекомым;
- Кишечные инсектициды действуют на насекомых после их попадания в организм;
- Системные инсектициды попадают в насекомых из поедаемых ими растений, содержащих пестициды.
- Фумиганты попадают в организм насекомых через дыхательные пути.

Гербициды по характеру их действия делят на 3 группы: контактного, системного действия и действующие на корневую систему растений или на прорастающие семена.

Следует отметить классификацию по токсичности, в основу которой положено значение LD_{50} (т.е. дозы вещества, вызывающей гибель 50% подопытных животных – крыс, мышей и др.). Известны и другие классификации пестицидов по токсичности, так как токсичность веществ зависит от того, для какого организма она определяется и от пути попадания пестицида в организм.

Наиболее распространена следующая классификация:

I. **Особотоксичные пестициды** – LD_{50} менее 50 мг/кг: альдикарб ($LD_{50} = 0,93$ мг/кг), паратион (6–50), дихлофос (23–87), метафос (35) и др.

II. **Высокотоксичные** (50–200 мг/кг): линдан (25–200).

III. **Среднетоксичные** (200–1000 мг/кг): ДДТ (300), гептахлор (500).

IV. **Малотоксичные** (более 1000 мг/кг): карбофос (1400).

В основу другой токсикологической классификации положена летальная доза препарата (в расчете на 70 кг массы человека):

- **не токсичные** (летальная доза более 1000 г);
- **слаботоксичные** (500–1000 г);
- **среднетоксичные** (28–500 г);
- **очень токсичные** (4–28 г);
- **чрезвычайно токсичные** (0,5–4 г);
- **суперттоксичные** (менее 0,5 г).

Пестициды применяют в виде порошков, растворов в воде и органических растворителях, гранулированных препаратов, concentra-

тов, эмульсий, аэрозолей и фумигантов, приманок с пищевыми наполнителями для грызунов, смачивающихся порошков и др.

16.2. Общая характеристика пестицидов

Большинство пестицидов являются малополярными органическими веществами, в структуре которых нет способных к ионизации в водных средах (рН 2–9) функциональных групп. Поэтому для извлечения их из биологических объектов не требуется создание оптимальных значений рН среды. Невысокая полярность данных веществ позволяет использовать для их извлечения органические растворители – ацетон и его смеси с водой, гексаном, а также хлороформ, дихлорметан, диэтиловый эфир, гексан, бензол. После извлечения чаще всего не требуется проведения сложной очистки от белков и пептидов, поскольку последние не извлекаются малополярными органическими растворителями. Особенностью некоторых групп ядохимикатов является наличие атомов галогенов, фосфора, серы. Это позволяет использовать селективные детекторы в хроматографии – электронозахватный, термоионный, пламенно-фотометрический, атомно-эмиссионный детекторы.

Основными объектами судебно-химического исследования при отравлении ядохимикатами являются биологические жидкости и органы трупа, технические жидкости, а также пищевые продукты, образцы почвы и воды, растительного материала. При острых отравлениях – это моча, кровь, рвотные массы, промывные воды желудка. Высокая липофильность некоторых групп пестицидов (ХОС, ПХБ и др.) обуславливает накопление данных веществ в жировой ткани, а также, что наиболее опасно, в грудном молоке кормящих женщин. Эти объекты могут быть исследованы при хронических отравлениях.

16.3. Схема систематического анализа биологических жидкостей на основные группы пестицидов

Из биологических жидкостей хлорорганические соединения (ХОС), полихлорбифенилы (ПХБ), фосфорорганические пестициды (ФОП), пиретроиды, карбаматы экстрагируют эфиром, а из водной фазы после отделения эфирного слоя экстрагируют азотсодержащие гетероциклические гербициды производные симм-триазина смесью гексан-ацетон. Эфирный экстракт делят на части. На рис. 16.2 показан скрининг ХОС, ПХБ и пиретроидов. Для определения последних сухой остаток после упаривания эфира растворяют в гексане и аликвоту 3–5 мкл исследуют методом ГЖХ. Затем к сухому остатку после упаривания гексана прибавляют концентрированную H_2SO_4 для окисления органических веществ. При этом ХОС (ГХЦГ, альдрин, ДДТ и его метаболиты, а также ПХБ) не разрушаются и их экстрагируют гексаном.

После очистки гексанового экстракта от серной кислоты, ХОС определяют методом ГЖХ или ГХ-МС. После этого гексан опять упаривают и прибавляют смесь дихромата калия и серной кислоты (на схеме обозначение CrO_3) для окисления всех остальных органических веществ, кроме ПХБ. Затем опять проводят их экстракцию и определяют методами ГЖХ и ГХ-МС.

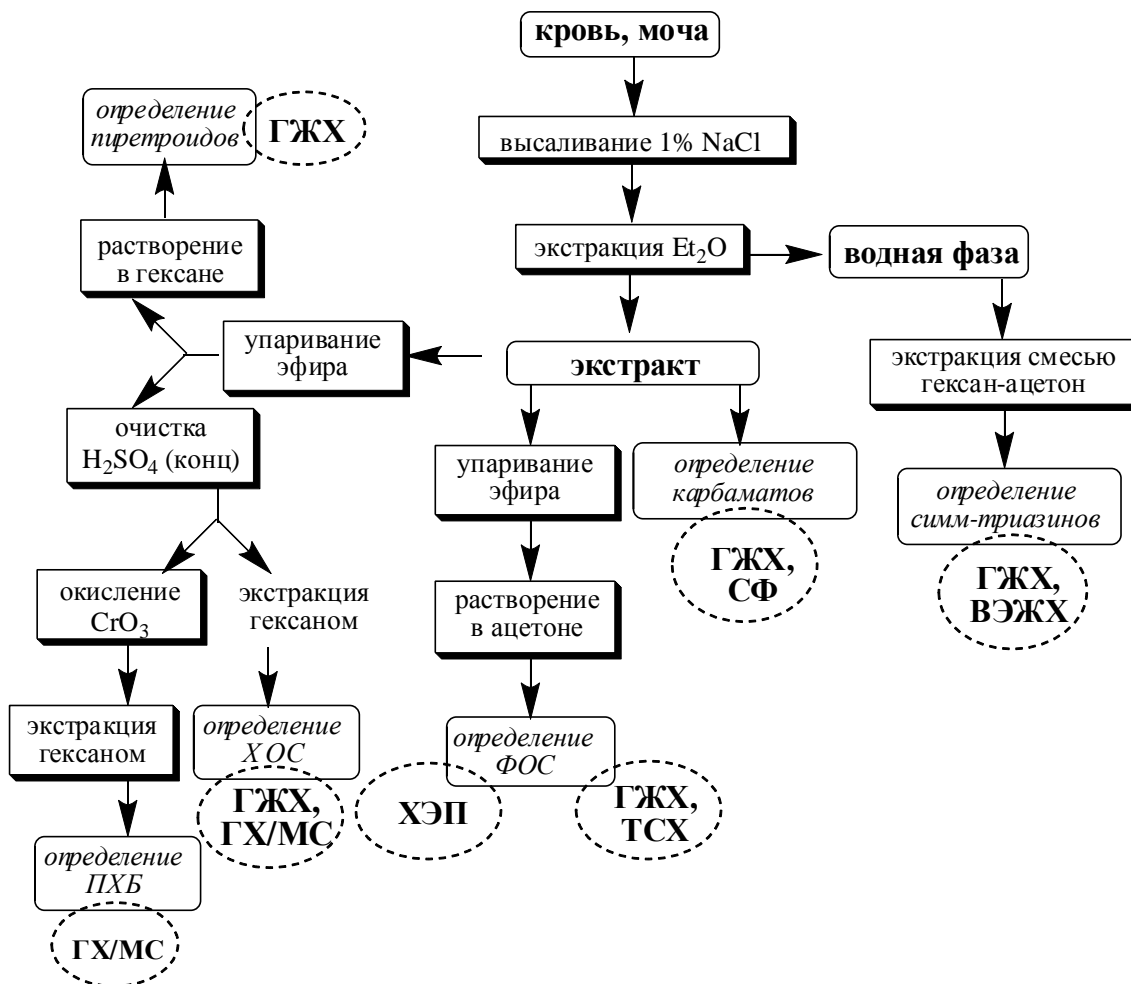


Рис. 16.2. Скрининг пестицидов

Исследование влияния природы экстрагента на экстракцию фосфорорганических, тиофенилкарбамидных, фенилкарбамидных и триазиновых пестицидов показали, что растворители по возрастанию степени извлечения располагаются в следующий ряд: предельные < непредельные < хлорпроизводные < ароматические углеводороды < простые эфиры < спирты < сложные эфиры. Предельные углеводороды сольватируют экстрагируемое вещество вследствие слабых ван-дерваальсовых взаимодействий и возможного образования слабых водородных связей. Непредельные углеводороды являются более эффективными экстрагентами, так как сольватирующее действие связано с возможным образованием π -связи. Хлорсодержащие углеводороды обладают повышенной экстракционной способностью в связи с образова-

нием водородной связи (хлороформ бывает часто более эффективен, чем тетрахлорметан). Высокая экстракционная способность ароматических углеводов связана с преимущественным образованием π -комплексов. Нитробензол лучше экстрагирует метафос и продукты его разложения, что можно объяснить образованием комплексов с переносом заряда. Эфиры, спирты растительные масла образуют достаточно прочные водородные связи с экстрагируемыми веществами, что обуславливает их высокую экстракционную способность.

Концентрирование пестицидов из воздуха. В воздухе пестициды могут присутствовать в виде паров, жидкого и твердого аэрозоля. Контроль за содержанием пестицидов в воздухе проводится с использованием хроматографических методов с предварительным концентрированием микроколичеств пестицидов. Отбор проб воздуха для определения пестицидов производят посредством пропускания исследуемого воздуха через различные электроаспираторы.

Основные методы концентрирования – абсорбция и адсорбция. Абсорбционное концентрирование проводится с использованием хлороформа, ацетона, этиленгликоля, диметилформамида, *n*-гексан и др. Для концентрирования хлорорганических пестицидов эффективен диметилформамид. В случае фосфорорганических пестицидов и N-метилкарбаматов используют раствор этиленгликоля в глицерине.

Предложен метод концентрирования пестицидов из воздуха с использованием твердых материалов (силикагель, стеклянная крошка или шарики, пористые полимеры) с нанесенными на них пленками, обладающими сорбционными свойствами. Такими свойствами обладают этиленгликоль, диэтиленгликоль, глицерин, олеиновая кислота и др.

Концентрирование пестицидов на твердых неорганических сорбентах, пористых органических полимерных сорбентах является более перспективным. Например, адсорбционная емкость силикагеля для хлорорганических пестицидов составляет $\sim 1,5$ мг/г и значительно больше, чем адсорбционная емкость стекла. Однако недостатками неорганических сорбентов являются гидрофильность и возможность химических превращений. При повышении влажности воздуха адсорбционная емкость силикагеля снижается.

Широко используются для концентрирования пестицидов из воздуха пористые и макропористые полимеры: хромосорбы 101–108, амберлиты, порапаки и др. Порапаки Q и S (сополимеры этилвинилбензола и дивинилбензола) используются для поглощения паров хлорорганических пестицидов, а полисорб С 60/100 – для сорбционного концентрирования из воздуха следовых количеств хлорированных углеводов, хлорфенолов и др.

Для поглощения аэрозолей пестицидов используют фильтры или стеклянные пористые пластинки. Бумажные фильтры «синяя лента», а также перхлорвиниловые и фильтры из ацетилцеллюлозы удовлетво-

ряют предъявляемым требованиям (не растворяться в органических растворителях и не содержать примесей, мешающих определению анализируемых веществ).

Концентрирование пестицидов из вод. При выделении пестицидов из вод используют методы экстракции, адсорбции и кристаллизации.

Неполярные хлорорганические пестициды, а также синтетические пиретроиды хорошо экстрагируются *n*-гексаном и петролейным эфиром.

Для концентрирования фосфорорганических пестицидов используют хлороформ или метиленхлорид, которые обеспечивают извлечение 80–95% пестицидов.

Предложено концентрирование пестицидов в системе жидкость-жидкость, в которой органический растворитель находится в фазе набухшего в нем сополимера стирола с дивинилбензолом сетчатой структуры. Воду пропускают через колонку, заполненную набухшим в бензоле сополимером стирола с дивинилбензолом. Элюирование поглощенных пестицидов производят бензолом. Такое динамическое экстракционное концентрирование используется при определении хлор- и фосфорорганических пестицидов, хлоралканкарбоновых и хлорфеноксисалаканкарбоновых кислот, хлор- и нитрофенолов и др.

Предложены также сорбционные варианты извлечения ядохимикатов из биологических жидкостей. Для адсорбционного концентрирования пестицидов используют активные угли и синтетические иониты. Пористые полиуретаны используют для концентрирования хлорорганических пестицидов (линдан, алдрин и др.) и полихлорированных бифенилов. Элюирование поглощенных соединений проводят последовательно ацетоном и гексаном. Для экспрессного определения пестицидов в воде водоемов санитарно-бытового назначения воду пропускают через патрон с полисорбом. Элюирование поглощенных пестицидов проводят ацетоном, ацетонитрилом, этилацетатом или смесью ацетона и уксусной кислоты. Степень извлечения пестицидов составляет 80–95%.

Для извлечения используют чаще всего химически модифицированные кремнеземы с привитыми алкильными группами, а также сополимеры стирола и дивинилбензола. Особо следует отметить появившиеся в последние годы работы по использованию метода твердофазной микроэкстракции для пробоподготовки при газохроматографическом анализе пестицидов, в частности, ХОС, ПХБ.

16.4. Схемы изолирования некоторых групп пестицидов из биологических тканей

Основным отличием схем изолирования органических веществ из биотканей (органов) от изолирования из биологических жидкостей является наличие стадии настаивания (извлечения) веществ из твердых тканей печени, почки и др. В качестве извлекателей, как правило, используются малополярные или полярные органические растворители, однако, для изолирования отдельных веществ (хлорофос и др. ФОП) используют водно-ацетоновые смеси. После настаивания вытяжки подвергают очистке от жиров и др. эндогенных веществ методами грубой очистки – вымораживание, фильтрование. Для тонкой очистки используют несколько вариантов:

1. Очистка в системе гексан (ГК)–ацетонитрил (MeCN) применяется при изолировании ФОП, пиретроидов.

2. Сорбционная очистка может включать как адсорбцию целевых компонентов (сорбенты – активированный уголь, ХМК и др.) с последующим элюированием ядохимикатов, так и адсорбцию балластных веществ (полярные сорбенты – силиоксид, диатомиты и др.).

3. Очистка методом ТСХ.

4. Очистка с использованием концентрированной серной кислоты (для ХОС).

5. Микровозгонка в вакууме (некоторые ФОП).

6. Перегонка с водяным паром (ГХЦГ).

После очистки извлечений проводится экстракция (или элюирование) ядохимикатов при помощи органических растворителей или их смесей. Органический экстракт затем упаривают на роторном испарителе (в вакууме), поскольку ФОС, пиретроиды и некоторые другие группы пестицидов легко разлагаются при нагревании в присутствии кислорода или гидролизуются. Затем сухой остаток растворяют в подходящем растворителе и анализируют.

Рассмотрим несколько схем выделения фосфорорганических пестицидов, пиретроидов и ХОС из биологического материала.

На рис. 16.3 показано извлечение фосфорорганических пестицидов из биологических тканей.

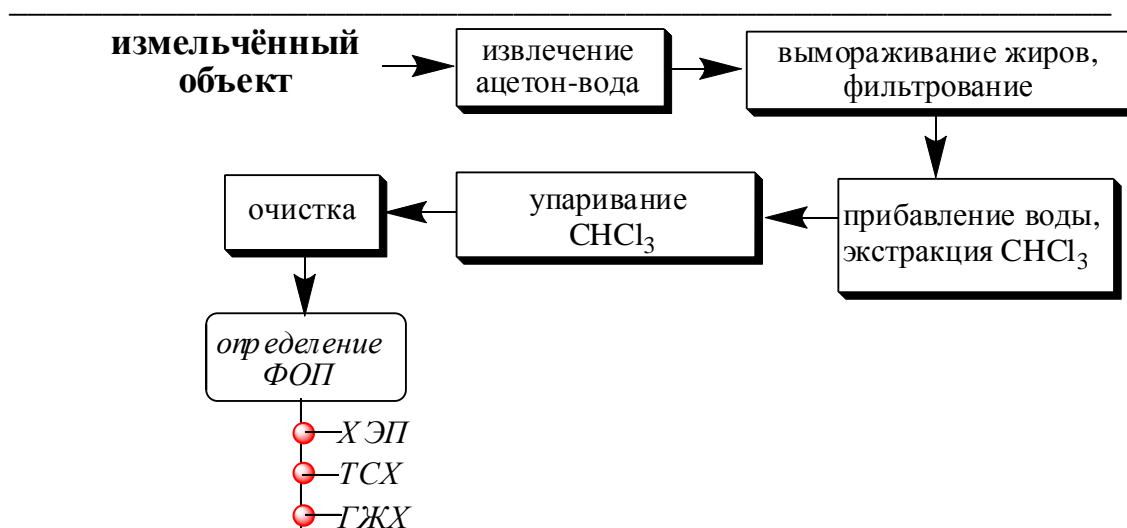


Рис. 16.3. Извлечение ФОП из биологических тканей

Схема извлечения ФОП включает настаивание измельченного органа со смесью ацетон-вода (есть варианты – ацетон-гексан, дихлорметан, ацетон, ацетонитрил (см. ниже), вымораживание жиров, экстракцию хлороформом или гексаном, проведение дополнительной очистки (если необходимо) и анализ.

Похожая схема используется и для изолирования синтетических пиретроидов. Для извлечения используют хлороформ, затем проводят очистку от жиров, экстракцию гексаном, очистку экстракта от эндогенных веществ активированным углем и анализ.

Несколько сложнее проводится извлечение ХОС и ПХБ из жировой ткани. Вначале образец растирают с безводным сульфатом натрия, проводят извлечение гексаном, затем экстракт очищают при помощи концентрированной серной кислоты, отмывают экстракт от серной кислоты, сушат, упаривают и проводят анализ.

16.5. Методы определения пестицидов, выделенных из биоматериала или экологических проб

Для достоверного определения выделенных из биоматериала ядохимикатов в основном применяют два метода – один для обнаружения (например, ТСХ, холинэстеразная проба, иммуноферментный анализ), второй – для подтверждения и количественного определения. Второй метод должен быть более селективным и чувствительным, чем первый. Это чаще всего ГЖХ с селективными детекторами, ГХ-МС, реже фотометрия и ВЭЖХ. При анализе технических жидкостей используют также химический метод – элементный анализ и качественные реакции.

Химические методы определения пестицидов. Эта группа методов включает элементный анализ (обнаружение атомов галогена, серы, фосфора или азота в органических веществах) и реакции обнару-

жения (реакции на функциональные группы, реакции окрашивания с концентрированными кислотами или щелочами, реакции, используемые для проявления пестицидов после ТСХ-разделения). Химические методы чаще всего используют при анализе неизвестных образцов технических препаратов ядохимикатов, значительно реже – при судебно-химическом исследовании органов трупа (очевидно, из-за невысокой чувствительности и селективности этих методов).

Элементный анализ основан на разрушении молекулы органического (или элементарного) вещества при действии различных химических (щелочные металлы, оксиды металлов, концентрированные кислоты и др.) и физических (нагревание) воздействий с последующим обнаружением соединения, содержащего анализируемый элемент.

По результатам элементного анализа можно определить групповую принадлежность пестицида. Например, если обнаружено наличие фосфора и доказано отсутствие хлора, то можно сделать вывод, что данный ядохимикат не относится к хлорорганическим соединениям, а относится к органическим соединениям фосфора.

Соединения, которые подвергаются элементному анализу должны быть достаточно чистыми, перед проведением анализа их следует освободить от примесей.

Обнаружение фосфора складывается из двух этапов: минерализация (разрушение молекулы исследуемого вещества и перевод фосфора в PO_4^{3-}) и обнаружение PO_4^{3-} в минерализате.

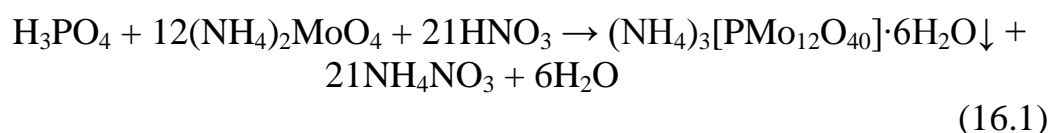
Известно несколько способов минерализации, используемых при обнаружении фосфора:

Минерализация с СаО: в платиновый тигель вносят немного СаО и несколько капель раствора исследуемого вещества. Смесь нагревают до выпаривания жидкости. Если анализируют твердое вещество, то его вносят в тигель и прибавляют СаО. После этого тигель постепенно нагревают на небольшом пламени газовой горелки, затем увеличивают пламя и продолжают нагревать до красного каления тигля. Затем тигель охлаждают и его содержимое растворяют в нескольких миллилитрах 2 М раствора азотной кислоты.

Минерализация с карбонатом и пероксидом натрия: в платиновый или никелевый тигель вносят немного смеси, приготовленной из 0,2 г безводного Na_2CO_3 и 0,5 г Na_2O_2 , и небольшое количество исследуемого вещества (либо несколько капель раствора или вытяжки). Тигель осторожно нагревают до испарения жидкости. Затем увеличивают пламя и нагревают до расплавления смеси. Затем тигель охлаждают, его содержимое переносят в небольшую фарфоровую чашку, прибавляют немного карбоната натрия, 10 мл воды. Смесь тщательно растирают.

Перед обнаружением фосфат-ионов в минерализате из него необходимо предварительно удалить ионы AsO_4^{3-} , которые дают сходные реакции и мешают проведению анализа. Для этого минерализат подкисляют хлороводородной кислотой до $\text{pH} \sim 0,5$ и пропускают сероводород. Образовавшийся осадок ($\text{As}_2\text{S}_3 + \text{S}$) отфильтровывают. Арсенат-ионы можно также перевести в арсенит-ионы (добавлением сульфита натрия), которые не мешают обнаружению фосфата.

Для обнаружения фосфат-ионов используют реакцию образования молибденовой сини:



К образовавшемуся осадку жёлтого цвета (соль фосфорно-молибденовой гетерополикислоты) добавляют восстановитель (бензидин, аскорбиновая кислота и т.п.). Соль фосфорно-молибденовой кислоты легко реагирует с восстановителями с образованием молибденовой сини $\text{MoO}_3 \cdot \text{Mo}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Обнаружение азота: исследуемое соединение минерализуют сплавлением с металлическим натрием или калием по Лассеню. Цианид-ионы обнаруживают по реакции образования берлинской лазури или бензидиновой сини.

Если в молекуле вещества присутствуют одновременно азот и сера, то при минерализации образуются роданид-ионы, которые можно обнаружить по реакции образования красного роданида железа (III).

Обнаружение серы: при сплавлении исследуемого вещества со щелочными металлами образуются ионы S^{2-} , которые затем обнаруживают реакциями с хлоридом кадмия(II), нитропруссидом.

При сплавлении исследуемого вещества со смесью карбоната и пероксида натрия сера, входящая в состав его молекулы, окисляется до сульфат-иона, который можно затем обнаружить с солями бария.

Обнаружение хлора: органически связанный хлор переводят с помощью различных реагентов в ионное состояние и затем обнаруживают его в минерализате реакцией с нитритом серебра.

Для перевода хлора, содержащегося в молекуле исследуемого вещества, в хлорид-ион используют:

- сплавление с металлическим натрием или калием;
- взаимодействие с натрием и этанолом;
- нагревание со смесью азотной и серной кислот;
- нагревание со смесью дихромата калия и серной кислотой и др.

Химические реакции качественного обнаружения ядохимикатов в настоящее время актуальны при визуализации разделенных соединений на пластинах ТСХ. Среди наиболее употребляемых реактивов сле-

дует отметить *o*-толидиновый реактив (проявление ФОП), аммиачный раствор нитрата серебра с последующим облучением УФ-светом (проявление ХОС, синтетических пиретроидов, группы 2,4-Д и др.).

Широкое использование хроматографических методов в анализе пестицидов требует более подробного их рассмотрения.

1. **ТСХ**-анализ состоит из следующих этапов: нанесение пробы и стандартных веществ на пластину, элюирование (разделение) в камере с подвижной фазой, высушивание пластины, проявление разделенных компонентов, расчет величин удерживания (R_f), идентификация веществ. В качестве подвижных фаз для разделения ядохимикатов в тонких слоях силикагеля используют смеси органических растворителей: гексан-ацетон в различных соотношениях, толуол-ацетон, смеси хлороформа, гексана, ацетонитрила и др. Как уже отмечалось, для проявления ХОС, пиретроидов используют раствор нитрата серебра с последующим облучением УФ-светом. Для проявления ФОС используют обработку бромфеноловым синим и раствором лимонной кислоты, а также *o*-толидиновый реактив.

2. **ГЖХ**. Ядохимикаты в большинстве своем являются высококипящими жидкостями или твердыми веществами, поэтому для их разделения в ГХ используют термостойкие НЖФ – силиконовые фазы, реже – эфиры полиэтиленгликоля или ПЭГ-20000. В таблице 16.2 приведены некоторые типичные условия ГХ-определения некоторых ядохимикатов.

Таблица 16.2

Условия газохроматографического определения некоторых пестицидов

Пестициды	НЖФ	Температурный режим	Детектор	Предел обнаружения
ХОС	OV-17, SE-30	180-220°C	ДЭЗ, ДПР	10^{-13} г в пробе (γ-ГХЦГ)
ПХБ	OV-17, SE-30 (капиллярная)	230-270°C (чаще программирование температуры)	МС, ДЭЗ	10^{-14} г в пробе
Синтетические пиретроиды	OV-17, OV-1	250-280°C	ДЭЗ, ДПР, МС	10^{-11} г в пробе (карате)
ФОС	SE-30, OV-225, OV-210	150-200°C	ДТИ, МС, ПФД	10^{-13} г в пробе (метафос)

16.6. Фосфорсодержащие пестициды

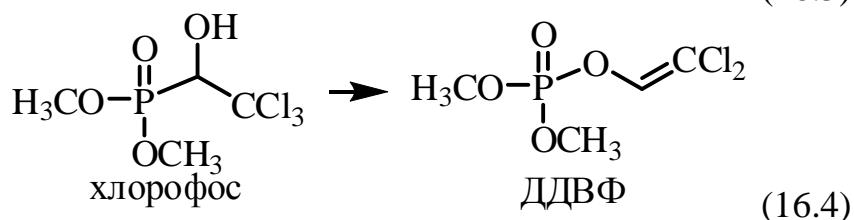
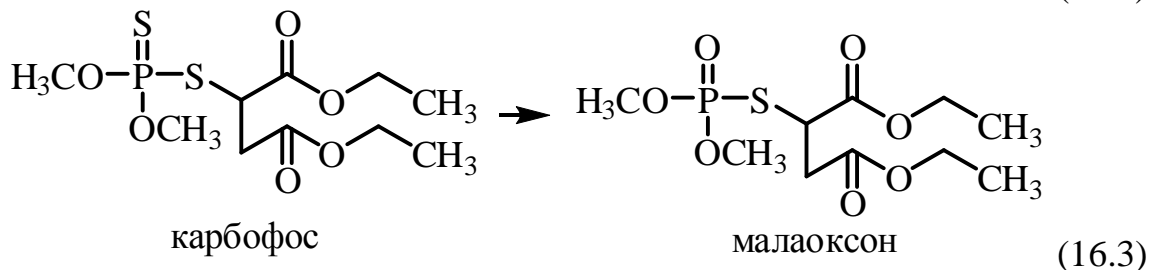
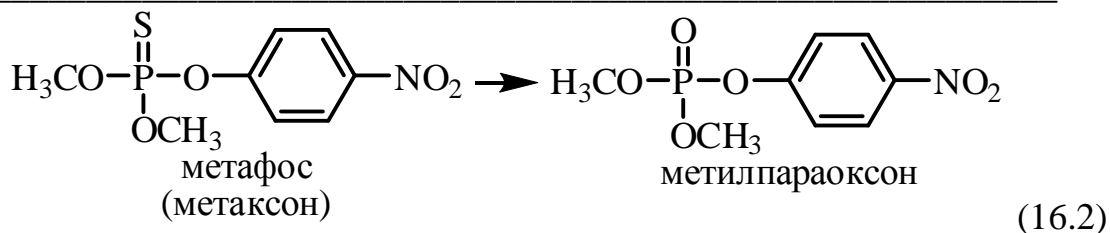
Фосфорсодержащие органические пестициды (ФОП) являются одним из наиболее важных классов современных ядохимикатов. Они применяются в качестве инсектицидов, гербицидов, фунгицидов, дефолиантов, акарицидов, нематоцидов и др. Эти соединения отличаются высокой активностью при умеренных нормах расхода, широким спектром действия на вредителей, относительно быстрым разрушением в окружающей среде с образованием нетоксичных продуктов. В зависимости от химического строения их можно разделить на две группы: фосфорорганические соединения (атом фосфора непосредственно связан с атомом углерода) и органические соединения фосфора (атом фосфора связан с атомом углерода через кислород, серу и др.).

ФОП представляют собой либо твёрдые кристаллические вещества (хлорофос, метафос и др.), либо прозрачные бесцветные или желтовато-коричневые маслянистые жидкости, имеющие неприятный специфический запах (ДДВФ, карбофос, трихлорметафос и др.). Хорошо растворимы в неполярных органических растворителях и плохо растворимы в воде (хлорофос и некоторые другие вещества хорошо растворимы в воде). Благодаря хорошей жирорастворимости легко проникают через неповрежденную кожу, различные мембраны, гематоэнцефалический барьер.

Под действием факторов окружающей среды многие ФОП могут превращаться в более активные и токсичные продукты. Например, при 35 °С за 1 сутки токсичность метилмеркаптофоса увеличивается в 30 раз. Большинство ФОП в почве, растениях и других объектах окружающей среды разлагается в течение нескольких недель.

ФОП могут проникать в организм через рот, кожу, дыхательные пути. При поступлении *per os* всасывание начинается уже в полости рта и продолжается в желудке и тонком кишечнике. Всосавшиеся вещества быстро проникают в системный кровоток, попадают во все органы и ткани, где распределяются равномерно. Несколько более высокие концентрации могут наблюдаться в почках, печени, лёгких, кишечнике.

ФОП в организме преимущественно в печени полностью или в значительной степени подвергаются метаболизму. Они вступают в реакции окисления (окислительной десульфурации, О-дезалкилирования, N-дезалкилирования, гидроксирования, дегидрохлорирования), гидролиза, конъюгации. Метаболизм некоторых ФОП в организме протекает по типу летального синтеза (например, метаболиты метафоса (метилпараоксон) и карбофоса (малаоксон) в 10 тысяч раз более токсичны).



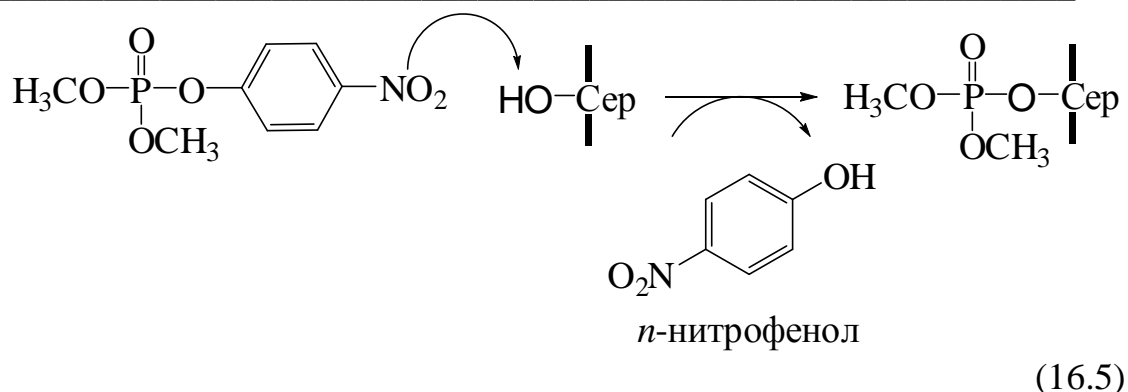
Основной способ детоксикации ФОП – ферментативный гидролиз. В результате гидролиза образуются водорастворимые вещества, удаляемые почками. В процессе гидролиза ФОП принимают участие фосфатазы, карбоксилэстеразы, карбоксиламидазы и другие ферменты. Продукты ферментативного гидролиза могут образовывать конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотами, глутатионом.

Метаболиты ФОП выделяются с мочой, неизменённые вещества могут выделяться через дыхательные пути, а также с мочой.

Высокая токсичность ФОП объясняется угнетающим действием ФОП на ферментные системы человека и животных. Особенно важным в механизме действия ФОП на организм человека является ингибирование фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Фермент ацетилхолинэстераза катализирует процесс разрушения ацетилхолина. ФОП фосфорилируют активные центры АХЭ, в результате чего она теряет способность регулировать процессы разложения ацетилхолина, что приводит к нарушению ряда функций организма.

Активный центр ацетилхолинэстеразы состоит из анионной группы $-\text{COOH}$, которая реагирует с четвертичной аммониевой группой в молекуле ацетилхолина, и реакционного участка, осуществляющего гидролиз сложноэфирной связи. В состав реакционного участка входит $-\text{OH}$ группа остатка серина, нуклеофильные свойства которой усиливаются имидазольным кольцом гистидина.

ФОП фосфорилируют $-\text{OH}$ группу, входящую в состав активного центра ацетилхолинэстеразы:



Фосфорилирование ацетилхолинэстеразы протекает в несколько стадий: образование обратимого комплекса ингибитора с ферментом (доли секунды), фосфорилирование с образованием прочно фосфорилированного фермента (1–2 часа), необратимое угнетение каталитической функции фермента (4–5 часов).

Токсическое действие ФОП на организм человека проявляется следующими симптомами: судороги; беспокойство и тревога; угнетение дыхательного центра; обильное потоотделение; слезотечение; бронхорея; спазм гладкой мускулатуры бронхов, кишечника; рвота; миоз; брадикардия; периферические параличи.

Симптомы отравления обнаруживаются уже через 10–15 мин, что свидетельствует о быстром поступлении хлорофоса в кровь.

Описаны случаи смертельного отравления людей. При этом через 20–30 минут после приема хлорофоса наблюдались миоз, слюнотечение, бледность, цианоз, непровольное отделение мочи и кала, клонические и тонические судороги, помрачнение сознания, понижение артериального давления, явления бронхоспазма, сухой кашель, хрипы в легких, клочущее дыхание и др. Летальный исход в большинстве случаев наблюдается в течение первых суток, но описаны случаи смерти на 4-е и 6-е сутки.

Лечение отравлений ФОП: промывание желудка (при пероральном отравлении); форсированный диурез, гемосорбция, гемодиализ, перитонеальный диализ; введение М-холиноблокаторов; реанимационная и симптоматическая терапия.

Методы изолирования ФОП из биологических жидкостей и тканей. Выбор метода изолирования ФОП зависит как от вида биологического материала, так и от химической структуры и свойств ФОП. Основными растворителями для извлечения ФОП из биологических тканей и органов является извлечение полярными органическими растворителями – ацетоном, ацетонитрилом и др. Одной из интенсивных методик изолирования ФОП заключается в гомогенизации 10 г образца, смешивании его с силоксидом и извлечении ФОП ацетонитрилом. Полученное извлечение фильтруют и смешивают с водным раствором сульфата натрия и ФОП экстрагируют дихлорметаном. После упарива-

ния экстрагента проводят анализ, либо, при необходимости, пробу очищают при помощи распределения в системе гексан-ацетонитрил.

Методы определения ФОП можно подразделить на предварительные – холинэстеразная проба (рис. 16.4), ТСХ (для биологических образцов), элементный анализ (для анализа технических препаратов) и подтверждающие – ГЖХ с термоионным или электрозахватным детектором.

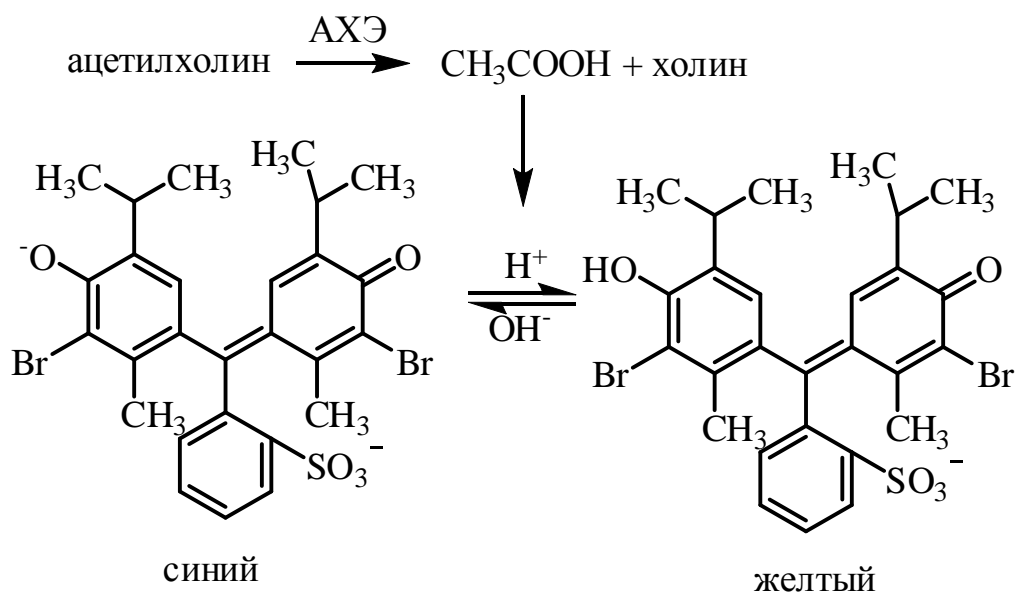


Рис. 16.4. Схема холинэстеразной пробы (16.6)

Холинэстеразная проба основана на способности ФОП снижать активность ацетилхолинэстеразы. Подавляют активность ацетилхолинэстеразы и некоторые вещества, не содержащие фосфор (карбарил, эзерин и др.). Ацетилхолин под влиянием ацетилхолинэстеразы разлагается с образованием уксусной кислоты, в результате чего изменяется рН смеси. В качестве индикатора используют бромтимоловый синий (рН перехода индикатора 6,0–7,6), который в кислой среде имеет желтую окраску, а в нейтральной – синюю, в присутствии ФОП ацетилхолин не разлагается и окраска индикатора не изменяется (синяя).

При выполнении холинэстеразной пробы к смеси реагирующих веществ можно прибавлять не ацетилхолинэстеразу, а плазму крови или лошадиную сыворотку, содержащую ацетилхолинэстеразу.

Выполнение холинэстеразной пробы. К исследуемому образцу крови прибавляют ацетилхолин, бромтимоловый синий (рН перехода индикатора 6,0–7,6) и инкубируют необходимое время. Если АХЭ активна, то происходит гидролиз ацетилхолина до холина и уксусной кислоты и окраска индикатора становится желтой. Если фермент блокирован, то окраска индикатора остается синей. Определение активности АХЭ выполняют также фотометрическим методом, который основан на определении не гидролизованного ацетилхолина при помощи гидро-

ксамовой реакции. Если АХЭ ингибирована, то оптическая плотность полученного раствора высокая, т.е. ацетилхолин не гидролизован.

ТСХ ФОП выполняют с использованием малополярных подвижных фаз на силикагеле. В качестве примера таких элюентов можно привести смеси хлороформ-ацетон (9:1), гексан-ацетон в различных соотношениях (например, 4:1) и другие смеси малополярных растворителей. Проявление разделенных веществ проводят следующими реактивами:

1) аммиачный раствор AgNO_3 с последующим облучением УФ-светом (ФОП восстанавливают ионы серебра до металлического серебра и появляются пятна черного цвета на сером фоне, УФ-излучение используют для инициации реакции окисления);

2) смесь растворов бромфенолового синего и нитрата серебра в водном ацетоне с последующей обработкой раствором лимонной кислоты (синие пятна на желтом фоне).

Газохроматографическое разделение ФОП проводят на силиконовых неподвижных жидких фазах – SE-30, OV-17 (фенилметилсиликон), OV-210 (трифторпропилметилсиликон) при температурах 150–220 °С, для более сложных ФОП (фозалон, фталофос) применяют более высокие температуры или получают более летучие производные. Детектирование чаще всего проводят с использованием термоионного детектора (разновидность пламенно-ионизационного детектора, водородное пламя горит на солевом источнике; солевой источник повышает селективность детекции P и N). Высококчувствительными для ФОП детекторами являются также термо-аэрозольный, электрозахватный (метафос – содержит нитрогруппу; хлорофос, ДДВФ, фозалон – содержат атомы хлора).

Основной сложностью при проведении химикотоксикологического и судебно-химического анализа на ФОП является их высокая реакционная способность и, как следствие, быстрые и разнообразные метаболические превращения в биологических объектах. Основные пути метаболизма ФОП в организме можно разделить на 2 группы:

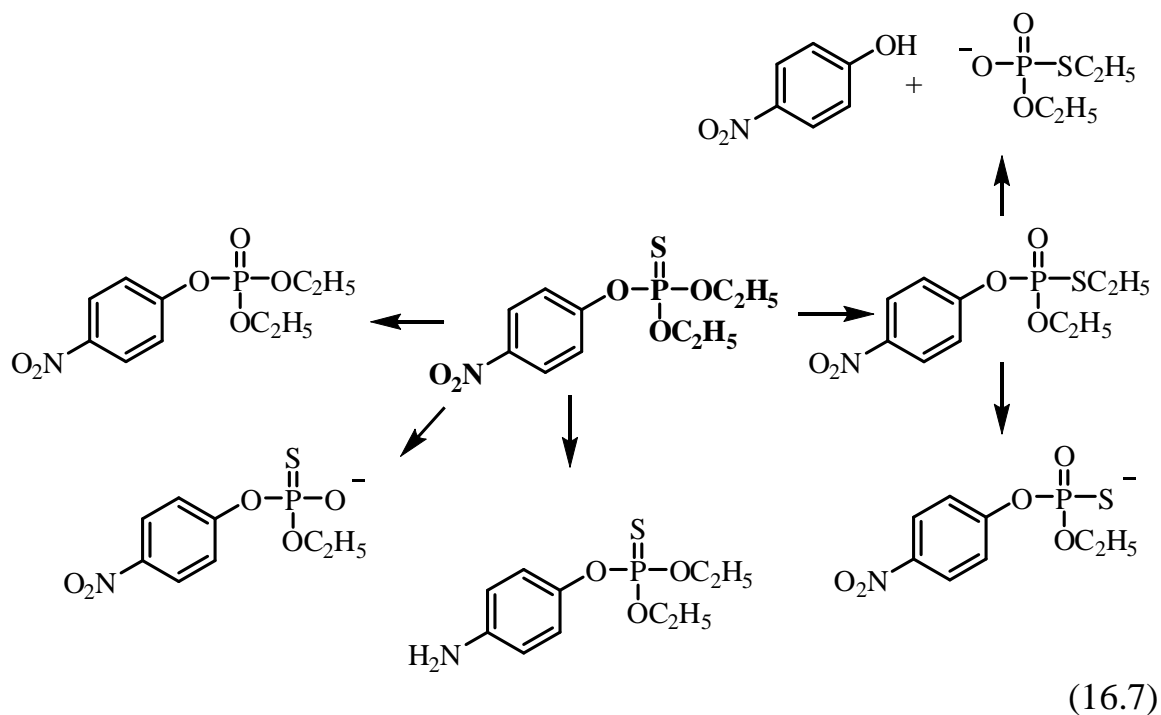
1 – реакции по связи P-O (P-S) – неферментативные (гидролиз – O-деалкилирование, изомеризация) и ферментативные (фосфорилирование АХЭ, гидролиз под действием других ферментов – фосфатаза, окислительное десульфирование);

2 – реакции по боковым радикалам – окисление тиоэфирной связи, гидролиз сложноэфирных, амидных и др. групп, восстановление нитрогруппы и др.

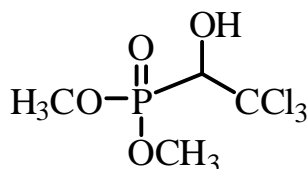
Такое многообразие путей метаболизма приводит к тому, что в биологических объектах присутствуют многочисленные метаболиты с аналогичной структурой и поэтому кроме традиционных требований к газохроматографическим методикам следует добавить и высокую эф-

эффективность используемых колонок, в частности, использование капиллярных колонок. Высокая реакционная способность ФОП обуславливает быстроту их разложения в биологическом материале. После смертельного отравления метафосом (смертельная доза ингаляционно 0,02 г) содержание его в органах и крови примерно одинаково (3–11 мкг/г), в моче обнаруживается также 4-нитрофенол (0,4–13 мкг/мл). Смертельная доза карбофоса около 25 г и концентрация его в органах и биологических жидкостях выше 100 мкг/мл (в печени до 1,7 мг/г). Токсическое действие при отравлении производными тио- и дитиофосфорной кислот определяется также кетоаналогами – параоксон (метаболит метафоса) и малаоксон (метаболит карбофоса), которые более токсичны, чем исходные соединения.

Метаболизм метафоса:



ХЛОРОФОС



О,О-диметил-(2,2,2-трихлор-1-гидроксиэтил)фосфонат

Хлорофос – белое кристаллическое вещество, температура плавления 84 °С, растворим в воде, бензоле, хлороформе, мало растворим в гексане.

Технический препарат представляет собой кристаллическую или пастообразную массу, содержащую около 80% действующего вещества. При хранении кристаллизуется. Выпускается в виде смачивающегося порошка или гранул.

Медленно разрушается в кислой и более быстро в щелочной среде. Быстро разлагается в разбавленных растворах на свету.

В растворах продукты разрушения подвергаются дальнейшим превращениям. Разрушение хлорофоса усиливается в присутствии окислителей и железа, потому препарат нельзя хранить в железной таре.

Хлорофос применяется в качестве контактного или кишечного инсектицида для обработки садов, виноградников, зерновых, бахчевых. 0,1%–0,3% раствор используется для борьбы с мухами, паразитами человека и животных. $LD_{50} = 630$ мг/кг. Смертельная доза хлорофоса для человека составляет 5–10 г.

Изолирование. Хлорофос изолируют из биологических объектов подкисленной водой или смесью воды и диэтилового эфира и ацетона. Если исследуемый объект содержит жиры, их можно удалить экстракцией *n*-гексаном (хлорофос в данном растворителе не растворим). Далее из полученных экстрактов хлорофос экстрагируют хлороформом или метилендихлоридом.

При определении хлорофоса и других ФОП в воде проводят экстракцию хлороформом или метилендихлоридом. Полученный экстракт упаривают, остаток растворяют в ацетоне.

Для обнаружения хлорофоса применяют:

- ТСХ, ГЖХ;
- холинэстеразную пробу, в т.ч. и в сочетании с ТСХ;
- химические реакции.

При обнаружении хлорофоса методом ТСХ применяют пластины «Silufol», подвижная фаза – смесь *n*-гексана и ацетона (2:1). $R_f(\text{хлорофоса}) = 0,32$, $R_f(\text{ДДВФ}) = 0,5$. В качестве проявителя используют раствор нитрата серебра с последующим облучением под УФ-лампой (серо-чёрные пятна на белом фоне), раствор хлорида палладия(II) (жёлто-коричневые пятна), смесь 2% раствора резорцина и 10% раствора карбоната натрия (в соотношении 2:3 при нагревании проявляются пятна розово-красного цвета) и др.

Химические реакции, используемые для обнаружения хлорофоса можно разделить на следующие группы:

Реакции, обусловленные группой $-\text{NCl}_2$:

- **реакция Фудживара** – при взаимодействии хлорофоса с пиридином и щелочью появляется красное или розовое окрашивание.

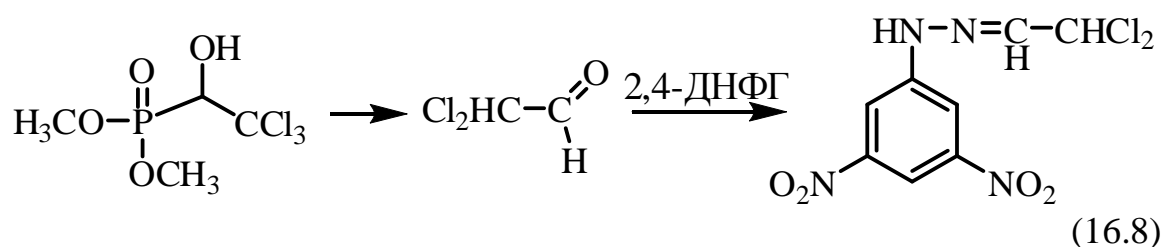
- **реакция образования изонитрила** – при нагревании хлорофоса со спиртовым раствором щелочи и анилином появляется неприятный запах изонитрила.

- **реакция с резорцином** – при взаимодействии хлорофоса со щелочным раствором резорцина через некоторое время появляется розовое окрашивание, которое затем переходит в оранжевое.

Аналогичный аналитический эффект дают алифатические хлорсодержащие соединения.

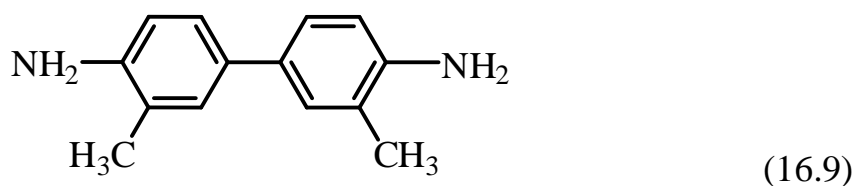
Реакции, обусловленные разрушением хлорофоса до дихлор-ацетальдегида:

- **реакция с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ):** к 1–10 каплям исследуемого раствора добавляют 2 капли 1 М раствора NaOH. Через 20 минут прибавляют 1 каплю 0,1% раствора ДНФГ в 4 М растворе HCl. Нагревают 30 минут на кипящей водяной бане. Охлаждают, прибавляют 1 каплю 4 М раствора NaOH и 0,5 мл этанола. Появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание:



- **реакция с ацетоном:** к 0,1–0,5 мл исследуемого этанольного раствора добавляют 1 мл ацетона и 0,5 мл 0,5 М спиртового раствора NaOH. Через некоторое время (5–15 мин) появляется розовое окрашивание, переходящее затем в оранжевое. Реакция обусловлена образованием окрашенного продукта при взаимодействии дихлорацетальдегида с ацетоном.

Реакция с о-толидином.



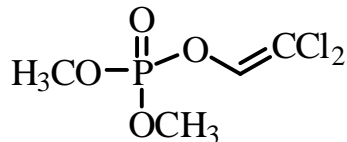
Данная реакция является групповой реакцией для ФОП. Под действием H₂O₂ ФОП образуют пероксиды, окисляющие ароматический амин (о-толидин, бензидин, о-дианизидин и т.п.), при этом появляется жёлтое или ярко-оранжевое окрашивание.

К исследуемому раствору добавляют раствор о-толидина в ацетоне, раствор пероксида водорода и раствор щелочи. Появляется жёлтое или оранжевое окрашивание.

Количественное определение. Для количественного определения хлорофоса используют ГЖХ; фотометрические методики, осно-

ванные на реакциях с 2,4-ДНФГ; ТСХ (полуколичественное определение) и др.

ДДВФ (ДИХЛОРОФОС)



О,О-диметил-О-(2,2-дихлорвинил)фосфат

ДДВФ – один из метаболитов хлорофоса. Обладает большей токсичностью ($\text{ЛД}_{50} = 23\text{--}87$ мг/кг). Относится к особо токсичным пестицидам.

ДДВФ – бесцветная жидкость. Мало растворима в воде (1:100), хорошо в большинстве органических растворителей. Температура кипения 120°C при 14 мм. рт. ст.

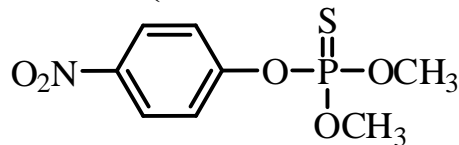
ДДВФ – инсектицид контактного и фумигантного действия. Используется для борьбы с бытовыми насекомыми.

Изолирование. ДДВФ экстрагируют диэтиловым эфиром из сухой водной вытяжки, эфир отгоняют и проводят экстракцию хлороформом. Для извлечения ДДВФ из различных объектов применяют также метанол, этанол, ацетонитрил, этилацетат, хлороформ, метилендихлорид и др. Для очистки извлечений используют экстракцию, хроматографию, перегонку с водяным паром.

Обнаружение ДДВФ проводят с применением методов и реакций, используемых для обнаружения хлорофоса.

Количественное определение. Для количественного определения хлорофоса используют хроматографические методы, спектрофотометрию на основе реакции с 2,4-ДНФГ и др.

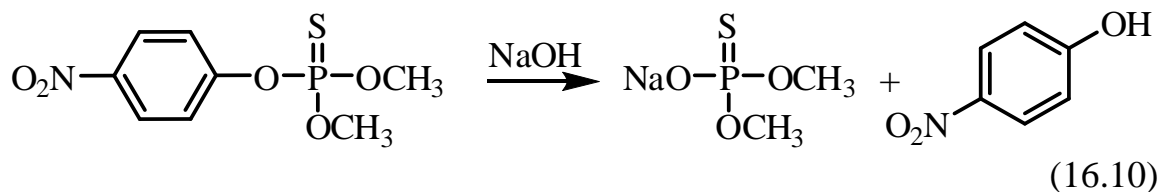
МЕТАФОС (МЕТИЛПАРАТИОН)



О,О-диметил-О-4-нитрофенилтиофосфат

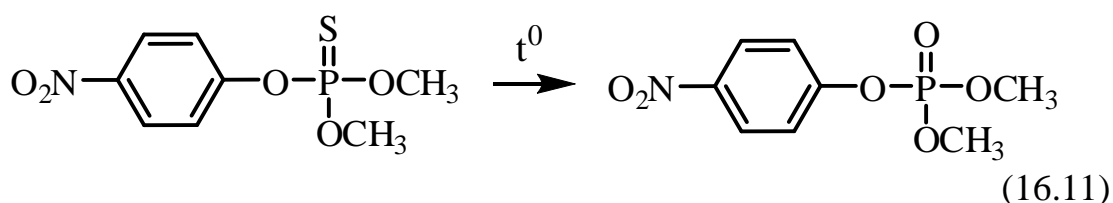
Метафос – белое кристаллическое вещество, температура плавления $35\text{--}36^\circ\text{C}$. Мало растворяется в воде. Хорошо растворим в большинстве органических растворителей.

В щелочной среде метафос подвергается гидролизу:



Технический метафос содержит примеси *n*-нитрофенола, триметилтиофосфата и др. Выпускается метафос в виде 2,5% дуста, 20% концентрата эмульсии и 30% смачивающегося порошка.

При нагревании до 140–160 °С метафос почти полностью превращается в тиоловый изомер (более токсичное соединение).



Метафос относится к особо токсичным пестицидам (ЛД₅₀ = 35 мг/кг). В организме метафос окисляется до метилпараоксона, который является более токсичным, чем метафос.

Метафос является контактным пестицидом и акарицидом. Применяется для обработки плодовых деревьев, зерновых, овощных и технических культур.

Изолирование. Для изолирования метафоса применяют экстракцию диэтиловым эфиром, хлороформом и др.

Обнаружение проводят с использованием следующих методов: 1) ТСХ, ГЖХ; 2) химические реакции; 3) холинэстеразная проба.

Обнаружение метафоса **методом ТСХ:** подвижная фаза – смесь гексана и ацетона 9:1, реагент (раствор 2,6-дибром-*N*-хлорхинонимина) – красные пятна.

Химические реакции:

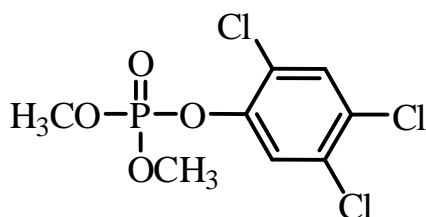
- с **о-дианизидином и перборатом натрия:** К 1 мл ацетонового исследуемого раствора прибавляют 0,5 мл 3% ацетатного раствора о-дианизидина и 2 мл 1,25% раствора пербората натрия. При наличии метафоса раствор приобретает жёлтую или красную окраску.

- **реакция обнаружения *n*-нитрофенола со щелочью;**

- **минерализация и обнаружение фосфора.**

Количественное определение метафоса проводят с применением ГЖХ, а также спектрофотометрическим методом (гидролиз до *n*-нитрофенолята).

ТРИХЛОРМЕТАФОС-3

**О-метил-О-этил-О-(2,4,5-трихлорфенил)тиофосфат**

Другие трихлорметафосы вместо C_2H_5O - содержат CH_3O - (ЕТ-14) или NH_2 - (ЕТ-15).

Трихлорметафос-3 (ТХМ-3) – бесцветная или желтоватая маслянистая жидкость со слабым неприятным запахом. Малорастворим в воде, хорошо в некоторых органических растворителях. ТХМ-3 выпускается в виде 50%-ного концентрата эмульсии.

ТХМ применяется как контактный инсектицид и акарицид для борьбы с комнатными мухами и их личинками, клопами, вредителями сахарной свеклы, виноградников и т.п. ЛД₅₀ данного пестицида для крыс составляет 150–500 мг/кг.

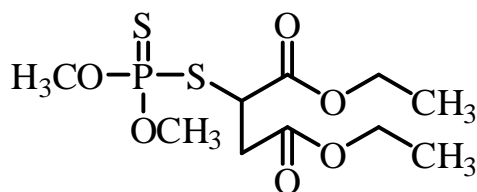
При определении ТХМ-3 в воде его экстрагируют диэтиловым эфиром или хлорофосом, экстракт упаривают, остаток растворяют в ацетоне, а затем проводят ТСХ. Подвижная фаза – смесь *n*-гексан-ацетон. Реагенты:

- **о-толидин и раствор щелочи.** При облучении УФ-светом в течение 3–5 минут наблюдают появление желтого окрашивания.

- **аммиак, 4-аминоантипирин и персульфат аммония** (появляется розовое окрашивание).

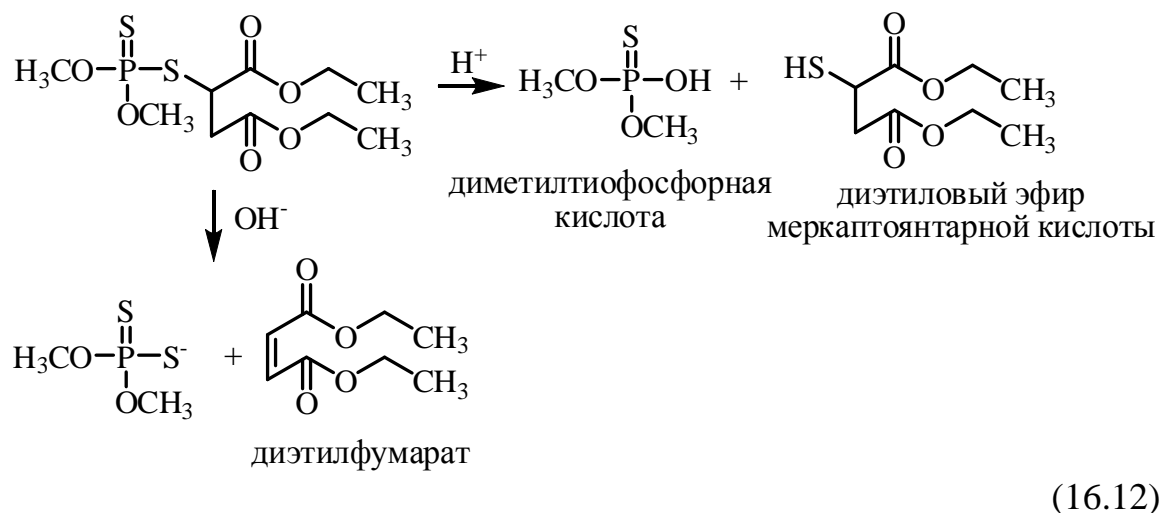
При определении ТХМ в молоке его извлекают ацетоном, из творога и других молочных продуктов – ацетоном и хлороформом. Анализ проводят методом ТСХ (ПФ – *n*-гексан). Пластинку проявляют раствором $K_3[Fe(CN)_6]$ – малиново-розовое окрашивание.

Количественное определение ТХМ проводят методом ГЖХ.

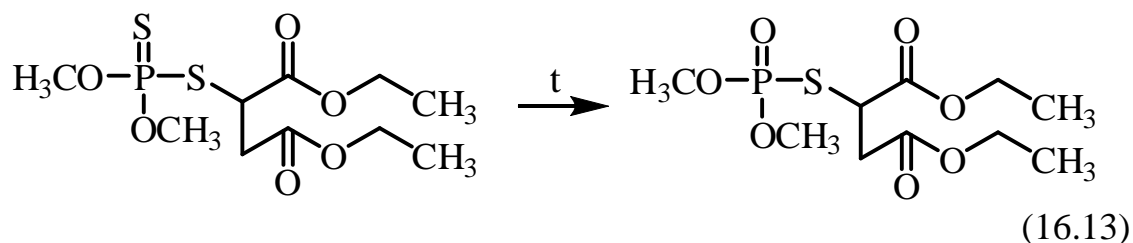
КАРБОФОС (МАЛАТИОН)**О,О-диметил-S-[1,2-ди(этоксикарбонил)]дитиофосфат**

Карбофос представляет собой бесцветную маслянистую жидкость с характерным неприятным запахом, температура кипения 156–157 °С при 0,7 мм. рт. ст., слабо растворяется в воде, хорошо – в большинстве органических растворителей.

Карбофос подвергается гидролизу в кислой и щелочной средах:



При продолжительном нагревании до 150 °С карбофос превращается в более токсичное соединение:



При длительном контакте с железом карбофос разрушается и теряет инсектицидные свойства.

Выпускается карбофос в виде концентрата эмульсии, содержащей 30–60% карбофоса. Карбофос применяется в качестве контактного инсектицида и акарицида для борьбы с тлёй, клещами и т.п. ЛД₅₀ = 500–1500 мг/кг.

В организме карбофос окисляется до малаоксона. Клиническая картина отравления: слюнотечение, рвота, понос, одышка, цианоз и др.

Изолирование проводят методом экстракции хлороформом или бензолом.

Обнаружение хлорофоса проводят с применением методов ТСХ, ГЖХ, реакций окрашивания и холинэстеразной пробы.

Реакции окрашивания:

- с **диазотированной сульфаниловой кислотой**: 2–3 мл хлороформного экстракта выпаривают досуха, прибавляют 2 мл воды, 1 мл диазотированной сульфаниловой кислоты и 0,5 мл 5%-го раствора гидроксида натрия. При наличии карбофоса появляется вишнево-красная окраска.

- с **реактивом Марки**: в пробирке выпаривают досуха 2–3 мл хлороформного экстракта, прибавляют 5–10 капель реактива Марки. Появление оранжевой окраски, переходящей в темно-коричневую, указывает на наличие карбофоса в исследуемом растворе.

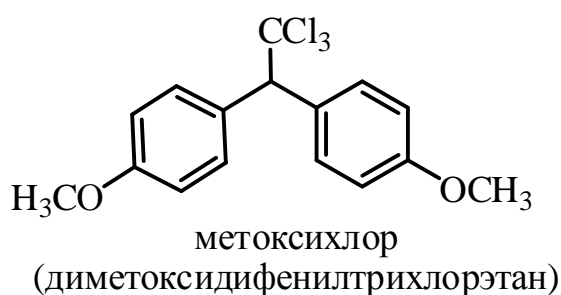
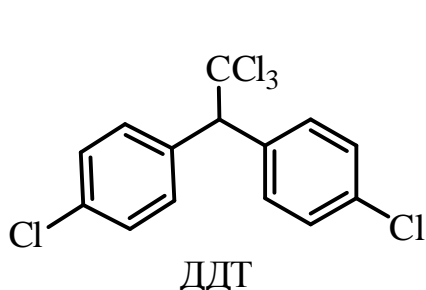
Тонкослойная хроматография. ПФ: смесь *n*-гексана с ацетоном (2:1). Реагенты: бромтимоловый синий, нитрат серебра – пятна лилового цвета. Предложены и другие реагенты – проявители: раствор лимонной кислоты, раствор *o*-толидина, раствор хлорида палладия, 2,6-дибром-*N*-хлорхинонимин и др.

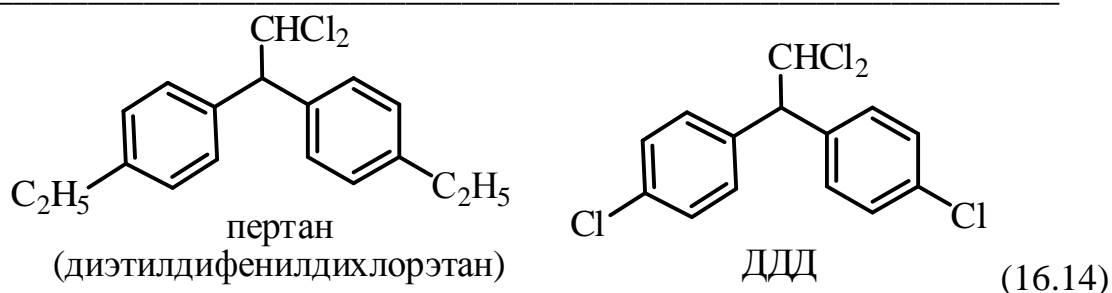
Количественное определение карбофоса проводят методом ГЖХ.

16.7. Хлорорганические соединения

Хлорорганические пестициды являются химически малополярными соединениями, практически не растворимы в воде, характеризуются длительной сохраняемостью в окружающей среде (например, в почве от 2–15 лет до 50 лет) и организме животных и человека. Токсическая и смертельная концентрация ХОС в крови значительно ниже, чем у большинства ФОС и составляет 20–500 нг/мл (линдан, альдрин). Значительно большие концентрации этих веществ в жировой ткани и печени (ДДТ – 40–650 мкг/г, линдан – 350 мкг/г).

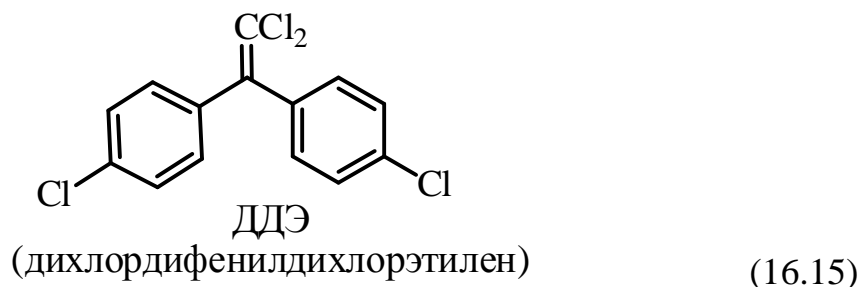
Основными представителями группы хлорсодержащих пестицидов длительное время являлись дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) и его аналоги:





ДДТ обладает сильным инсектицидным действием и незначительной токсичностью по отношению к теплокровным животным. Однако применение этих веществ в большинстве стран было запрещено в связи с их способностью накапливаться в жировых тканях человека и животных, давать высокую остаточную токсичность и медленно разрушаться в окружающей среде.

Метаболические превращения ХОС многообразны и связаны в первую очередь с дегалогенированием молекулы под действием ферментов. Метаболизм ДДТ протекает с дехлорированием алифатической цепи трихлорэтана с образованием вначале ДДД, а затем после дехлорирования – ДДЭ. Образовавшиеся метаболиты еще более устойчивы, чем ДДТ, сохраняются и накапливаются в организме человека.



Поражающее действие ХОС связано с параличом нервной системы. Высоколипофильные ХОС нарушают структуру мембран нервных клеток и препятствуют прохождению нервных импульсов.

В настоящее время использование ХОС как инсектицидов в сельском хозяйстве запрещено практически во всех странах. Связано это в первую очередь с их чрезвычайно высокой устойчивостью как во внешней среде (почва, вода), так и в продуктах питания (даже после термической и кулинарной обработки). Из-за этого ХОС накапливаются в жировой ткани, печени и других богатых липидами органах человека и их содержание у здорового взрослого человека в жировой ткани может достигать десятков миллиграмм на килограмм.

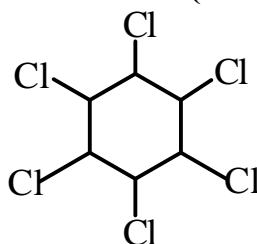
Изолирование ХОС из биологических тканей проводят неполярными или малополярными растворителями – бензол, гексан, ацетон и др. Особенностью очистки при извлечении ХОС является то, что гексановое извлечение или сухой остаток после упаривания извлекаемого обрабатывают концентрированной серной кислотой для разрушения

эндогенных веществ (липидов и др. неполярных компонентов). При этом ХОС не разрушаются и после нейтрализации извлечения их определяют методами ТСХ, ГЖХ и ГХ-МС.

Разделение ХОС в тонких слоях силикагеля проводят с использованием малополярных элюентов (гексан-ацетон (4:1), гексан-бензол и другие). Проявление пятен проводят аммиачным раствором AgNO_3 .

Наиболее чувствительным и селективным методом определения ХОС является ГЖХ с ДЭЗ. Разделение проводится на малополярных силиконовых фазах – OV-17, реже SE-30, причем как на насадочных колонках (длина 1–2 метра), так и на более эффективных капиллярных колонках длиной до 50 метров. Поскольку ХОС имеют различные свойства (летучесть, число атомов галогена), то чаще всего при их разделении используется режим программирования температуры (от 150 до 250 °С). Высокая чувствительность ГЖХ с ДЭЗ, однако, может приводить к появлению ложноположительных результатов (т.е. могут обнаруживаться пики-артефакты из-за недостаточной чистоты реактивов, посуды, хроматографического шприца и т.д.).

ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАН (ГЕКСАХЛОРАН, ГХЦГ)



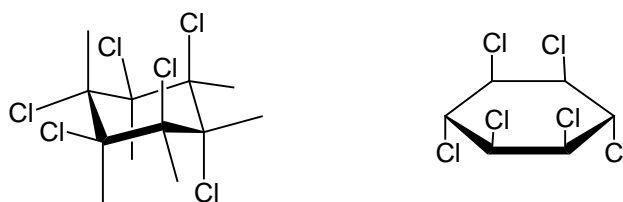
1,2,3,4,5,6-гексахлорциклогексан

Гексахлорциклогексан представляет собой смесь 8 стабильных стереоизомеров, различающихся положением (аксиальным /*a*/ или экваториальным /*e*/ атомов хлора по отношению к циклу). Все изомеры гексахлорана устойчивы по отношению к концентрированным серной, азотной, хлороводородной кислот и окислителям.

Инсектицидные свойства гексахлорциклогексана обнаружены в 1933 году Г.Бендером.

При взаимодействии бензола с хлором на свету образуется смесь, содержащая 60–70% α -изомера, 7–10% β -изомера, 10–15% γ -изомера, 6–7% δ -изомера и около 5% остальных изомеров. Продукт представляет собой твердое вещество белого или кремоватого цвета со стойким запахом плесени. Запах обусловлен примесями тетра- и пентахлорциклогексана.

Из всех изомеров гексахлорциклогексана лишь γ -изомер (линдан) обладает инсектицидной активностью (линдан содержит 99–100% γ -изомера).



(16.16)

Линдан представляет собой белое кристаллическое вещество без запаха, температура плавления 112,8 °С. Растворим в органических растворителях: ацетоне, бензоле, хлороформе и др. В воде растворяется слабо (1 мг/100мл). При нагревании возгоняется, при этом частично разлагается до трихлорбензола и хлороводорода.

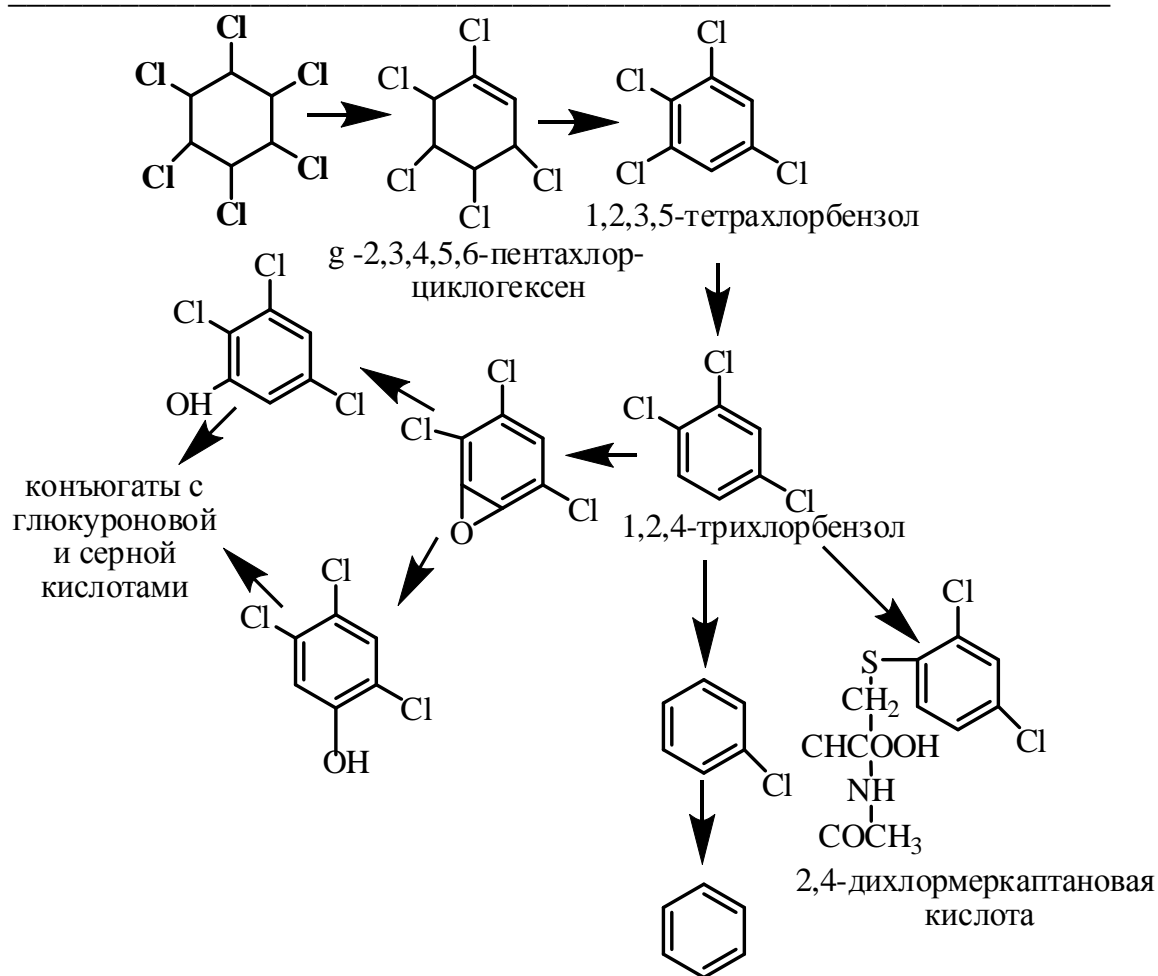
Молекула линдана липофильна, поэтому данное соединение легко проникает через кожу и хорошо всасывается в ЖКТ. ГХЦГ распределяется по разным органам и тканям в зависимости от их липофильности. Характерно накопление в мышечной ткани. Обнаруживается в почках, мышцах и в незначительной степени в головном мозге. ГХЦГ оказывает кожнорезорбтивное действие, вызывает гиперемию кожи, отечность, раздражение конъюнктивы глаз. Общетоксическое действие ГХЦГ у человека проявляется головной болью, головокружением, общей слабостью, тошнотой. В тяжёлых случаях – обмороки, утрачиваются двигательная и чувствительная функции ЦНС. Смерть наступает в результате поражения ЦНС и сердечно-сосудистой системы.

ГХЦГ входит в состав протравителей (для семян) комплексного действия: меркуран – смесь γ -ГХЦГ и этилмеркурхлорида, гексагамма – смесь γ -ГХЦГ и гексахлорбензола; фентиурам – смесь γ -ГХЦГ, тетраметилтиурамдисульфида (тиурама) и трихлорфенолята меди (II) и др. Кроме инсектицидных свойств, ГХЦГ обладает способностью стимулировать рост растений.

ГХЦГ метаболизируется в печени и выводится с мочой и калом в виде конъюгатов и фенольных производных, переходит в молоко кормящих женщин. На рис. 16.5 приведена схема метаболизма ГХЦГ в организме.

Изолирование. ГХЦГ изолируют из биоматериала методом перегонки с водяным паром. Затем извлекают из дистиллята диэтиловым эфиром. Эфирный экстракт упаривают до небольшого объёма.

Для изолирования ГХЦГ из различных объектов также применяют экстракцию органическими растворителями (гексан, петролейный эфир, смесь ацетона с гексаном 1:1, ацетон и др.). Например, при определении ГХЦГ и других хлорорганических ядохимикатов в воде в качестве экстрагента используют *n*-гексан.



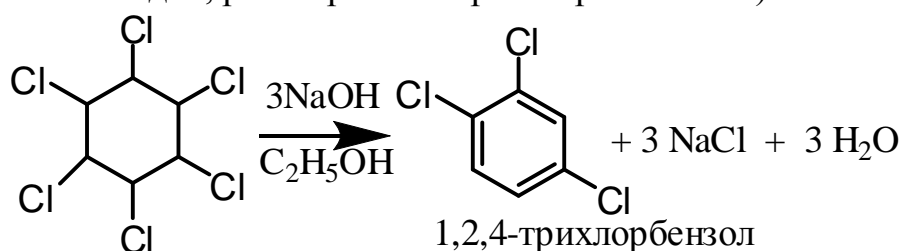
(16.17)

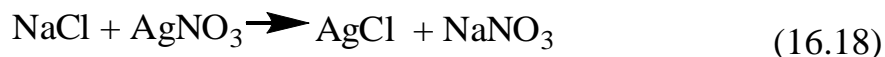
Для обнаружения ГХЦГ применяют хроматографические методы анализа (ГЖХ, ТСХ).

При обнаружении ГХЦГ с помощью метода ТСХ в качестве неподвижной фазы применяют пластины «Silufol». Подвижная фаза – смесь *n*-гексана с ацетоном (49,5:0,5), $R_f = 0,2$. Проявитель – водно-ацетоновый раствор аммиаката серебра. При освещении УФ-лампой появляется пятно серо-чёрного цвета.

Для обнаружения ГХЦГ можно применить следующие химические реакции:

Реакция отщепления органически связанного хлора: раствор ГХЦГ кипятят со спиртовым раствором щелочи. Затем раствор подкисляют азотной кислотой и проводят реакцию с нитратом серебра (выпадает белый осадок, растворимый в растворе аммиака).





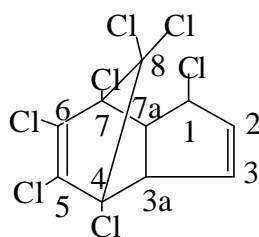
Реакция дехлорирования ГХЦГ и нитрования образовавшегося бензола: ГХЦГ дехлорируют до бензола, действуя при нагревании спиртовым раствором щелочи или цинком и уксусной кислотой. Бензол нитруют смесью твёрдого нитрата калия и концентрированной серной кислотой. Продукт нитрования (*m*-динитробензол) извлекают диэтиловым эфиром, эфир выпаривают и к сухому остатку прибавляют ацетон и спиртовой раствор щелочи. Появляется красно-фиолетовое или розовое окрашивание. Последняя реакция называется **реакцией Яновского**.

Реакция с янтарной кислотой и сульфатом железа (III) – синее окрашивание.

Количественное определение. Для количественного определения ГХЦГ используют метод ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, спектрофотометрию (на основе реакции Яновского), ТСХ (полуколичественное определение – площадь пятна анализируемого вещества сравнивают с площадью пятна стандарта). При анализе больших количеств препарата можно применить метод аргентометрии.

ГХЦГ является инсектицидом контактного, кишечного и фумигантного действия, применяется для борьбы с вредными насекомыми, обитающими в почвах, для протравливания семян, дезинсекции зернохранилищ, обработки древесины и т.д.

ГЕПТАХЛОР

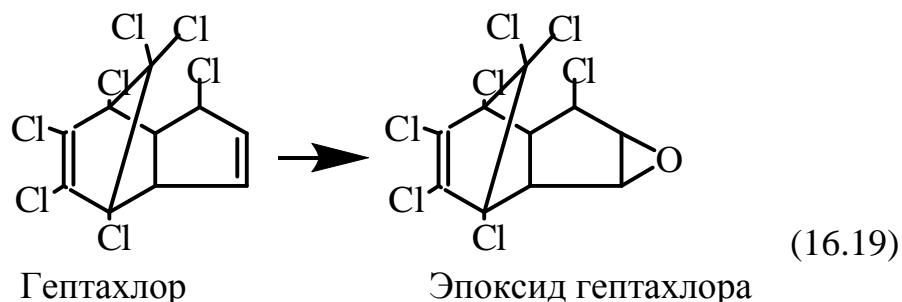


1,4,5,6,7,8,8-гептахлор-4,7-эндометилентетрагидроинден

Гептахлор – белое кристаллическое вещество со слабым запахом камфоры. Практически нерастворим в воде (0,056 мг/л), растворим в этаноле (45 мг/л), хорошо растворяется в керосине, ароматических углеводородах (бензол 1060 г/л), галогенпроизводных углеводородов, ацетоне (750 г/л) и других органических растворителях. Применяется гептахлор в качестве инсектицида.

Гептахлор относится к ядохимикатам средней токсичности (для крыс $\text{LD}_{50} = 500$ мг/кг). При любом пути введения быстро всасывается

и метаболизируется. Главным путём метаболизма гептахлора является эпоксидирование:



Эпоксид обладает сильной способностью к кумуляции в отличие от гептахлора. При повторных введениях эпоксид гептахлора накапливается в организме, особенно в жировой ткани.

Изолирование. Выбор экстрагента для изолирования гептахлора зависит от вида исследуемого биоматериала. Для выделения гептахлора из внутренних органов применяют *n*-гексан или петролейный эфир, из биологических жидкостей – диэтиловый эфир, из пищевых продуктов – диэтиловый эфир или петролейный эфир, из сельскохозяйственных культур, фруктов, овощей – ацетонитрил или смесь ацетонитрила с водой (из полученной вытяжки далее гептахлор экстрагируют *n*-гексаном).

Для **обнаружения** гептахлора используют хроматографические методы анализа (ТСХ, ГЖХ) и химические реакции.

1. **Реакция с диэтаноломином** является специфичной для гептахлора. При взаимодействии этого вещества с реактивом, состоящим из диэтанолamina, гидроксида калия и метанола, появляется фиолетовое окрашивание.

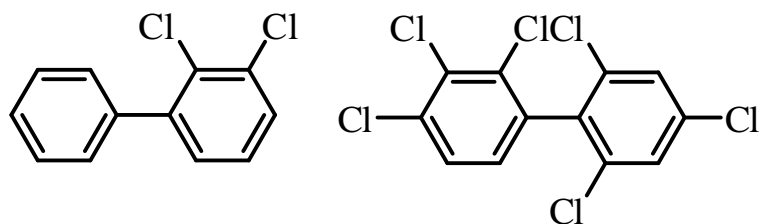
2. **Реакция с диэтиламином:** при взаимодействии гептахлора с реактивом, состоящим из диэтиламина, гидроксида калия и метанола, появляется зелёное, быстро исчезающее окрашивание.

3. **Реакция с анилином и пиридином:** к бензольному раствору гептахлора добавляют анилин, раствор КОН в метаноле, нагревают, а затем добавляют пиридин и снова нагревают – появляется тёмно-зелёное окрашивание.

Количественное определение гептахлора проводят методом ГЖХ.

ПОЛИХЛОРИРОВАННЫЕ БИФЕНИЛЫ

В молекулах полихлорированных бифенилов (ПХБ) атомы хлора содержатся в *o*-, *m*- и *p*-положениях. Известно более 200 индивидуальных ПХБ.



(16.20)

Свойства ПХБ: термостабильность, устойчивость к окислению, не взаимодействуют с кислотами и щелочами, гидрофобны (накапливаются в жировой ткани), растворимость в воде – 0,007–6,0 мг/л. В естественных условиях разрушаются за счет фотохимических процессов (реакция дехлорирования), однако реакция протекает крайне медленно.

ПХБ являются прекрасными диэлектриками (арохлор), используются в технике для изоляции проводов. Широкое применение их было резко сокращено с 1972 года и прекращен промышленный выпуск в 1986 г. В среднем каждый человек потребляет с пищей 4–50 мкг ПХБ в день (основные количества поступают с рыбой). Данный морской продукт способен в 100000 раз концентрировать ПХБ из воды. Содержание ПХБ в рыбе из водоемов Японии, например, составляет до 22 мг/кг. Содержание ПХБ в печени человека (США) около 100 мкг/г, в материнском молоке – 0,03–0,06 мкг/мл. Период полувыведения ПХБ из организма составляет 33–34 месяца. Полихлорированные бифенилы обладают канцерогенным действием на человека.

Методы определения: ГЖХ и ГХ-МС. ГЖХ с использованием детектора электронного захвата используют при определении суммарного содержания ПХБ в объектах окружающей среды. Применение масс-спектрального детектора позволяет значительно увеличить селективность определения ПХБ. При селективном детектировании выбранных ионов достигается высокая чувствительность в ГХ-МС.

16.8. Эфиры карбаминовой кислоты

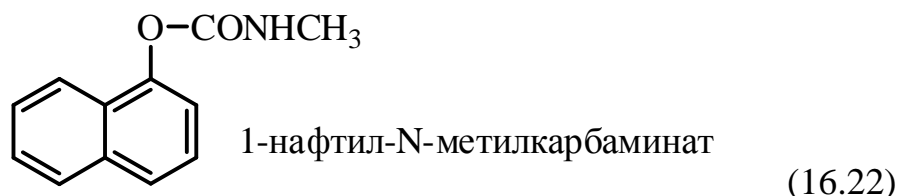
Физиологическая роль некоторых эфиров карбаминовых кислот была обнаружена в 1929 г.



Карбаминовая кислота

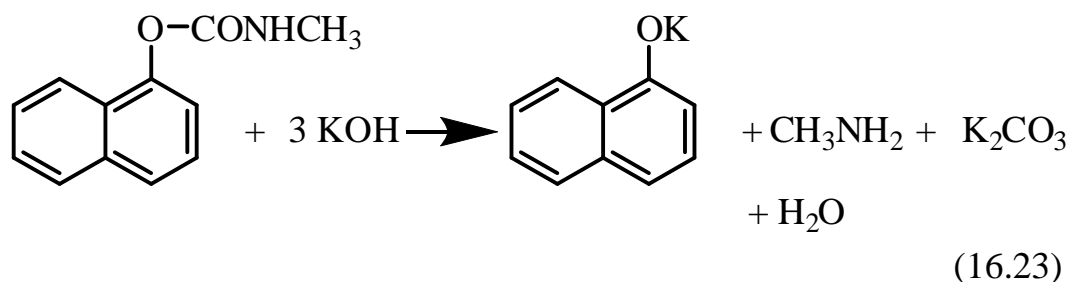
Дитиокарбаминовая кислота

Практическое применение нашел карбарил (1-нафтил-N-метилкарбаминат, α -нафтил-N-метилкарбаминат). Получается карбарил (севин) из α -нафтола и метилкарбаминовой кислоты.



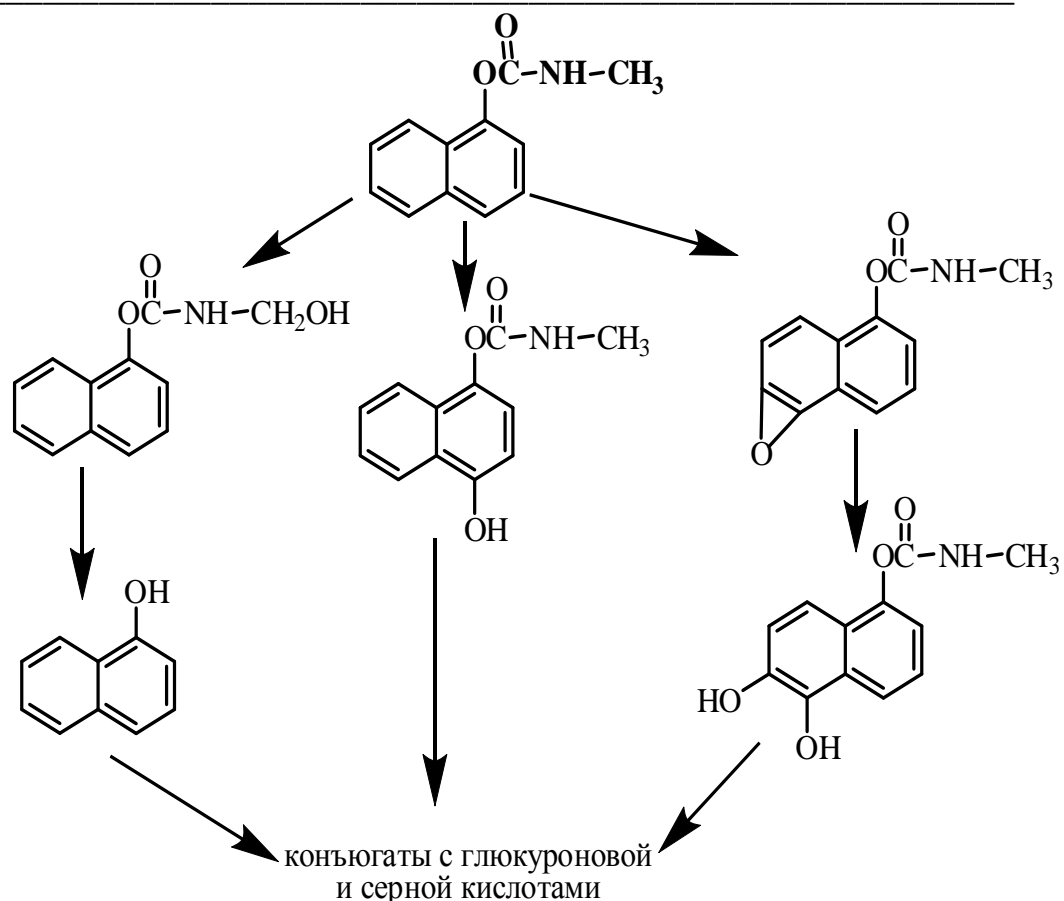
Препарат выпускается в виде 50–85%-го смачивающегося порошка, дуста и гранул.

Карбарил – белое кристаллическое вещество (температура плавления 142 °С), мало растворяется в воде (50 мг/л), хорошо растворяется в хлороформе, бензоле и других органических растворителях. Карбарил используется как инсектицид контактно-кишечного действия для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур и деревьев. Основным недостатком пестицидов группы карбаминовой кислоты – медленное разрушение в почве (до 2-х лет), что значительно ограничивает их применение. В щелочной и кислой средах гидролизуется:



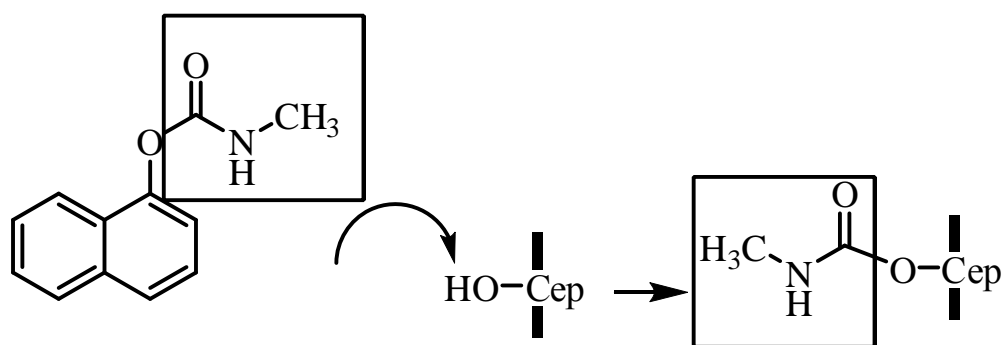
Карбарил быстро всасывается при различных путях поступления в организм. Через 5 мин после поступления в желудок он появляется в крови, а через 30 мин отмечается максимальное накопление его в органах. Основной метаболизм данного вещества происходит в печени. Основным метаболит – глюкуронид α -нафтола. В моче людей, контактировавших с севином обнаружены также сульфаты и глюкурониды 4-(метилкарбамоилокси)- α -нафтола. Карбарил полностью выводится из организма в течение 3-х суток. До 80% карбарила выводится с мочой в первые 24 часа в виде глюкуронид α -нафтола.

Метаболизм карбарила протекает по следующей схеме:



(16.24)

Карбарил является пестицидом средней токсичности ($LD_{50} = 560$ мг/кг). Механизм действия карбаматов (как и механизм действия ФОС) связан с инактивированием активного центра ацетилхолинэстеразы.



(16.25)

Изолирование. Карбарил и его основной метаболит α -нафтол выделяют из биоматериала путем экстракции бензолом (*n*-гексаном, диэтиловым эфиром и др.) Бензольные экстракты выпаривают досуха, остаток растворяют в этаноле и используют для обнаружения карбарила.

Для **обнаружения** севина применяют химические реакции (микрористаллоскопические и реакции окрашивания), метод ТСХ и холи-

нэстеразную пробу. В МКС реакциях участвуют непосредственно карбарил, а в реакциях окрашивания, как правило, α -нафтол.

Микрокристаллоскопические реакции.

- перекристаллизация карбарила из этанольного или хлороформного раствора – кристаллы характерной формы;
- с пикриновой кислотой – темно-желтые кристаллы;
- с дихлоридом ртути (II) – бесцветные кристаллы.

Реакции окрашивания. (предварительно проводится гидролиз се-вина до α -нафтола):

- с хлоридом меди (II) и бромидом натрия – красно-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание хлороформного слоя;
- с 4-аминоантипирином и $K_3[Fe(CN)_6]$ – оранжево-красное окрашивание хлороформного слоя;
- с нитритом натрия в кислой среде – желтое окрашивание, при добавлении щелочи окраска становится оранжевой;
- с хлоридом железа (III) – розовое окрашивание.

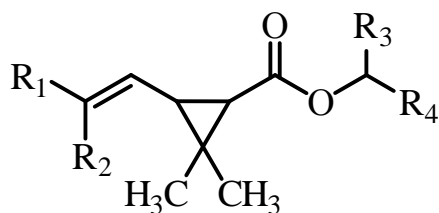
ТСХ: подвижная фаза – хлороформ; при облучении УФ-светом пятна флуоресцируют; появление красной окраски пятна после обработки диазотированной сульфаниловой кислотой.

Количественное определение карбарила проводят методами ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, а также спектрофотометрическим методом, основанным на образовании окрашенных соединений с хлоридом меди (II) и бромидом натрия или получение азокрасителя.

16.9. Синтетические пиретроиды

Известно более 100 синтетических пиретроидов (СП). Различают СП первого (например аллетрин, ресметрин, тетраметрин, фенотрин), второго (перметрин, дельтаметрин, цигалотрин, циперметрин и др.) и третьего (бифетрин, тралометрин, цифлутрин и др.) поколений. Для СП третьего поколения характерна высокая активность к клещам и меньшая токсичность для птиц и рыб по сравнению с СП 1-го и 2-го поколения. Применяются СП в форме аэрозолей, дустов для борьбы с бытовыми насекомыми (тараканы, клопы, вши).

К синтетическим пиретроидам относятся производные циклопропанкарбоновой (хризантемовой) кислоты, имеющие общую формулу:

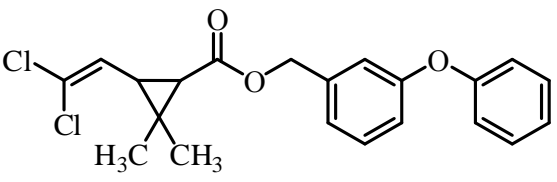
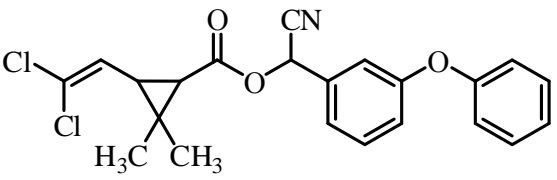
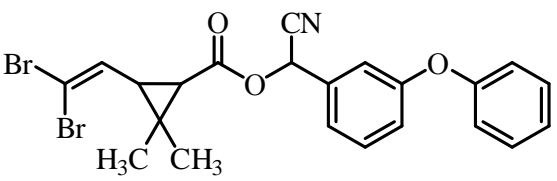
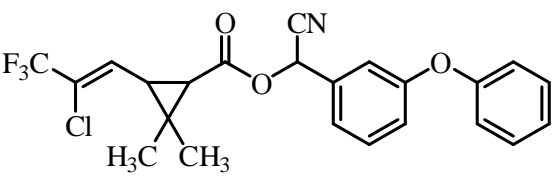


(16.26)

В таблице 16.5 приведены название и формулы некоторых представителей этого класса инсектицидов, имеющих наиболее широкое применение в сельском хозяйстве и в быту.

Таблица 16.5

Название и формулы некоторых синтетических пиретроидов

Название	Формула	LD ₅₀ , мг/кг
Перметрин Амбуш		500- 4000
Циперметрин Цимбуш, Рипкорд		250 - 300
Дельтаметрин и Децис		128 - 138
Цигалотрин Карате		

Природные пиретрины (смесь, полученная из цветков ромашки рода пиретрум), хотя и превосходят по инсектицидной активности широко применяемый в 60-е годы прошлого века ДДТ, однако очень неустойчивы во внешней среде – разлагаются под действием УФ-света. Данная группа веществ практически не токсична по отношению к теплокровным. Поэтому основное направление в разработке этой перспективной с экологической точки зрения группы веществ было синтез более устойчивых к факторам окружающей среды соединений. В 1973 году синтезирован перметрин (М. Эллиотт, Великобритания), а затем циперметрин, дельтаметрин (в 900 раз активнее пиретрина из ромашки) и карате. СП поражают центральную и периферическую нервную системы. Механизм действия производных СП связан с деполаризацией Na⁺-

каналов нервных мембран и специфическим выключением мембранных АТФ-аз.

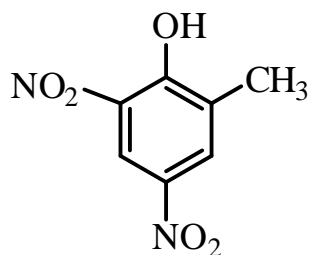
Все синтетические пиретроиды (эфиры хризантемовой кислоты) являются летучими соединениями разной степени, гидрофобны, хорошо растворяются в органических растворителях (ацетон, гексан, метанол, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир) и практически не растворимы в воде. В кислой и щелочной средах гидролизуются до производного циклопропанкарбоновой кислоты и других продуктов. Выпускаемые препараты для сельского хозяйства – масляные (или толуольные, ксилольные) растворы с добавлением ПАВ для солюбилизации в воде, содержание действующего вещества 1–5% (перметрин – 25%). В быту используют инсектицидные карандаши типа «Инта-вир» и др. с содержанием циперметрина (3–4%). В Республике Беларусь отравления данными препаратами встречаются достаточно часто. Признаками отравления являются тошнота, головная боль, головокружение, стеснение в груди, тахикардия, нарушение сознания.

Общая схема изолирования и анализа были рассмотрены ранее.

Для обнаружения СП применяют ТСХ, ГЖХ, ГХ-МС и другие методы. В качестве подвижных фаз при проведении ТСХ используют обычно 2-3-х компонентные системы органических растворителей (хлороформ, гексан, толуол) с добавкой метанола, бензола, этилацетата и др.). Реагенты для проявления хроматограмм: аммиачный раствор нитрата серебра, реактив Драгендорфа, пары брома и о-толидин, а также облучение УФ-светом.

Основной современный метод количественного определения синтетических пиретроидов – ГЖХ. Особенность ГХ-определения дельтаметрина, обусловленная его низкой летучестью и необходимостью применения высоких температур колонок в ГЖХ (280–300 °С), заключается в необходимости гидролиза данного вещества до цис-транс-3-(2,2-дибромвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты с последующим получением метилового эфира этой кислоты и ГХ-определением последнего.

ДИНИТРООРТОКРЕЗОЛ



4,6-динитро-*o*-крезол; 2,4-динитро-6-метилфенол (ДНОК, ДИНОК)

ДНОК – желтое кристаллическое вещество, без запаха, мало растворяется в воде, лучше в ацетоне, бензоле, метаноле, петролейном эфире. Со щелочами, аммиаком ДНОК образует соли, которые в сухом состоянии легко взрываются от удара. Поэтому ДНОК выпускается в растворах или смесях с разбавителями (сульфат натрия, сульфат аммония и др.).

В организме ДНОК восстанавливается до аминосоединений, которые частично подвергаются ацетилированию. $LD_{50} = 40-85$ мг/кг.

ДНОК применяется в качестве инсектицида и фунгицида для опрыскивания садов, виноградников.

Для **определения** ДНОК применяют ТСХ (реагент – смесь растворов *n*-диметиламинобензальдегида и уксусной кислоты), ГЖХ и ВЭЖХ (УФ-детектор).

ГЛАВА 17

АНАЛИЗ ПИТЬЕВЫХ, СТОЧНЫХ ВОД И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Объектами химико-токсикологического исследования могут быть продукты питания, вода, воздух, земля и др. Обычно исследование таких объектов проводится в токсикологических отделениях Центров гигиены и эпидемиологии.

17.1. Особенности анализа сточных вод

Вода, наряду с окружающим нас воздухом, является наиболее важной основой нашей жизни. Без пищи человек может находиться в течение нескольких недель, а отсутствие воды приводит к смерти через несколько дней. Вода используется для бытовых нужд, в сельском хозяйстве, в промышленности, для производства электроэнергии. Кроме количества потребляемой воды не меньшее значение имеет и ее качество. На качество воды оказывают влияние примеси и это влияние может быть положительным или отрицательным. Химически чистая вода в природных условиях не желательна, так как водоемы без растворенного в них кислорода безжизненны. Питьевая вода без определенного количества солей жесткости не полезна. Однако, в воде могут содержаться и многие примеси, снижающие ее потребительскую ценность. Примеси могут быть как органического, так и неорганического происхождения. К качеству питьевой воды предъявляются определенные требования на содержание солей кальция, магния и др.

Сточные воды (бытовые стоки, производственные и атмосферные), содержащие обычно множество неорганических и органических компонентов, даже в качественном отношении не всегда можно заранее предвидеть.

Из трех основных требований, предъявляемых к аналитическим методам (чувствительность, точность, селективность), важнейшее в анализе вод – селективность. Чувствительность должна быть достаточной. Большая чувствительность необходима лишь тогда, когда аналитик вынужден брать для анализа очень малые навески или объемы.

17.2. Отбор и консервирование проб

При спуске сточных вод в водоемы анализируют не только сами стоки, но и воду в водоеме выше и ниже впадения в него стока.

Посуда для отбора проб должна быть тщательно вымыта хромовой смесью. Для хранения сточной воды нужно пользоваться посудой из стекла «Пирекс» или из полиэтилена.

Если нельзя сразу начать анализ (допускается стояние пробы до 12 часов), то нужно консервировать пробу для стабилизации ее химического состава. Универсального консервирующего вещества не существует.

Пробы для определения связанного азота, окисляемости консервируют, прибавляя серную кислоту (2 мл разбавленной (1:3) кислоты на 1 л). Пробы для определения взвешенных веществ и сухого остатка консервируют, прибавляя 2 мл хлороформа на 1 л. Для определения фенолов сточную воду подщелачивают (5 г NaOH на 1 л).

17.3. Основные показатели качества вод

1. Концентрация ионов водорода (рН) определяется с помощью иономеров (рН-метров). рН-метры предварительно проверяют по стандартным буферным растворам (рН 1,68; 4,01; 6,88; 9,18).

2. Грубодисперсные примеси определяют, пропуская воду через различные материалы (мембранные фильтры, стеклянные, кварцевые или фарфоровые пластинки). Бумажные фильтры не рекомендуются вследствие гигроскопичности фильтровальной бумаги. Методика: фильтр взвешивают на аналитических весах, пропускают воду через фильтр, фильтр с осадком высушивают при 60 °С в течение 1 часа и взвешивают.

3. Сухой остаток определяют как массу остатка, полученного после выпаривания профильтрованной воды и высушивания при 103–105 °С. Эта величина выражает суммарное количество находящихся в воде органических и неорганических веществ.

4. Прокаленный остаток. При прокаливании органические вещества удаляются, а неорганические остаются. Количество прокаленного остатка приближенно указывает на содержание неорганических веществ.

5. Цвет воды определяют измерением ее оптической плотности на спектрофотометре при разных длинах волн (400–760 нм). Например, наличие максимума в спектре при 400–450 нм – желто-зеленая окраска. Имеются соответствующие таблицы.

6. Запах воды (хлорный – запах свободного хлора, фенольный, запах нефти, аптечный, сероводородный, навозный, затхлый, запах гнилого сена, гнилостный и т.д.).

7. Тяжелые металлы (суммарное определение).

Тяжелые металлы (свинец, медь, кадмий, цинк, никель) экстрагируются в виде дитизонатных комплексов. Смесь дитизонатов обрабатывают нитратом ртути (II), при этом дитизонаты перечисленных металлов разрушаются, образуется дитизонат ртути, по количеству которого судят о суммарном содержании тяжелых металлов.

8. Углерод органический. Вещество сжигают, образующийся CO_2 поглощают $\text{Ba}(\text{OH})_2$ и гравиметрически определяют.

9. Азотсодержащие вещества, показывающие положительную реакцию на нингидрин (фиолетовый цвет). Это реакция на алифатические азотсодержащие вещества (амины и имины), аминсахара, amino- и иминокислоты, пептиды и др.

10. Общее содержание серы. Вещества, содержащие серу, окисляют бромом до сульфат-ионов, которые определяют гравиметрическим или другим методом.

17.4. Методы концентрирования микропримесей

Многие известные методы определения органических и неорганических веществ высокочувствительны и их можно применять непосредственно для анализа проб воды. Однако почти во всех методиках анализа сточных вод предусмотрено предварительное концентрирование определяемых веществ из большого объема пробы. Это имеет место при определении токсических веществ, встречающихся в низких концентрациях, ниже предела чувствительности соответствующих реакций или методик.

Концентрирование – сложная и ответственная стадия анализа. Концентрирование может явиться причиной изменения природы определяемых соединений. Однако необходимость концентрирования возникает довольно часто, так как даже такие современные методы анализа как газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия не всегда могут решить задачи органического анализа.

Классификация методов концентрирования

Выделяют три группы методов концентрирования:

1. Дистилляционные методы – простая дистилляция и дистилляция с паром при атмосферном и пониженном давлении, вакуум-дистилляция, фракционная дистилляция, сублимация при высоком вакууме и молекулярная дистилляция;

2. Экстракционные методы – жидкостная экстракция органическими растворителями, одновременная экстракция и дистилляция, экстракция жидким диоксидом углерода, экстракция жидкостями в сверхкритическом состоянии;

3. Разные методы – адсорбция на активном угле, пористых полимерах и силикагеле, извлечение веществ потоком газа в открытой и закрытой системах, лиофилизация, концентрирование замораживанием, гельпроникающая хроматография, ВЭЖХ, получение производных.

Классификация методов концентрирования по принципу распределения вещества между двумя фазами приведена в таблице 17.1.

Таблица 17.1

Классификация методов концентрирования органических соединений

Метод	Фазовое состояние системы в процессе концентрирования	Конечное фазовое состояние концентрата
Абсорбция	Жидкость-газ	Жидкость или газ
Адсорбция, хемосорбция	Жидкость-газ	Твердое тело
Адсорбция, хемосорбция	Твердое тело-газ	Твердое тело или газ
Гель-фильтрация	Жидкость-твердое тело	Твердое тело
Избирательное растворение (выщелачивание)	Твердое тело-жидкость	Жидкость или твердое тело
Испарение, вакуум-отгонка, отгонка с водяным паром, испарение в результате химических превращений	Жидкость-газ	Жидкость или газ
Криогенное концентрирование	Жидкость-газ	Жидкость или твердое тело
Мембранные методы, электроосмос, электродиализ, электрофорез	Жидкость или газ	Жидкость или твердое тело
Направленная кристаллизация, зонная плавка	Жидкость-твердое тело	Твердое тело
Осаждение и соосаждение	Жидкость-твердое тело	Твердое тело
Сублимация	Твердое тело-газ	Твердое тело или газ
Экстракция газовая	Жидкость-газ	Жидкость или газ
Экстракция газовая	Твердое тело-газ	Твердое тело или газ
Экстракция жидкость-	Жидкость-жидкость	Жидкость

жидкостная		
Электролитическое выделение	Жидкость-твердое тело	Твердое тело

Основные методы концентрирования следов органических веществ из вод – экстракция с последующим удалением растворителя, сорбция на гидрофобных сорбентах; газовая экстракция (извлечение летучих веществ из водных растворов инертным газом). Реже используется испарение, вымораживание, лиофилизация и мембранные методы (диализ и обратный осмос). Выбор метода концентрирования зависит от свойств определяемого компонента, ожидаемой концентрации и чувствительности метода определения.

Выпаривание

Это наиболее простой и доступный метод, с помощью которого можно увеличить концентрацию растворенных веществ в 10–1000 раз. Но этот метод имеет недостатки:

- 1) концентрируются макроэлементы, которые при высоких концентрациях мешают определению;
- 2) выпадают осадки, адсорбирующие микропримеси;
- 3) при выпаривании теряются летучие вещества.

Методы испарения могут применяться для концентрирования высокомолекулярных ионизированных соединений. Хотя известно, что некоторые высококипящие соединения могут давать с водой низкокипящие азеотропы. Уменьшить потери при выпаривании можно, если вести выпаривание в присутствии труднолетучей полярной жидкости типа поливинилового спирта, диолов и т.п.

Методы испарения применяются чаще всего в варианте роторного испарения в вакууме, остаток растворяют в метаноле и раствор анализируют.

Отгонка микрокомпонента

Метод применяется в случаях разной летучести микрокомпонентов и матрицы.

Отгоняются летучие вещества (аммиак, альдегиды, кетоны, спирты, фенолы, летучие кислоты) или компоненты, которые можно превратить в летучие (фтор в виде SiF_4 , цианиды в виде HCN).

Применение вакуум-отгонки предотвращает разложение летучих микрокомпонентов, а при отгонке в токе инертного газа не происходит окисления микрокомпонентов.

В методе отгонки в результате химических превращений нелетучие формы органических соединений переводят в летучие, лабильные формы – в устойчивые летучие. Сочетание такого метода концентрирования с газовой хроматографией – реакционная газовая хроматография.

Соосаждение

Один из наиболее эффективных методов концентрирования при определении неорганических веществ. Например, соосаждение на CaCO_3 (Zn, Cu, Ni и др.). Предложены органические коллекторы: это осадки, образующиеся при введении в раствор органического катиона (метиловый фиолетовый, метиленовый синий) и органического аниона (танин, арсеназо, стильбазо и др.). Такие осадки захватывают микрокомпоненты, их можно сжечь, растворить в нескольких каплях кислоты, получить концентрированный раствор.

Жидкость-жидкостная экстракция

Методом экстракции выделяют из воды неполярные, малополярные и слабодиссоциирующие соединения. Условия экстракции зависят от многих факторов: pH, температура, продолжительность экстракции, введение высаливателей; наличие, количество и природа заместителей в молекуле вещества, а также возможность таутомерных превращений молекул вещества.

Концентрирование обычно проводят из 0,5–1 л воды. Конечный объем экстракта 50–200 мл упаривают до 0,5–1 мл, что иногда приводит к значительным потерям летучих веществ. Поэтому микроэкстракция имеет значительный интерес, т.е. однократная экстракция малым объемом растворителя из 5–10 мл. Например, микроэкстрактивное концентрирование тригалогенметана эффективно при анализе питьевой воды (2–5 мл пентана или гексана, 5–100 мл воды).

Одновременное использование высаливателей (NaCl , Na_2SO_4) и сольвотронных реагентов (камфора, трибутилфосфат и диалкилфосфат) значительно повышает коэффициент распределения фенолов.

Экстракционное концентрирование используется для определения ПАУ на уровне n нг/л. В качестве экстрагентов используют гексан, циклогексан, смеси CHCl_3 - CCl_4 и др. Эффективность концентрирования ПАУ методами экстракции и сорбции на микроколонке Sep-Pak C_{18} сопоставима: степень извлечения составляет 78–92 и 84–96% соответственно.

Жидкость-жидкостная экстракция. В качестве экстрагентов для группового концентрирования применяются гексан, хлороформ, метиленхлорид, диэтиловый эфир, циклогексан и др. Применяют и смесь органических растворителей, например, метиленхлорид и диэтиловый эфир (7:3). Если проводить экстракцию из кислых и щелочных растворов, а затем объединять экстракты, то наблюдается большее извлечение веществ.

На экстракционное равновесие влияет высаливание и всаливание. Применением высаливателей (MgCl_2 , NaCl , NaNO_3 и др.) извлекают фенолы, фосфамид, третичные амины, неионогенные синтетические ПАВ. Хотя всаливающий эффект менее изучен, однако известно, что мочеви-

на, уротропин, этиленгликоль, карбоновые кислоты снижают извлечение некоторых веществ.

К экстрагентам для концентрирования микропримесей предъявляются жесткие требования: хорошо извлекать определяемое вещество или группу веществ; иметь малую растворимость в воде, высокую температуру кипения (не ниже 50 °С). Экстрагент не должен взаимодействовать с компонентами исследуемой системы и плотность его должна значительно отличаться от плотности анализируемого раствора.

Предложены комбинированные методы экстракционного концентрирования. Например, анализируемый раствор предварительно вымораживают, а затем проводят экстракцию. Катионит КУ-23 и сорбент полисорб-1 прочно удерживают эффективные экстрагенты фенолов (трибутилфосфат, триалкиламины), что позволяет получать меньший объем экстрагента, и, соответственно, снижает нижнюю границу определяемых содержаний.

Предложены методы концентрирования ПАВ в виде ионных ассоциатов с последующим анализом концентратов фотометрическим, флуоресцентным, атомно-эмиссионным и атомно-абсорбционным методами. Для выделения анионных ПАВ в виде ассоциатов используют катионные красители (акридиновый оранжевый, метиленовый голубой, метиленовый зеленый, этилвиолет и др.), катионные комплексы Cu(II) с этилендиамином, а также дибензо-18-краун-6 в присутствии K^+ . Эти методы используются для определения суммарного содержания анионных ПАВ, коэффициент концентрирования зависит от прочности ассоциатов и коэффициента их распределения между водой и экстрагентом.

Неионогенные ПАВ экстрагируют дихлорэтаном в виде ассоциатов с пикратом калия. Степень извлечения и чувствительность определения значительно повышается, если вместо пикрата калия применяют тетрабромфенолфталеин и экстракцию проводят о-дихлорбензолом.

Наиболее известный метод определения анионных ПАВ основан на экстракции ассоциатов ПАВ с комплексами медь(II)-этилендиамин с последующим анализом экстракта методом электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (предел обнаружения составляет 0,3 мкг/л).

При экстракции достигается относительное концентрирование определяемых веществ. При отгонке органического растворителя достигается абсолютное концентрирование. В полученных концентратах определяют вещества в основном хроматографическими методами.

При замене органических растворителей на жидкий диоксид углерода достигается избирательное растворение микроэлементов, содержащихся в сложных по составу объектах (растительные и животные ткани, биологические объекты и др.). Избирательное растворение жидкостью в сверхкритическом состоянии использовано при концентриро-

вании следов полихлорированных бифенилов и полициклических углеводородов.

Сорбционное концентрирование.

Сорбционные методы выделения примесей из воды основаны на распределении их между жидкой и твердой фазами. Для сорбционного концентрирования в аналитических целях широко применяются макропористые пористые синтетические сорбенты, синтезируемые на основе стирола и дивинилбензола, иногда с добавкой других мономеров. Применяются сорбенты неполярные (амберлиты ХАД-1,2,4), средней полярности (содержащие нейтральные фосфорильные амберлиты ХАД-7 и 8) и высокополярные (содержащие амидные группы и нитрозогруппы амберлиты ХАД-11 и 12). Наибольшее распространение получили неполярные сорбенты, при применении которых осуществляются в основном дисперсионные взаимодействия, причем энергия связи веществ в этом случае ниже связи с поверхностью активного угля, поэтому легче осуществляется десорбция извлеченных веществ. Аналогом амберлита ХАД-2 являются выпускаемые синтетические смолы Полисорб 42/100. Эти сорбенты применяются в ГЖХ.

Методика концентрирования примесей сорбцией на синтетических сорбентах состоит из этапов подготовки смолы, сорбции, десорбции и подготовки элюата к дальнейшей работе.

Необходима очистка смолы от исходных мономеров, побочных продуктов полимеризации. Это достигается обработкой смолы органическим растворителем в аппаратах Сокслета. После подготовки смолы хранят под слоем растворителя, хорошо смешивающегося с водой (метанол). Процесс сорбции проводят в колонках (10–20 см и 1 см диаметр), заполненных сорбентом.

Десорбция с нейтральных сорбентов осуществляется метанолом или эфиром. Если содержание определяемых веществ в элюате мало, то элюат высушивают над прокаленным сульфатом натрия, а затем упаривают растворитель.

К сорбционным методам относят абсорбцию, десорбцию, хемосорбцию и капиллярную конденсацию. В адсорбционных методах наиболее широко применяют пористые полимеры (тенакс GC, хромосорбы, порпаки, смолы ХАД).

Тенакс GC является лучшим сорбентом для концентрирования следов органических веществ из воздуха. Высокая термическая устойчивость (350–400 °С) тенакса GC облегчает осуществление термодесорбции.

Недостатком немодифицированных силикагелей при концентрировании органических веществ из воздуха является сорбция воды. Введение неполярных групп в структуру силикагелей снижает сорбцию воды. Основными достоинствами химически модифицированных силикагелей при сорбционном концентрировании органических веществ из

вод являются: высокая скорость установления равновесия, механическая прочность и ненабухаемость частиц сорбента, полнота десорбции органических соединений малыми объемами растворителей.

Наиболее широко в настоящее время применяются полимерные сорбенты и реже неорганические сорбенты типа силикагелей.

Лучшим сорбентом для концентрирования хлор- и фосфорсодержащих пестицидов является тенакс GC. Полиуретановые пены эффективны для концентрирования кислот и пестицидов. Сорбенты на основе сополимера «стирол-дивинилбензол» применяют для концентрирования ароматических углеводородов, хлорорганических соединений, фенолов, хлорфенолов, ФОС, карбоновых и гуминовых кислот.

Концентрирование на сорбентах осуществляют в три этапа: пропускание потока воды через сорбент, элюирование сорбированных веществ малым объемом растворителя, очистка элюата и удаление растворителя из концентрата.

Для концентрирования органических соединений используют макропористые полимерные сорбенты (амберлиты XAD, тенакс GC, полисорбы, хромосорбы серии 100, порапак), синтетические иониты, химически модифицированный силикагель, полиуретановую пену, материалы на основе фторопласта и полипропилена.

На амберлитах XAD концентрируют различные органические соединения: алканы, кетоны, спирты, ароматические углеводороды, фосфорорганические пестициды, фенолы, нитрофенолы, ксилолы, хлорорганические пестициды и полихлорбифенилы.

Предложены способы одновременного извлечения из воды и концентрирования органических соединений разных классов с использованием смеси сорбентов: XAD-2/ XAD-4/ XAD-7 или XAD-4/ XAD-8, а также XAD-2/ XAD-7. При использовании амберлитов XAD возможно загрязнение проб продуктами их деструкции. Поэтому требуется тщательная очистка сорбентов.

Хромосорб-102, полисорб-1 и порапак-Q являются аналогами по химической структуре, природе и сорбционным свойствам XAD-2; широко применяются для концентрирования пестицидов различных классов.

Синтетические аниониты на основе XAD-4 применяются для концентрирования соединений кислотного характера (уксусная и стеариновая кислота, анионные ПАВ). Для концентрирования алифатических и ароматических аминов, гетероциклических соединений используется катионит на основе XAD-4.

Микроколоники, заполненные химически модифицированным силикагелем или ионитами типа XAD с размером частиц 5–10 мкм, имеют ряд достоинств: простота изготовления и замены сорбента, экономичность, высокая скорость потока, возможность проводить десорбцию малыми объемами растворителя. Определение выделенных орга-

нических веществ проводят методами газовой хроматографии или ВЭЖХ.

Концентрирование органических веществ на неорганических коллекторах применяется редко и проводится в режимах сорбции, или соосаждения. В качестве осадков (коллекторов) могут быть гидроксиды, сульфаты, фосфаты, карбонаты, хроматы и другие труднорастворимые соли. Чаще применяют гидроксиды железа и алюминия.

Степень извлечения анионных ПАВ, цетилпиридиния бромид, пальмитиновой кислоты, гексадецилсульфата натрия, диоктилфталата на гидроксидах алюминия и железа достигает 90–100 %. Сорбционная емкость осадка гидроксида алюминия в 2–3 раза больше сорбционной емкости гидроксида железа из-за различной удельной поверхности.

Предложено нанесение гидроксидов на синтетические полимерные сорбенты.

Газовая экстракция. Газовая экстракция (stripping) проводится как из жидкого, так и из твердой (реже) фаз. Дискретная газовая экстракция осуществляется порциями газа в замкнутом сосуде и применяется в случаях, когда макро- и микрокомпоненты значительно различаются по своей летучести. В непрерывной газовой экстракции через жидкость и над поверхностью конденсированной фазы проходит поток инертного газа. При непрерывной газовой экстракции летучих веществ, извлекаемых потоком инертного газа и собираемых в адсорбционных или криогенных ловушках, мешает вода. Поглощение микрокомпонентов более летучим растворителем упрощает процесс концентрирования. Например, при определении ароматических углеводородов в водах в качестве поглотителя используют уксусную кислоту.

Распределение веществ в газовой экстракции зависит от многих факторов: температура, давление пара каждого компонента, газ-носитель, время контакта, pH, ионная сила раствора. Объем продуваемого газа должен превышать объем раствора примерно на 4 порядка.

В качестве газа-носителя применяют воздух, реже – водяной пар, кислород, пропан, бутан.

Поглощение извлеченных веществ проводят разными способами: твердым сорбентом, раствором или криогенным способом. В качестве сорбентов используют полисорб-1 и термически устойчивый тенакс GC. Десорбцию проводят путем элюирования смесью сероуглерод-бензол-метанол (65:30:5) или термически непосредственно в хроматографе.

Методом газовой экстракции выделяют углеводороды C₂-C₅, галогенметаны, амины, нейтральные соединения и др.

Наиболее широко применяется такой вариант газовой экстракции: извлечение летучих веществ инертным газом – сорбция на тенаксе GC → термическая десорбция → криогенное концентрирование в верхней части колонки – газохроматографическое определение. Пред-

ложены и другие варианты газовой экстракции: определяемые компоненты десорбируют с тенакса GC или полисорба органическими растворителями с последующим концентрированием в криогенной ловушке.

Мембранные методы. При обработке больших объемов воды мембранные методы (ультра- и микрофльтрация, осмос, обратный осмос, диализ) являются наиболее перспективными для концентрирования органических веществ. Для этих методов характерны высокие коэффициенты концентрирования и возможность фракционирования выделенных веществ по молекулярной массе.

В качестве материала для изготовления мембран чаще всего используют ацетилцеллюлозу. Предложены также полиамидные, полиакрилонитрильные, полидиметилсилоксановые мембраны.

Ультрафилтрационное концентрирование заключается в продавливании раствора через мембрану под небольшим избыточным давлением или некотором разряжении. В этом случае большие молекулы ($M.м. \leq 1000$) остаются в растворе, а неорганические соли и более легкие органические вещества уходят в фильтрат.

В методе обратного осмоса, идущего при сравнительно высоком давлении, применяют композитные мембраны с повышенной механической устойчивостью (химически модифицированное пористое стекло, триацетат целлюлозы, полиуретаны и др.). В этом методе органические вещества с молекулярной массой более 200 не проходят через мембрану. Степень извлечения веществ зависит от давления, а для ароматических кислот и от степени диссоциации, так как недиссоциированные арильные соединения сорбируются мембраной.

Криогенное (низкотемпературное) концентрирование основано на конденсации газо- или парообразных микрокомпонентов при охлаждении до температуры, при которой газ (пар) переходит в жидкое или твердое состояние. Этот метод обеспечивает значения коэффициентов концентрирования 10^2-10^4 . В ловушках находится инертный материал или адсорбент. В качестве ловушки может быть и металлическая петля, вмонтированная в газовый кран или начальный участок хроматографической колонки.

Криогенное концентрирование используется при анализе воздуха на содержание спиртов, альдегидов, кетонов, простых и сложных спиртов, ароматических углеводородов. В качестве хладагента используют фреон 12 (дихлордифторметан), позволяющий избежать вымораживания кислорода. Нагревание ловушки (петля из нержавеющей стали) обеспечивало перевод концентрата в паровую фазу и анализ проводился методом газовой хроматографии.

17.5. Химическое и биохимическое потребление кислорода

Химическое потребление кислорода (ХПК) – это то количество кислорода в мг/мл или окислителя в расчете на кислород, которое необходимо для полного окисления содержащихся в пробе органических веществ. Наиболее точный (арбитражный) метод – дихроматный. Органические вещества окисляются дихроматом калия, избыток дихромата оттитровывают солью Мора.

Биохимическое потребление кислорода (БПК) – это то количество кислорода, выраженное в мг, требуемое для окисления находящихся в 1 л сточной воды органических веществ в результате происходящих в воде биологических процессов. БПК не включает расход кислорода на нитрификацию, т.е. превращение аммонийных ионов в нитрит-, а потом в нитрат-ион. Этот процесс совершается под действием специфических нитрифицирующих микроорганизмов и осуществляется тогда, когда большая часть органических веществ уже окислена. Для подавления жизнедеятельности нитрифицирующих микроорганизмов в раствор вводят этилентиокарбамид, аллилтиокарбамид и др. **Суть метода:** сточную воду отстаивают 1–2 часа и разбавляют чистой водой, взятой в таком количестве, чтобы содержащегося в ней кислорода хватило для полного окисления всех органических веществ в сточной воде. Определив содержание растворенного кислорода в полученной воде, ее оставляют закрытой на 2, 3, 5, 10 суток, определяя содержание кислорода по истечении каждого из перечисленных периодов времени. Уменьшение количества кислорода в воде показывает, сколько его за это время израсходовано на окисление органических веществ, находящихся в сточной воде. Это количество, отнесенное к 1 л сточной воды, и является биохимическим потреблением кислорода сточной водой за 2, 3, 5 и 10 суток, т.е. БПК₂, БПК₃, БПК₅, БПК₁₀. Стандартной принята продолжительность инкубации, равная 5 суткам, при 20 °С без доступа воздуха и света. Потребление кислорода, определяемое в этих условиях, называется пятисуточным биохимическим потреблением кислорода – БПК₅.

Содержание растворенного кислорода (в мг/мл) определяют иодометрическим методом Винклера: в анализируемую воду вводят соль Mn^{2+} и NaOH, при этом выделяется осадок $Mn(OH)_2$. Гидроксид марганца (II) окисляется кислородом до $MnO_2 \cdot H_2O$. Затем к осадку добавляют H_2SO_4 и KI, осадок растворяется и в растворе находятся Mn^{2+} и I_2 . Выделившийся иод оттитровывают $Na_2S_2O_3$. Известны и другие методы определения растворенного кислорода.

17.6. Определение металлов

Предварительная обработка пробы. Если проба содержит большое количество органических веществ, то их нужно удалить (сухое и мокрое сжигание).

Сухое сжигание: порцию воды выпаривают на водяной бане досуха, затем сухой остаток прокаливают в муфельной печи. Остаток после прокаливания растворяют в концентрированной HCl.

Мокрое сжигание: выпаривают, прибавляют концентрированную HNO₃ и нагревают, упаривают жидкость досуха. Сухое и мокрое сжигание органических веществ применяют в основном при определении щелочных и щелочноземельных металлов.

Тяжелые металлы: Pb, Cu, Cd, Zn, Cr, Ni, Co, Mn, Fe, Hg – присутствуют в сточных водах тяжелой и легкой промышленности, в шахтных водах. Очень важной особенностью тяжелых металлов является их способность вступать во взаимодействие с органическими веществами с образованием устойчивых комплексных соединений. С учетом этого проба предварительно обрабатывается реагентами, разрушающими эти комплексы. Для разрушения органических веществ применяют раствор гипохлорита, смесь конц. HNO₃ и 30% H₂O₂. В полученном растворе определяют Fe, Cd, Ni, Hg, Pb, Ag атомно-абсорбционным, атомно-эмиссионным, рентгеноструктурным или фотометрическим методами. При содержании больших количеств металлов применяется титриметрия (комплексометрия), в основном для Ca, Mg.

Фотометрическое определение металлов проводят с применением органических реагентов: Bi (диэтилдитиокарбаминат), Fe (1,10-фенантролин, сульфосалицилат натрия), Cd (дитизон), Co (нитрозо-R-соль), Cu (диэтилдитиокарбаминат свинца), Ni (диметилглиоксим), Sn (пирокатехиновый фиолетовый), Hg (дитизон), Zn (дитизон или родамин 6Ж).

17.7. Определение органических веществ

Определение органических веществ на уровне n мкг/мл – n нг/мл в природных и сточных водах решается сочетанием чувствительных и селективных методов определения с предварительным концентрированием.

Методы определения как и методы концентрирования могут быть избирательными и групповыми. Неизбирательный метод определения применяются при избирательном концентрировании. Избирательный метод определения применим как при групповом (смесь несложная), так и при избирательном концентрировании. Если состав концентрата не очень сложный, то для анализа применяют такие методы как спек-

трофотометрия, флуориметрия, титриметрия, инверсионная вольтамперометрия, ТСХ, газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография. При анализе концентратов, содержащих смесь микрокомпонентов, используют хроматографические методы (в том числе хромато-масс-спектрометрию), а также ИК-спектрометрию с Фурье-преобразователем.

Сочетание газохроматографического метода с концентрированием летучих веществ значительно расширило возможности этого метода.

ВЭЖХ успешно применяется в анализе концентратов, полученных методом экстракции. Например, определение фенолов в водах после их экстракции бутилацетатом, а также афлатоксинов и их метаболитов после экстракции хлороформом из пищевых продуктов.

Методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) анализируют концентраты, выделенные из объектов окружающей среды, пищевых продуктов, биологических объектов. ХМС применяется при определении пентахлордibenзофуранов и хлорированных дibenзо-*p*-диоксинов в воздухе, фосфорорганических инсектицидов в биологических объектах, неионогенных ПАВ в водах, полихлорированных бифенилов.

Из других инструментальных методов следует отметить применение анодной вольтамперометрии. При использовании в качестве электродов углеродных материалов анодная вольтамперометрия применяется для концентрирования и определения фенолов, комплексонов, серосодержащих и карбоциклических соединений.

В настоящее время концентрирование и определение органических веществ проводится с использованием автоматических анализаторов, осуществляющих отбор проб, разделение и концентрирование, измерение и обработку результатов.

Разработка методов определения органических веществ идет по двум направлениям:

1. Поиск методов определения каждого индивидуального вещества. В настоящее время аналитики усиленно решают эту задачу благодаря применению различных методов хроматографии, конструированию сложных комбинированных приборов, в которых за хроматографическим разделением веществ следует идентификация с помощью масс-спектрометрии, ИК-спектрометрии. Но широкому применению этих методов препятствуют: 1) высокая стоимость аппаратуры и недоступность ее для огромного числа лабораторий; 2) необходимость большого набора химических чистых веществ, которые являются стандартами; 3) самое важное- почти полное отсутствие сведений о том, как ведет себя то или иное определяемое органическое вещество в процессе химической или биохимической очистки вод.

2. Поэтому исследования развиваются по второму направлению: разработка доступных методов определения как отдельных компонен-

тов вод, так и суммарного содержания различных групп органических веществ. При этом **основным является разработка методов выделения органических веществ из вод.** Для анализа вод разработаны определенные схемы анализа, основанные на последовательной экстракции определяемых веществ различными органическими растворителями при соответствующих значениях рН растворов. Полученные фракции анализируют в основном известными методами. Предварительно отделяют методом дистилляции летучие с паром нейтральные соединения. Среди летучих соединений – амины (алифатические и ароматические), ароматические углеводороды (бензол, толуол, стирол и др.), ацетон, дихлорэтан.

При определении летучих органических веществ применяется как статический анализ равновесного пара (АРП), так и динамический АРП. В статическом варианте АРП равновесие между газовой и конденсированной фазами устанавливается в замкнутой системе. Анализ паровой фазы используется при определении соединений с низкими значениями коэффициентов распределения. Проведение анализа в оптимальных условиях (рН, температура, введение высаливателей) и применение высокочувствительных детекторов позволяет достигать чувствительности определения до 5 нг/л. Разработаны высокочувствительные методики определения бензола, толуола, дихлор-1,3-пропана, дибром-1,2-пропана, дихлор-1,4-бутана в водах.

В динамическом АРП контакт между фазами осуществляется при пропускании инертного газа (газовая экстракция – stripping) через слой анализируемой воды в открытой или закрытой системе. Затем летучие вещества извлекают из потока газа и анализируют методом газовой хроматографии. Результаты газохроматографического определения галогенпроизводных углеводородов (CH_2Cl_2 , CHCl_3 , CCl_4 , $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$, $\text{CHCl}_2-\text{CHCl}_2$ и др.), полученные с использованием экстракционного концентрирования и газовой экстракции, сопоставимы: одинаковые пределы обнаружения, широкий диапазон определяемых концентраций (три порядка). Использование криогенной ловушки для концентрирования выделенных соединений и анализ методом газовой хроматографии с применением детектора электронного захвата позволяет определять летучие вещества с чувствительностью 1 нг/л.

Пестициды, как хлорорганические, так и ФОП, определяют методом ГЖХ и ТСХ.

Синтетические ПАВ (анионные и катионные) определяют спектрофотометрическим методом: анионные – с метиленовым синим дают ассоциаты, растворимые в CHCl_3 ; КПАВ (катионные детергенты) – экстракционно-фотометрическое определение с бромфеноловым синим (желтая окраска).

Спектрометрическим методом определяют формальдегид (с хромотроповой кислотой); фурфурол – с анилином в присутствии конц.

уксусной кислоты (красное окрашивание); хлороформ (реакция Фудживара).

Нефтепродукты определяют турбидиметрическим (нефть пропускают через активированный уголь, затем десорбируют ацетоном, смешивают с раствором желатина и измеряют оптическую плотность) и ГЖХ методами. Экстракцию проводят CCl_4 или пентаном. Экстракт вводят в колонку газового хроматографа, изменение температуры программируется от $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $320\text{ }^{\circ}\text{C}$.

17.8. Анализ пищевых продуктов

В лабораториях СЭС наряду с анализом вод определяют токсические вещества в пищевых продуктах как растительного, так и животного происхождения.

Изучая тетраэтилсвинец, мы рассматривали метод его изолирования из пищевых продуктов (перегонка с водяным паром при анализе продуктов животного происхождения, экстракция – при анализе продуктов растительного происхождения), а затем разрушение ТЭС прибавлением йода. Определение свинца проводят с применением известных фотометрических реакций или атомно-абсорбционным методом.

Определение тяжелых металлов в пищевых продуктах проводится после минерализации пробы (например, анализ консервированных продуктов на содержание меди, свинца.). Непосредственное определение тяжелых металлов в пищевых продуктах невозможно, так как тяжелые металлы образуют прочные комплексные соединения с органическими веществами.

Изолирование токсических неорганических соединений из пищевых продуктов проводят способами сухой, мокрой минерализации, а также способом кислотной экстракции.

Способ сухой минерализации основан на полном разложении органических веществ путем сжигания пищевых продуктов в электропечи при контролируемом температурном режиме ($150\text{--}450\text{ }^{\circ}\text{C}$) и предназначен для всех видов сырья и продуктов, кроме животных, растительных жиров и масел.

При мокрой минерализации разрушают органические вещества при нагревании с серной, азотной концентрированными кислотами с добавлением хлорной кислоты или пероксида водорода. Метод предназначен для всех видов сырья и продуктов, кроме сливочного масла и животных жиров.

Способ кислотной экстракции (неполной минерализации) основан на экстракции токсических элементов из пробы продукта кипячением с разбавленными соляной и азотной кислотами. Предназначен для растительного и сливочного масел, маргарина, пищевых жиров.

Определение токсических элементов в полученных минерализатах проводят спектрофотометрическим, полярографическим, атомно-абсорбционным и атомно-эмиссионным методами.

Из органических веществ наиболее часто в пищевых продуктах определяют пестициды. Основные приемы определения ХОС и ФОП рассмотрены в главе 16, изолирование проводят методом экстракции органическими растворителями.

В токсикологических лабораториях проводят определение нитратов при анализе продукции растениеводства, пищевой промышленности. Для этой цели широко применяется потенциометрия с использованием ионселективных электродов.

Кто думает, что постиг всё,
тот ничего не знает.
Лао-Цзы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подготовка специалистов с высшим фармацевтическим образованием предусматривает получение базовых знаний по основам токсикологической химии, так как провизоры после обучения в интернатуре имеют право работать в должности медицинского судебного эксперта-химика.

Основным разделом токсикологической химии является аналитическая токсикология. Поэтому в настоящем пособии наряду с рассмотрением общих вопросов по токсикологической химии, токсикокинетики и биотрансформации чужеродных соединений в организме значительное внимание в соответствии с программой по токсикологической химии уделено методам выделения, обнаружения и количественного определения чужеродных соединений в биологических объектах. Вместе с тем, изучение токсикологической химии позволяет студентам фармацевтического факультета получить необходимое представление о потенциальной опасности лекарственных средств при неправильном применении, передозировке или злоупотреблении.

Выбор метода выделения и определения токсического вещества зависит от вида биологического объекта, природы и свойств определяемого вещества (летучесть, термоустойчивость, растворимость в воде или органических растворителях и др.). В химико-токсикологическом анализе в зависимости от свойств определяемых токсикантов для выделения их из биологических объектов используют методы минерализации, перегонки с водяным паром, твердо-жидкостной, жидкость-жидкостной, твердо-фазной экстракции и другие. Для обнаружения токсикантов после пробоподготовки используют химические, физико-химические, иммунохимические и другие методы. Спектрометрические методы просты в исполнении, но не отличаются высокой чувствительностью и специфичностью при определении органических токсикантов. Поэтому для обнаружения и количественного определения лекарственных и наркотических веществ широко применяются хроматографические методы.

Основное ограничение метода газовой хроматографии – требование летучести и термоустойчивости определяемых соединений. Перевод нелетучих соединений в летучие значительно усложняет анализ. Однако метод газовой хроматографии имеет ряд достоинств: нет необходимости использования значительного количества специально очищенных растворителей, высокая чувствительность и избирательность метода, малый объем вводимой пробы, газовые хроматографы дешевле

жидкостных хроматографов. Актуальным направлением в развитии газовой хроматографии является создание высокоскоростных и портативных газовых хроматографов, использующих атмосферный воздух вместо специальных газов-носителей в баллоне под высоким давлением. Вакуум-насос, устанавливаемый после колонки, позволяет осуществлять поток подвижной фазы.

ВЭЖХ в последние годы становится наиболее востребованным методом. Это объясняется следующими особенностями метода: отпадают требования по летучести и термоустойчивости определяемых веществ, обращенно-фазовая ВЭЖХ позволяет работать с водными растворами, выбор более специфического способа детектирования позволяет повысить избирательность метода. Однако метод ВЭЖХ также имеет определенные недостатки: существующие методы детектирования не обладают высокой чувствительностью, требуется применение большого количества дорогих высокочистых растворителей, жидкостные хроматографы дороже газовых, наполнение колонок производится в заводских условиях. Основными тенденциями развития ВЭЖХ являются минитюаризация, сокращение времени анализа. Применение микроколонок позволяет работать с пробами менее 1 мкл.

Возрастает роль практического применения сверхкритической флюидной хроматографии, особенно в области анализа лекарственных средств и полупродуктов их синтеза. Интенсивно развивается новое направление колоночной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ при сверхвысоких температурах и давлениях. Например, смесь алкилфенолов при сверхвысоких температурах можно разделить значительно быстрее (примерно в 50 раз), чем в обычной ВЭЖХ. Применение перегретой (до 190 °С) воды вместо водно-органической смеси в обращенно-фазовой ВЭЖХ позволяет использовать для детектирования метод ЯМР ^1H .

Более простым, дешевым и доступным является метод ТСХ. К основным достоинствам ТСХ можно отнести: низкая стоимость оборудования и материалов, возможность разделения многих образцов на одной пластине, возможность сохранения пластины с разделенными образцами и последующим детектированием веществ, легкость смены растворителей для оптимизации селективности. Способы детектирования в ТСХ постоянно совершенствуются. Кроме традиционных спектрофотометрического и флуориметрического методов в настоящее время применяются масс-спектрометрическое детектирование с лазерной десорбцией-ионизацией, а также сканирующая лазерная денситометрия. Недостатками ТСХ являются более низкая чувствительность по сравнению с колоночной жидкостной хроматографией, ограниченная разрешающая способность из-за малой протяженности разделяющего участка, зависимость результатов разделения от окружающей среды в связи с использованием «открытой» системы.

Сочетание методов хроматографии и масс-спектропии позволяет резко увеличить объем извлекаемой информации о веществе. Возрастает роль комбинации жидкостная хроматография – масс-спектрометрия.

Методом электрофореза можно определять низкомолекулярные ионы в биологических жидкостях. Динамический диапазон при определении катионов и анионов в биологических жидкостях составляет 3 порядка. Метод МЭКХ (мицеллярная электрокинетическая хроматография) дает возможность определять и нейтральные молекулы (например, фенолы).

Хроматографические, спектрометрические, химические и другие методы анализа взаимно дополняют друг друга и в зависимости от цели исследования и свойств анализируемого объекта выбирают конкретные методы.

Знание методологии химико-токсикологического анализа, методов выделения и определения токсикантов в биологическом материале позволит будущим провизорам проводить химико-токсикологические исследования, задачей которых является помощь судебно-медицинской и токсикологической службе в диагностике отравлений, а также составление научно-обоснованного доказательства виновности или невиновности обвиняемых.

ГЛОССАРИЙ

Алгоритм – описание последовательности выполнения операций, обеспечивающих решение определенных задач.

Антиген – вещество, способное вызывать биосинтез специфических антител в организме.

Антигенность – способность образовывать комплексы (конъюгаты) с антителами.

Антитела – иммуноглобулины (специфические антитела крови).

Аффинность антител – равновесная константа образования комплекса антиген-антитело.

Батохромный сдвиг – сдвиг максимума поглощения в сторону более длинных волн.

Гаптен – вещество, не способное вызывать образование антител, но после конъюгирования с высокомолекулярными веществами приобретает иммуногенные свойства.

Гематоэнцефалический барьер – физиологический механизм, избирательно регулирующий обмен веществ между кровью и ЦНС.

Гидрофильная хроматография – жидкостная хроматография на полярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водно-органические растворы и разделение смеси веществ происходит в результате различия в их взаимодействии с полярными группами сорбента в условиях убывающего градиента органического модификатора в элюенте.

Гидрофобная хроматография – жидкостная хроматография на неполярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водные или водно-органические буферные растворы и разделение смеси веществ происходит в результате различия в их взаимодействии с гидрофобными группами сорбента в условиях убывающего градиента солей в элюенте.

Гипсохромный сдвиг – сдвиг максимума поглощения в сторону более коротких длин волн.

Градиентная хроматография – элюентная хроматография, при которой состав смешанной подвижной фазы в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Изократическая жидкостная хроматография – элюентная хроматография, при которой состав подвижной фазы сохраняется постоянным на протяжении всего процесса разделения компонентов.

Капиллярная жидкостная хроматография – колоночная хроматография, в которой используют капилляры с внутренним диаметром $\leq 0,5$ мм.

Ксенобиотик – чужеродное вещество, введенное в организм.

Микроколоночная хроматография – жидкостная колоночная хроматография, в которой используются колонки с внутренним диаметром ≤ 2 мм.

Многоколоночная хроматография – способ хроматографии, при котором разделяемая смесь веществ пропускается через две или более последовательно соединенные колонки с неподвижными фазами различной химической природы.

Монохроматическое излучение – излучение, имеющее определенную длину волны и одинаковую энергию квантов.

Нормально-фазовая хроматография (НФХ) – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная фаза.

Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная. Это вариант распределительной хроматографии, в котором используют сорбенты с привитыми неполярными (длинные алкильные и алкилсилильные) группами и полярный растворитель (водно-метанольные или водно-ацетонитрильные смеси).

Опиат – фармакологически активное вещество, например морфин, получаемое из опиума.

Перекрестная реактивность (кросс-реактивность) - связывание структурно-родственных веществ.

Психоактивный – воздействующий на головной мозг и оказывающий влияние на поведение; психотропный.

Толерантность (в токсикологии и фармакологии) – снижение чувствительности к лекарственным и наркотическим средствам.

Трейсер (трассер) – меченный флуоресцеином гаптен.

Характеристические полосы поглощения – полосы поглощения некоторых групп атомов, поглощающие ИК-излучение в узком интервале частот независимо от структуры остальной части молекулы.

Хроматография с программированием давления – элюентная хроматография, при которой давление подвижной фазы в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Хроматография с программированием температуры – элюентная хроматография, при которой температуру колонки в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Электрофорез – метод разделения смеси веществ, основанный на различии в электрофоретической подвижности их ионов в растворе электролита, помещенного в электрическое поле.

Энантиоселективная (хиральная) хроматография – хроматография, в которой разделение энантиомеров происходит за счет энантиоселективности их взаимодействия с хиральными компонентами (хиральными селекторами) неподвижной и (или) подвижной фазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ наркотических веществ в физиологических жидкостях человека методом латексной агглютинации / Н.А. Солодухина [и др.] // Вестник МИТХТ. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 93 – 96.
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. / Р.Кельнер [и др.] // М.: «Мир» «Аст», 2004. – Т.1. – 606 с., Т.2 – 728 с.
3. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа / Под ред. проф. О.М. Петрухина. – М.: Химия, 2001.– 496 с.
4. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский [и др.] // М.: Химия, 1993. – 464 с.
5. Байерман, К. Определение следовых количеств органических веществ / К. Байерман. – М.: Мир, 1987. – 482с.
6. Белова, А.В. Руководство к практическим занятиям по токсикологической химии / А.В. Белова // М.: Медицина, 1976. – 231с.
7. Богданов, А.В. Определение органических соединений в волосах человека / А.В. Богданов [и др.] // Журнал аналит. химии. – 2006. – Т.61, № 10. – С. 1014. – 1031.
8. Борисевич, С.Н. Организация лабораторной диагностики острых отравлений / С. Н. Борисевич // Минск, БГМУ, 2012. – 92 с.
9. Буркин, А.А. Иммуноферментный анализ клофелина / А.А. Буркин, М.А. Буркин // Судебно-медицинская экспертиза: научно-практический журнал. – 2007. – Т. 50, № 4. – С. 30 – 32.
10. Буркин, А.А. Иммуноферментный анализ лекарственных веществ и их метаболитов. Сообщение 2. Лизиноприл и эналаприлат / А. А. Буркин, М. А. Буркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 6. – С. 54 – 56.
11. Буркин, А. А. Иммуноферментный анализ лекарственных веществ и их метаболитов. Сообщение 3. 1,4-бензодиазепины / А. А. Буркин, А. В. Смирнов // Химико-фармацевтический журнал: Научно-технический и производственный журнал. – 2004. – Т. 38, № 10. – С. 48 – 52.
12. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа: учебник для студентов вузов: в 2 т. / В.П. Васильев // М.: Высшая школа, 1989. – Т.2. – 384 с.
13. Вергейчик, Т.Х. Токсикологическая химия: учебник / Т.Х. Вергейчик // М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
14. Гальвидис, И.А. Иммуноферментный анализ на основе моноклональных антител для определения аминогликозидного антибиотика канамицина в продуктах питания / И.А. Гальвидис, М.А. Буркин // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, № 6. – С. 789 – 796.
15. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии: в 2 т. / Ф. Гейсс // М.: Мир, 1999. – Т.1. – 405 с., Т.2.- 348 с.

16. Гендриксон, О.Д. Молекулярно-импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе / О.Д. Гендриксон, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 149 – 192.
17. Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Е. Форд // М: Мир, 1976. – 542 с.
18. Другов, Ю.С. Экологическая аналитическая химия / Ю.С. Другов // М.: 2000. – 432 с.
19. Еремин, С.К. Анализ наркотических средств. Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская // М.: Мир, 1993. – 271 с.
20. Ершов, Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева // М.: Медицина, 1989. – 271 с.
21. Изотов, Б.Н. Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых минерализацией / Б.Н. Изотов, Н.И.Кузнецова // М., 1996. – 49с.
22. Иммуноферментный анализ: Пер. с англ. / Под ред. Т. Нго, Г. Ленхоффа. – М.: Мир, 1988. – 446 с.
23. Иммунохимические методы определения микотоксинов / И. Ю. Горячева [и др.] // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, № 8. – С. 788 – 806.
24. Иммунохимические методы определения сульфаниламидных препаратов / И. С. Нестеренко и [др.] // Журнал аналитической химии. – 2009. – Т. 64, № 5. – С. 453 – 462.
25. Карташов, В.А. Вариант ТСХ-скрининга ядовитых и сильнодействующих азотсодержащих органических оснований / В.А. Карташов, В.М. Овсянникова, Л.Е. Кудрикова // Судебно-медицинская экспертиза. –1982. – №3. – С.39 – 41.
26. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2т / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. Т.1. – 616 с. Т.2. – 524 с.
27. Клиническая токсикология детей и подростков / И.В. Маркова [и др.] // Санкт-Петербург, 1998. – 304 с.
28. Концентрирование следов органических соединений / Под ред. д-ра хим.наук Н.М. Кузьмина. М.: Наука, 1990. – 280 с.
29. Коренман, И.М . Экстракция в анализе органических веществ / И. М. Коренман // М.: Химия, 1977. – 200 с.
30. Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко // Киев: Выща школа, 1989. – 447 с.
31. Крамаренко, В.Ф. Анализ ядохимикатов / В.Ф. Крамаренко, Б.М. Туркевич // М.: Химия, 1978. – 264 с.
32. Латексные микросферы для определения морфина в физиологических жидкостях человека / Н.М. Солодухина [и др.] // Вестник МИТХТ. – 2010. – Т. 5. № 2. – С. 55 – 59.

33. Лужников, Е.А. Клиническая токсикология / Е.А. Лужников // М.: Медицина, 1999. – 413 с.
34. Москвин, Л.Н. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии / Л.Н. Москвин, Л.Г. Царицына // Л.: Химия, 1991. – 256 с.
35. Некоторые вопросы токсичности металлов / пер. с англ. под ред. Х. Зигеля, А. Зигеля. М.: Мир, 1993. – 366 с.
36. Новый метод иммуноанализа антител человека к химическим канцерогенам / А.Н. Глушков [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 3. – С. 42 – 44.
37. Обнаружение производных 1,4-бензодиазепина в тканях печени иммунохимическими методами / С.Б. Лисовская [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 2001. – Т. 44, № 1. – С. 20 – 25.
38. Основы аналитической токсикологии / Р.Д. Фланаган [и др.] // Женева-Москва: ВОЗ. – 1997. – 383 с.
39. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. Общие вопросы. Методы разделения / Под ред. проф. Ю.А. Золотова. – М.: Высшая школа. – 2000. – 351 с.
40. Основы аналитической химии: в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Под ред. проф. Ю.А. Золотова. – М.: Высш. шк. – 2000. – 494 с.
41. Острые отравления барбитуратами и их лабораторная диагностика / С.Н. Борисевич и [др.] // Здравоохранение. – 2011. – № 4. – С. 52 – 55.
42. Отто, М. Современные методы аналитической химии / М. Отто // М.: Техносфера. – 2008. – 544 с.
43. Ошибки при проведении иммуноферментного анализа / В.Е. Шаркова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 3. – С. 42 – 45.
44. Пивень, Н.В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования / Н.В. Пивень // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2007. – № 2. – С. 6 – 22.
45. Полюдек-Фабин, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабин, Т. Бейрих // Л.: Химия, 1981. – 624 с.
46. Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А.М. Волошука. – М.: Наука, 1996. – 111 с.
47. Руководство по судебно-медицинской экспертизе отравлений. / Под ред. Р.В. Бережного с соавт. – М.: Медицина, 1981. – 409 с.
48. Современные методы химико-токсикологического анализа / Под ред. Б.Н. Изотова, ММИ им. И.М. Сеченова, 1986. – 279 с.
49. Спутник хроматографиста / О.Б. Рудаков [и др.] // Воронеж, «Водолей», 2004. – 528 с.

50. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде // М.: Химия, 1986. – 204 с.
51. Твердофазный иммуноферментный метод количественного определения гидазепама в моче человека / Ж. Н. Трубачева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – № 10. – С. 49-51.
52. Твердофазный иммуноферментный метод определения амфетаминов в моче / Ш.А. Демерчян [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика: научно-практический журнал. – 2007. – № 12. – С. 20-22.
53. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. – М.: Высш. школа, 1991. – 288 с.
54. Токсикологическая химия / Под ред. проф. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2008. – 1016 с.
55. Токсикологическая химия / Под ред. проф. Т.В. Плетеневой. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2008. – 512 с.
56. Учебно-методическая разработка для самоподготовки и выполнения лабораторных работ студентов по токсикологической химии «Группа веществ, изолируемых экстракцией полярными растворителями» / Под ред. Б.Н. Изотова. – Часть 1 (1987, 94 с), часть 2 (1989, 57 с).
57. Фармацевтическая химия / Под ред. проф. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 640 с.
58. Хмельницкий, Р.А. Хромато-масс-спектрометрия. / Р.А. Хмельницкий, Е.С. Бродский // М.: Химия, 1984. – 216 с.
59. Холодов, Л.Е. Клиническая фармакокинетика / Л.Е. Холодов, В.П. Яковлев // М.: Медицина, 1985. – 463 с.
60. Шатц, В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова // Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
61. Швайкова, М.Д. Токсикологическая химия / М.Д. Швайкова // М.: Медицина, 1975. – 376 с.
62. Элленхорн, М.Д. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека / пер. с англ., М.: Медицина, 2003. – Т.1 – 1050 с ; Т.2 – 1045 с.
63. Ярилин, А.А. Иммунология / А.А. Ярилин // М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
64. Amphetamines in hair by enzyme linked immunosorbent assay / S.A. Sweeney [et al.] // Journal of analytical toxicology. – 1998. – Vol. 22. – P. 418 – 424.
65. Applicability of an immunoassay test for its use in post-mortem blood regarding to cocaine and opiates / A. Arroyo [et al.] // Annales toxicology Analytique. – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 201 – 206.
66. Applications of EMIT d.a.u. for the Semiquantitative screening of methamphetamine incorporated in hair/ A. Miki [et al.] / Journal of analytical toxicology. – 2002. – Vol. 26. – P. 274 – 279.
67. Bell, S. Forensic chemistry / S. Bell // New Jersey: Prentice Hall, 2006, 671 p.

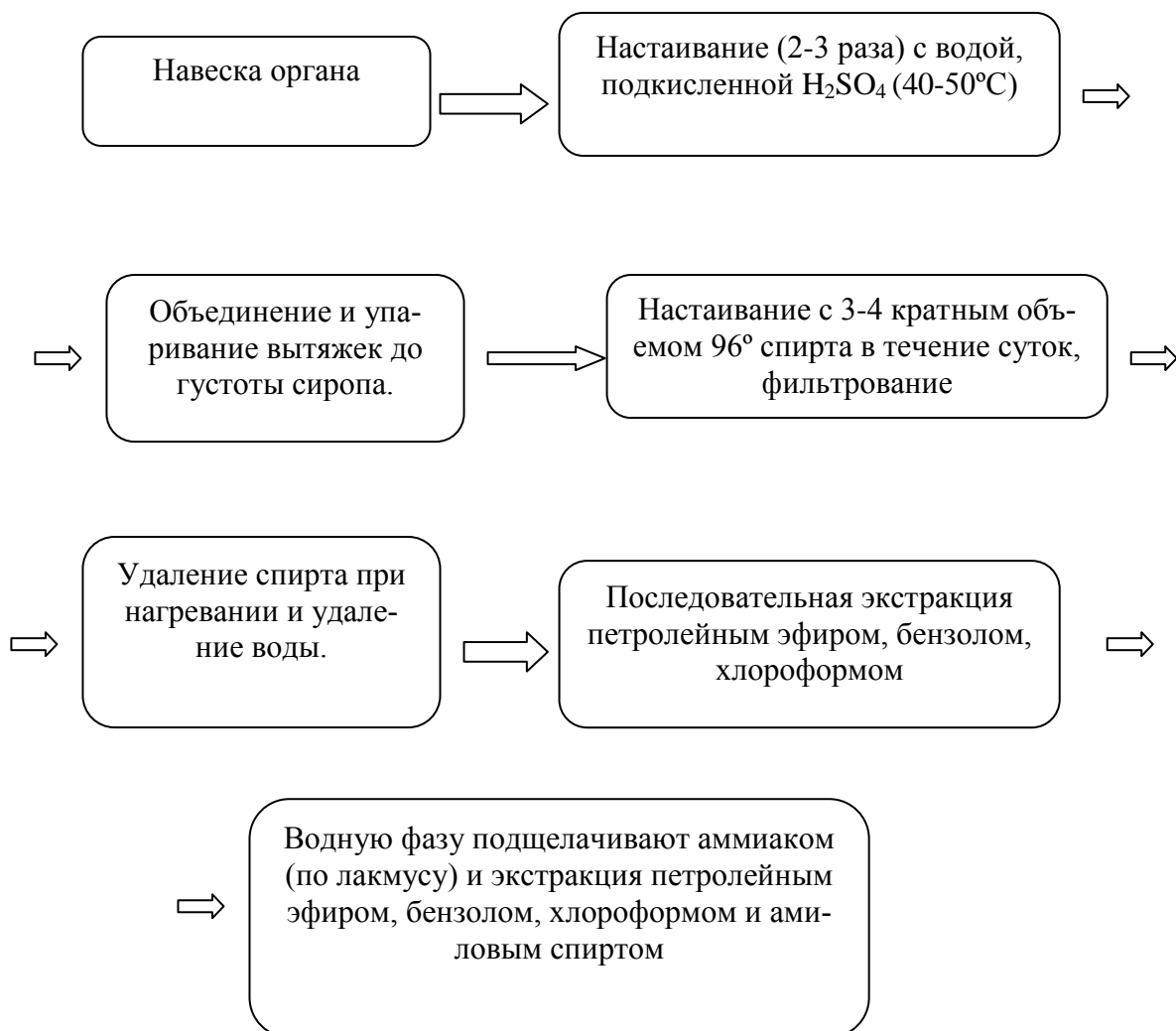
68. Clarke, E.G. Clarke's analytical forensic toxicology / E.G. Clarke, B. Widdop, A.C. Moffat [et al.] // London: Pharmaceutical Press, 2008, 648 p.
69. Cloned enzyme donor immunoassay (CEDIA) for drugs-of-abuse screening / D. Armbruster [et al.] // Drug monitoring and toxicology. – 1995. – Vol. 41, № 1. – P. 92-98.
70. Cocaine and opiate use in pregnancy: detections of drugs in neonatal meconium and urine / P. Lopez [et al.] // Journal of analytical toxicology. – 2009. – Vol. 33. – P. 351 – 355.
71. Cole, D. Michael. The analysis of controlled substances / Michael D. Cole // Chichester: John Wiley and sons Ltd., 2003, 207 p.
72. Cross-reactivity of stimulations found in sports drug testing by two fluorescence polarizations immunoassay / R. Torre [et al.] // Journal of analytical toxicology. – 1996. – Vol. 20. – P. 165 – 170.
73. Darwish, I. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances / I. Darwish // International journal of biomedical science. – September 2006. – Vol. 2, № 3. – P. 217 – 235.
74. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for direct determinations of anticancer drug vitamin K3 in serum / S. Sakamoto [et al.] // Journal of health science. – 2008. – Vol. 54, № 4. – P. 508 – 511.
75. Development of rapid one-step immunochromatographic assay / S. Paek [et al.] // Methods. – 2000. – Vol. 22. – P. 53 – 60.
76. Development of three-step consolidating microchip for therapeutic drug monitoring / K. Sugiura [et al.] // 14th International Conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, Groningen, the Netherlands. – 2010. – P. 806 – 808.
77. Enzyme linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence conformation of antinuclear antibodies / S.S. Copple [et al.] // American society for clinical pathology. – 2011. – Vol. 135. – P. 678 – 684.
78. Enzyme linked immunofiltration assay used in the screening of solid supports and immunoreagents for the development of an azinphosmethyl flow immunosensor / J.P.M. Sardinha [et al.] // Journal of immunological methods. – 2002. – Vol. 26. – P. 173 – 182.
79. Eremin, S.A. Fluorescence polarizations immunoassays for determination of pesticides and biologically active compounds in food safety and environmental monitoring / S.A. Eremin // Food technology and biotechnology. – 1998. – Vol. 36, № 3. – P. 235 – 243.
80. Garber, E. Detection of melamine using commercial enzyme linked immunosorbent assay technology / E. Garber // Journal of food protection. – 2008. – Vol. 71, № 3. – P. 590 – 594.
81. Immunoassay technologies for drugs of abuse testing / A. Pouliopoulos [et al.] // Aristotle university medical journal. – 2007. – Vol. 34, Issue 2. – P. 19 – 24.

82. Immunochemistry in 2008 / Jean-Pierre Goullé [et al.] // *Annales toxicology Analytique*. – 2009. – Vol. 21, №1. – P. 49 – 53.
83. Karch, B. Steven. Drug abuse handbook / Steven B. Karch // USA: CRC Press, 1998, 1123 p.
84. Koivunen, M.E. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories / M.E. Koivunen, R.L. Krogsrud // *Labmedicine*. – 2006. – Vol.37, № 8. – P. 490 – 497.
85. Labat, L. Immunoanalysis and toxicology / L. Labat, M. Deveaux // *Annales toxicology Analytique*. – 2009. – Vol. 21, № 1. – P.1– 2.
86. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents / C. Liu [et al.] // *American chemical society*. – 2011. – Vol. 83. – P. 6778 – 6784.
87. Maragos, C. Fluorescence polarization immunoassay of mycotoxins: a review / C. Maragos // *Toxins*. – 2009. – № 1. – P. 196 – 207.
88. Micro kinetic exclusion assay for cadmium analysis / A. Aota [et al.] // 16th International conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, Okinawa, Japan. – 2012. – P. 1990 – 1992.
89. Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay / S.I. Jeon [et al.] // *Analytical biochemistry*. – 2004. – Vol. 33, № 3. – P. 136 – 147.
90. New fluorescence polarization immunoassays for analysis of barbiturates and benzodiazepines in serum and urine: performance characteristics / K.S. Schwenzler [et al.] // *Journal of analytical toxicology*. – 2000. – Vol. 24. – P. 726 – 732.
91. Newton, E. David. Forensic chemistry / David E. Newton // USA: Facts on file, 2007. – 190 p.
92. Quantitation of tetrahydrocannabinol in hair using immunoassay and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection / C. Coulter [et al.] // *Drug Testing et Analysis*. – 2009. – Vol. 1, № 5. – P. 234 – 239.
93. Smith, P. Frederick. Handbook of forensic drug analysis / Frederick P. Smith, Sotiris A. Athanaselis [et al.] // USA: Elsevier academic press, 2005. – 579 p.
94. Specific, sensitive and quantitative enzyme linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen / C. Quinn [et al.] // *Emerging infections disease*. – 2002. – Vol. 8, № 10. – P. 1103 – 1110.
95. Suzuki, O. Drugs and poisons in humans. A handbook of practical analysis / O. Suzuki, K. Watanabe // Springer-Verlag Heidelberg New York, 2005/ – 672 p.
96. Verstraete, A. Workplace drug testing / A. Verstraete // London: Pharmaceutical press, 2011. – 438 p.
97. Woolf, T.F. Handbook of drug metabolism / T.F. Wolf // New York: Dekker, 1999. – 596 p.

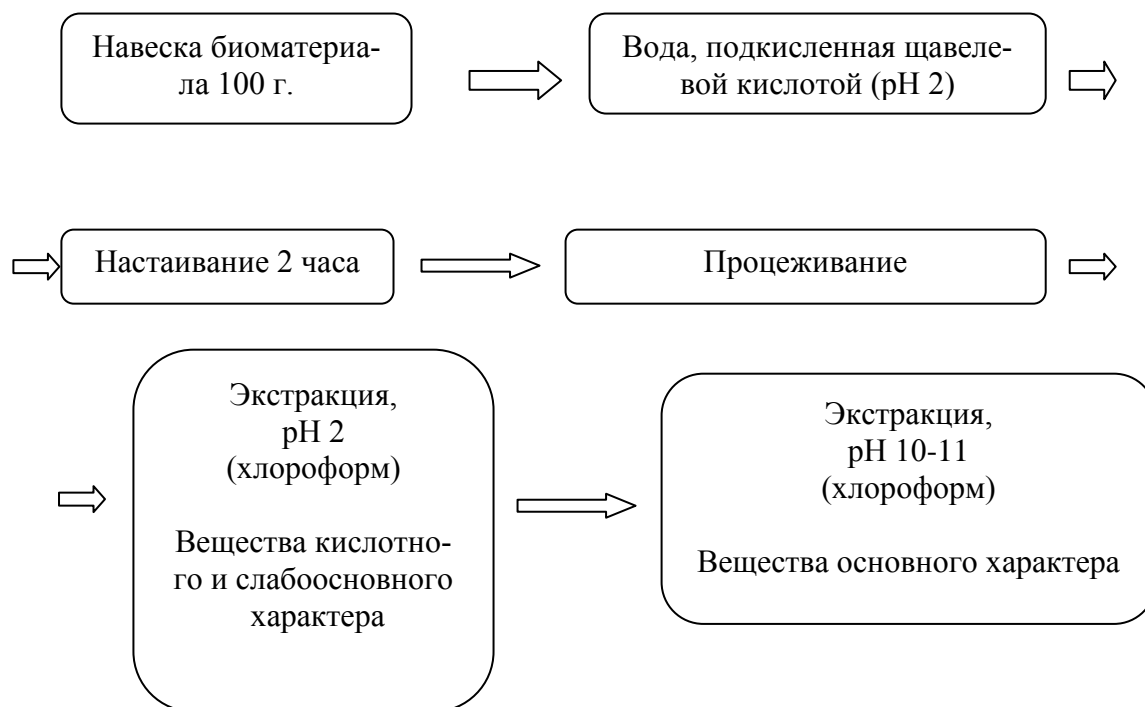
ПРИЛОЖЕНИЯ

1. СХЕМЫ МЕТОДОВ ИЗОЛИРОВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

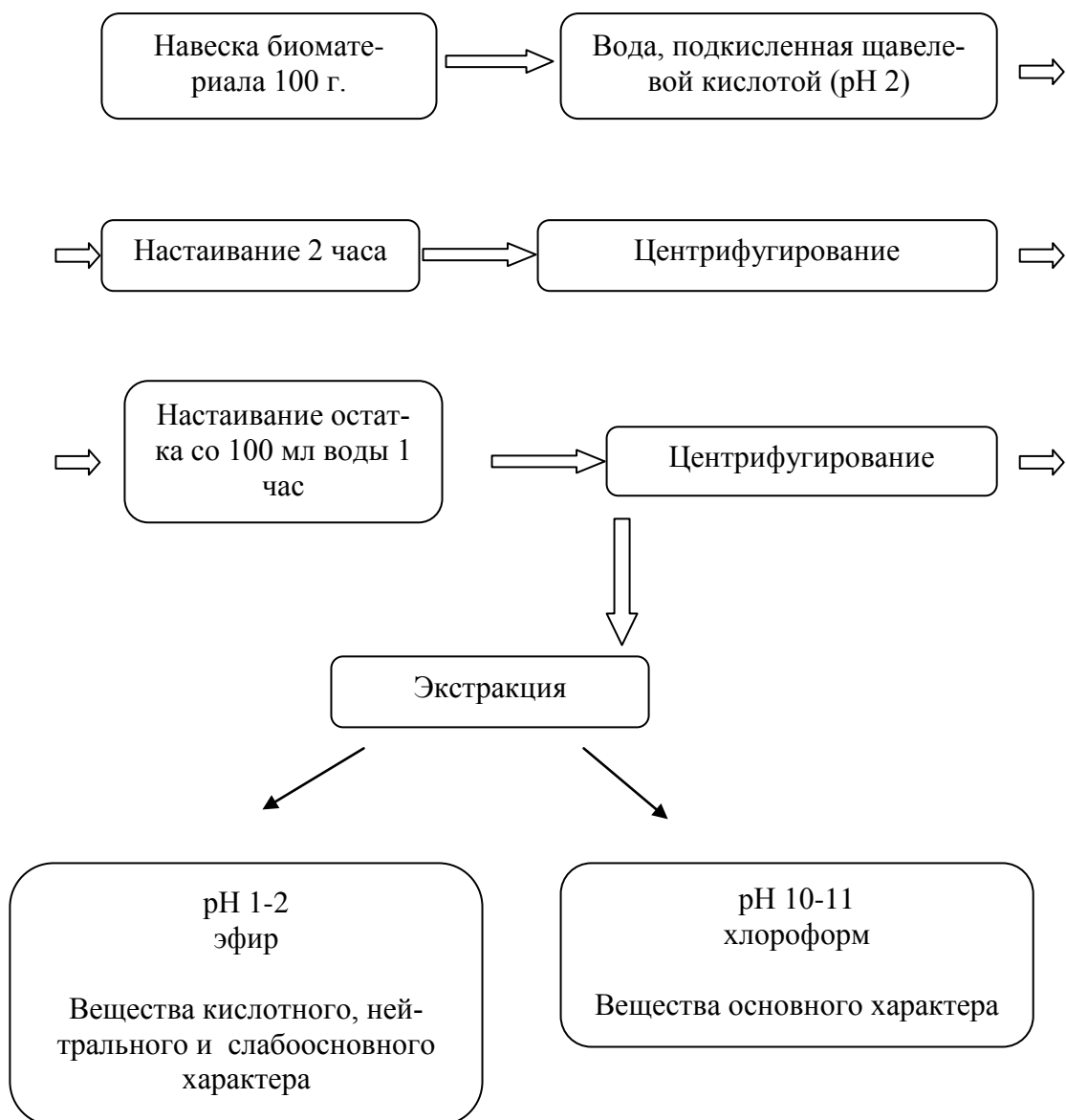
Общий метод изолирования токсических веществ водой, подкисленной серной кислотой (метод Драгендорфа)



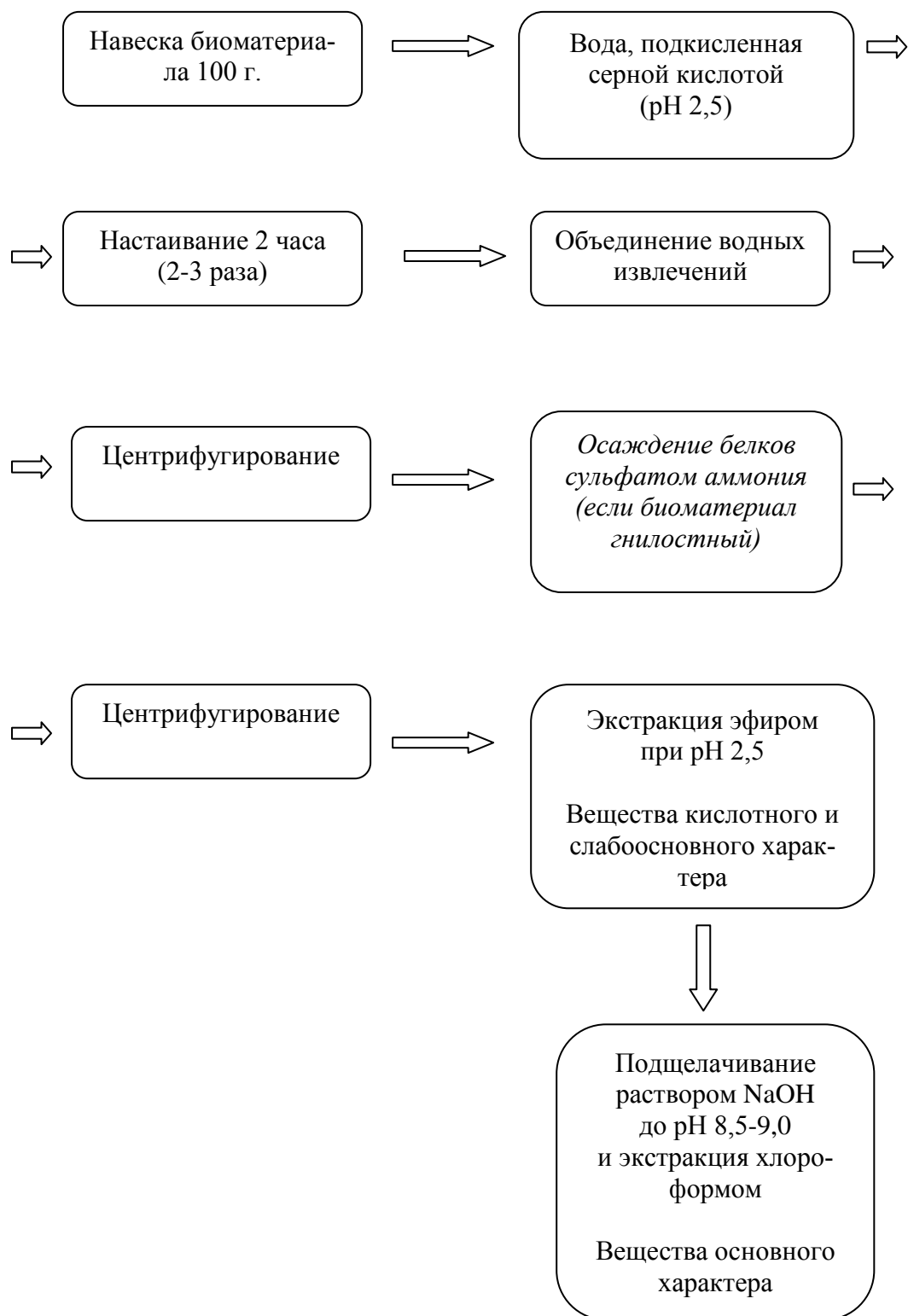
Общий метод изолирования токсических веществ водой, подкисленной щавелевой кислотой (метод Васильевой)



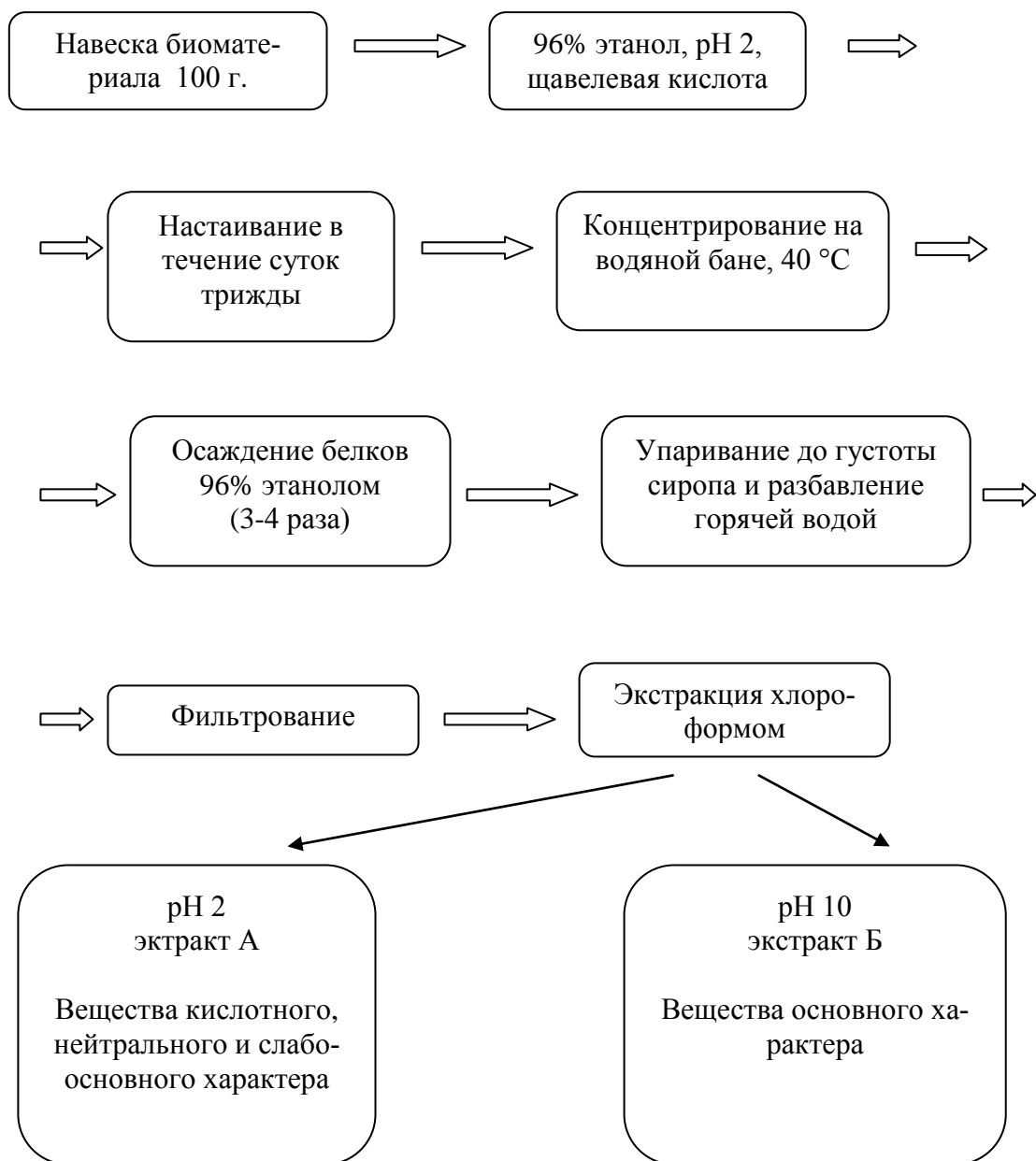
Общий метод изолирования токсических веществ подкисленной водой (метод Швайковой – Васильевой)



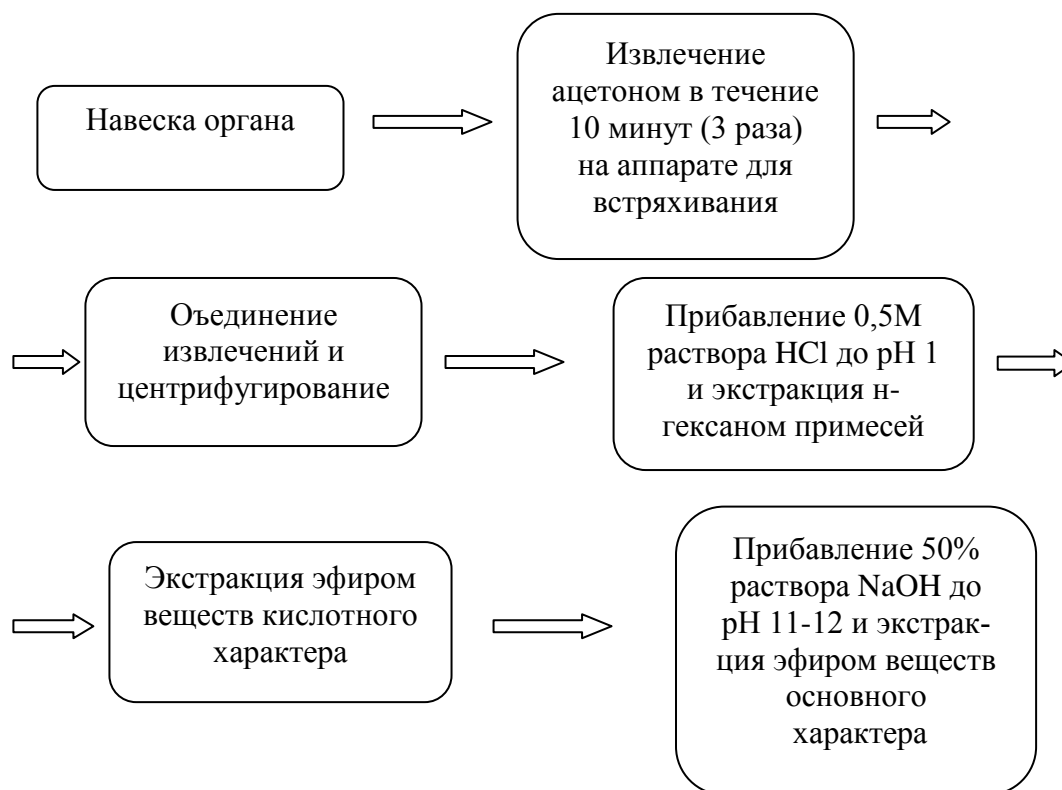
Общий метод изолирования токсических веществ подкисленной водой (метод Крамаренко)



Общий метод изолирования токсических веществ подкисленным спиртом (современная модификация метода Стаса – Отто)



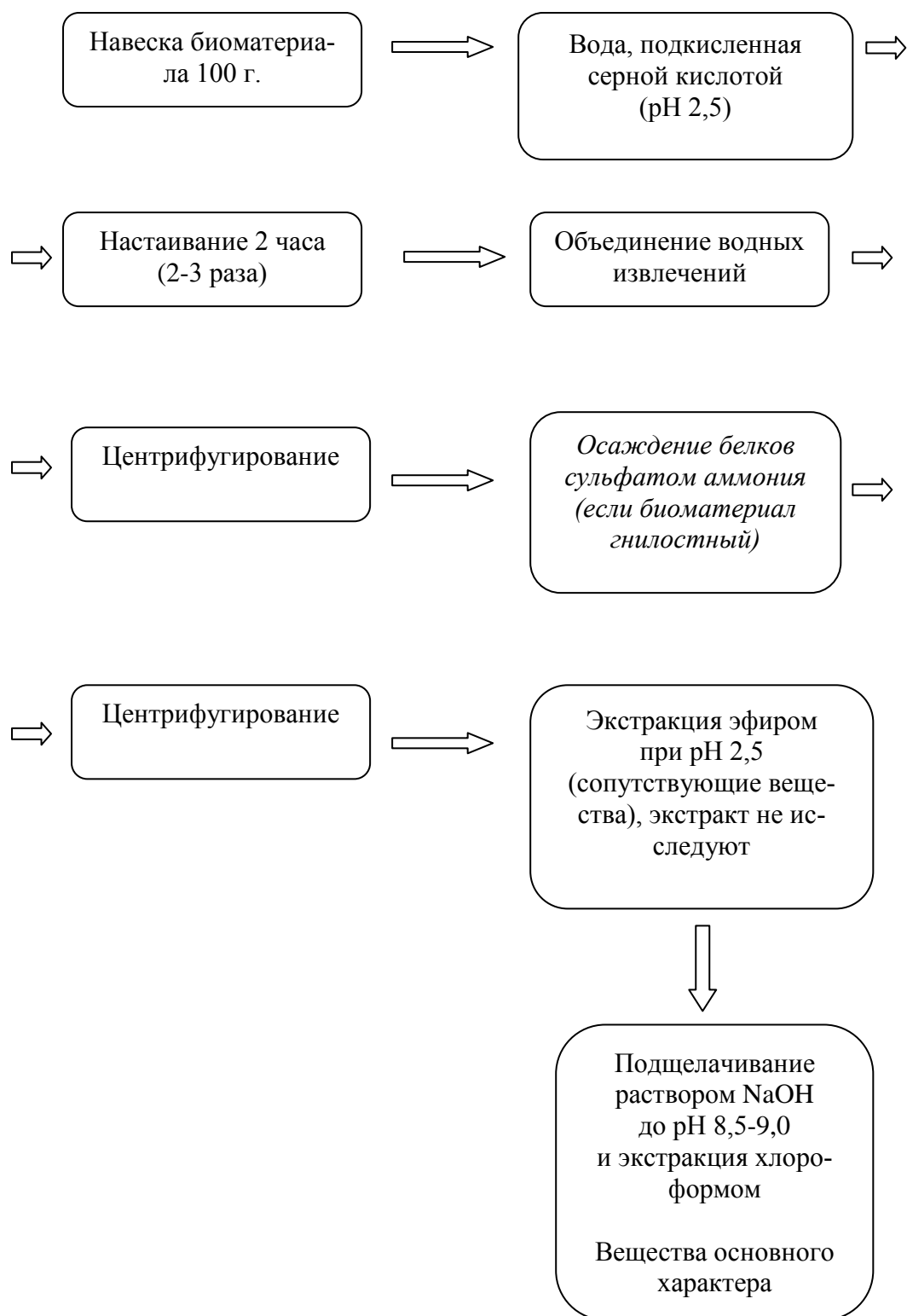
**Общий метод изолирования
токсических веществ ацетоном
(метод Карташова)**



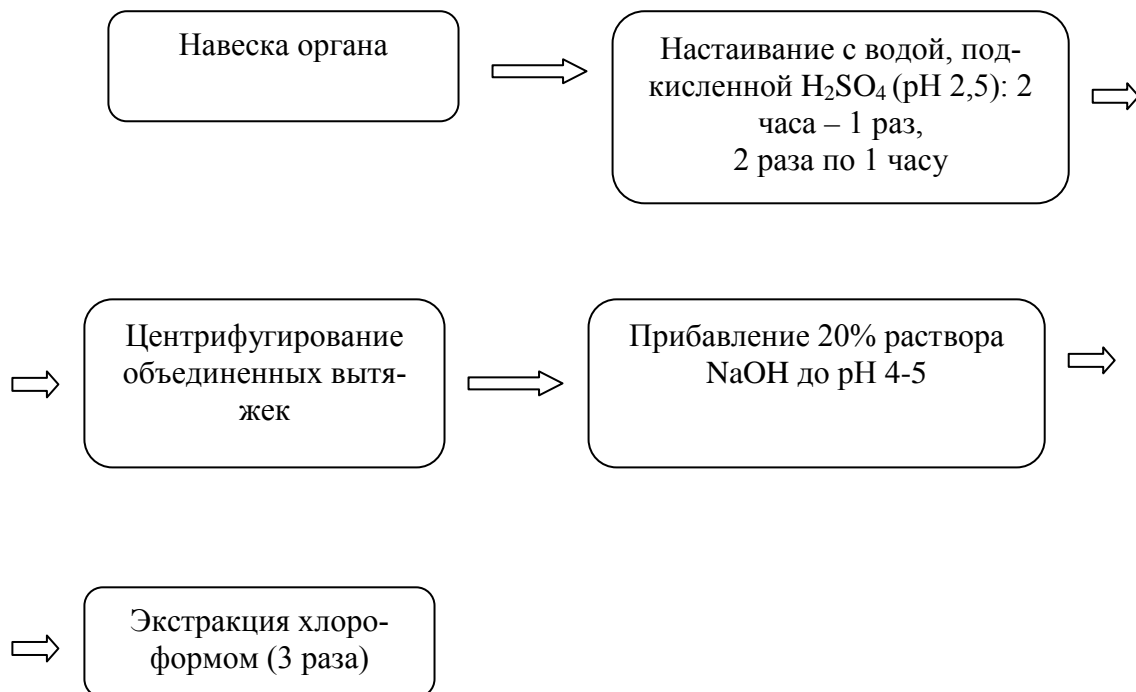
**Общий метод изолирования алкалоидов
(метод Крамаренко)**



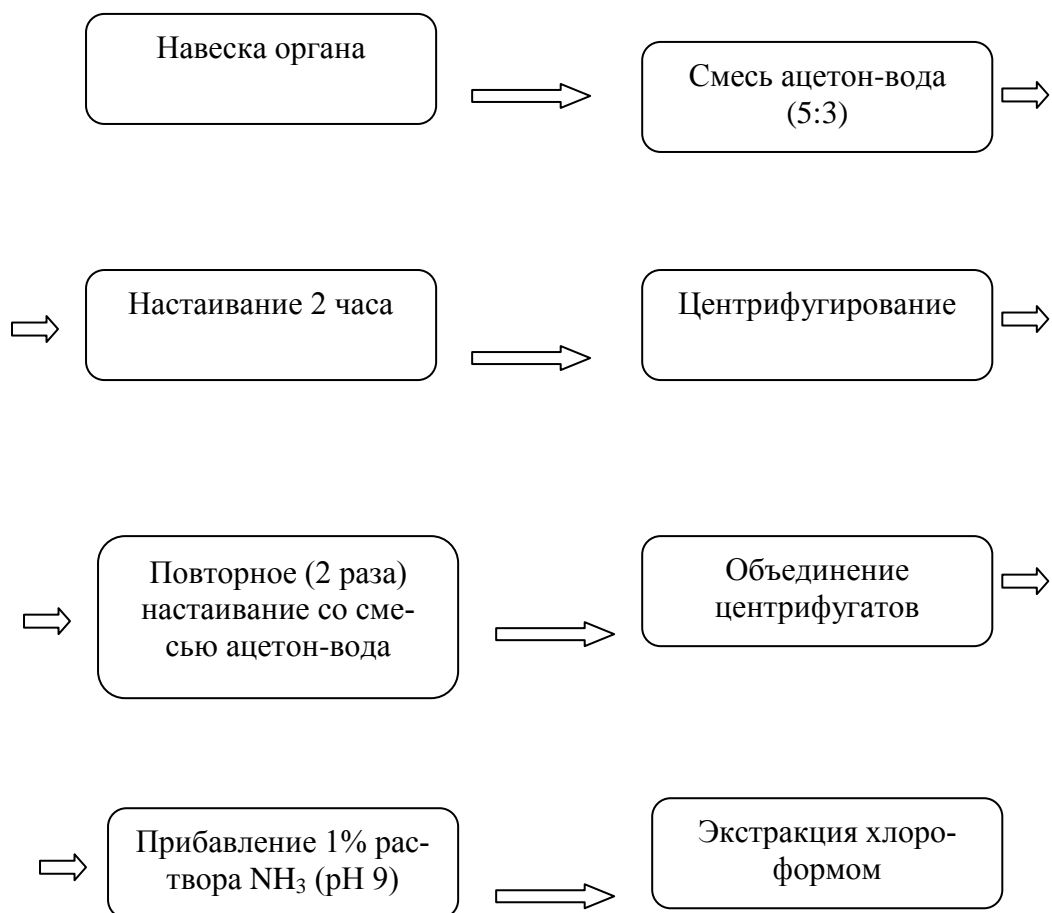
**Метод изолирования токсических веществ основного характера
(метод Крамаренко)**



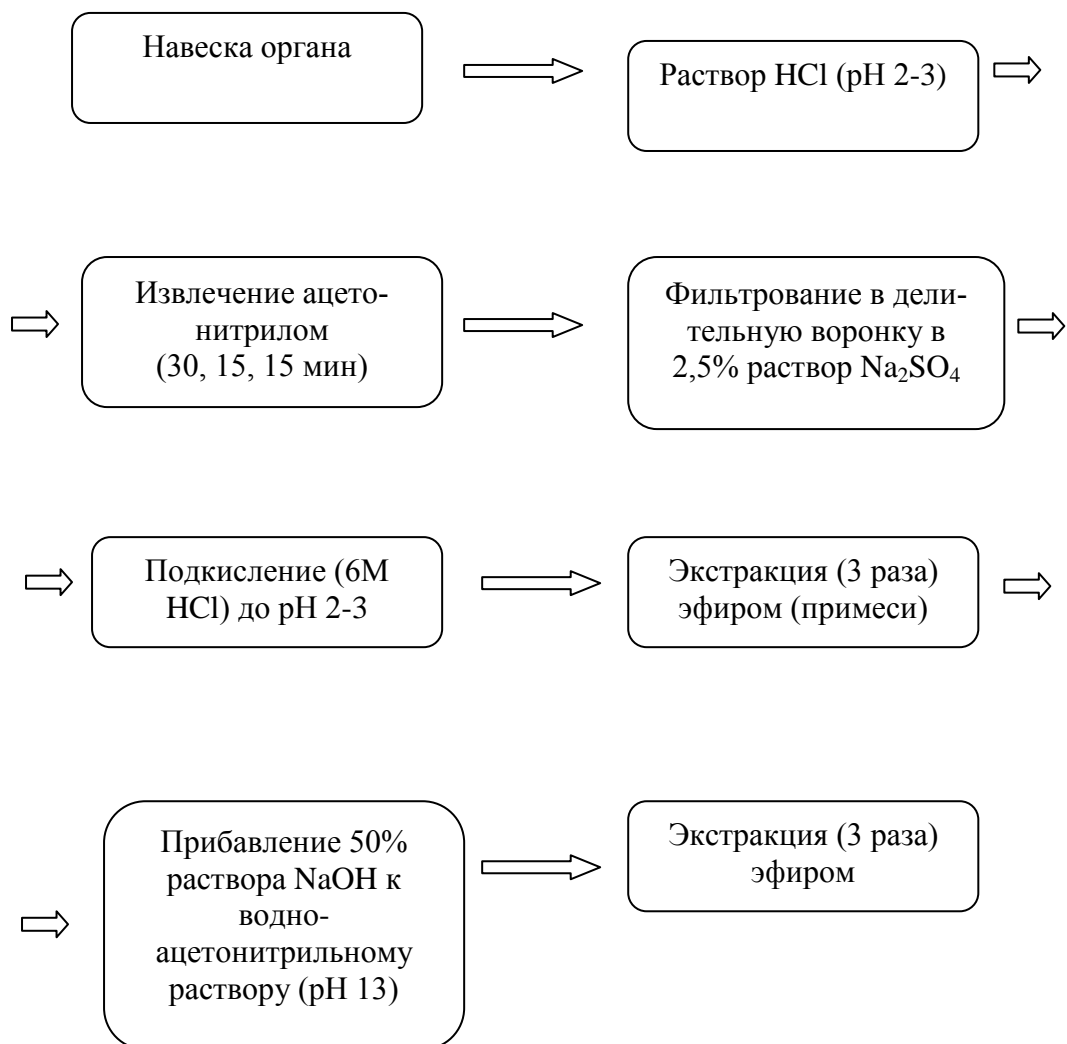
**Метод изолирования токсических веществ слабоосновного характера
(метод Крамаренко)**



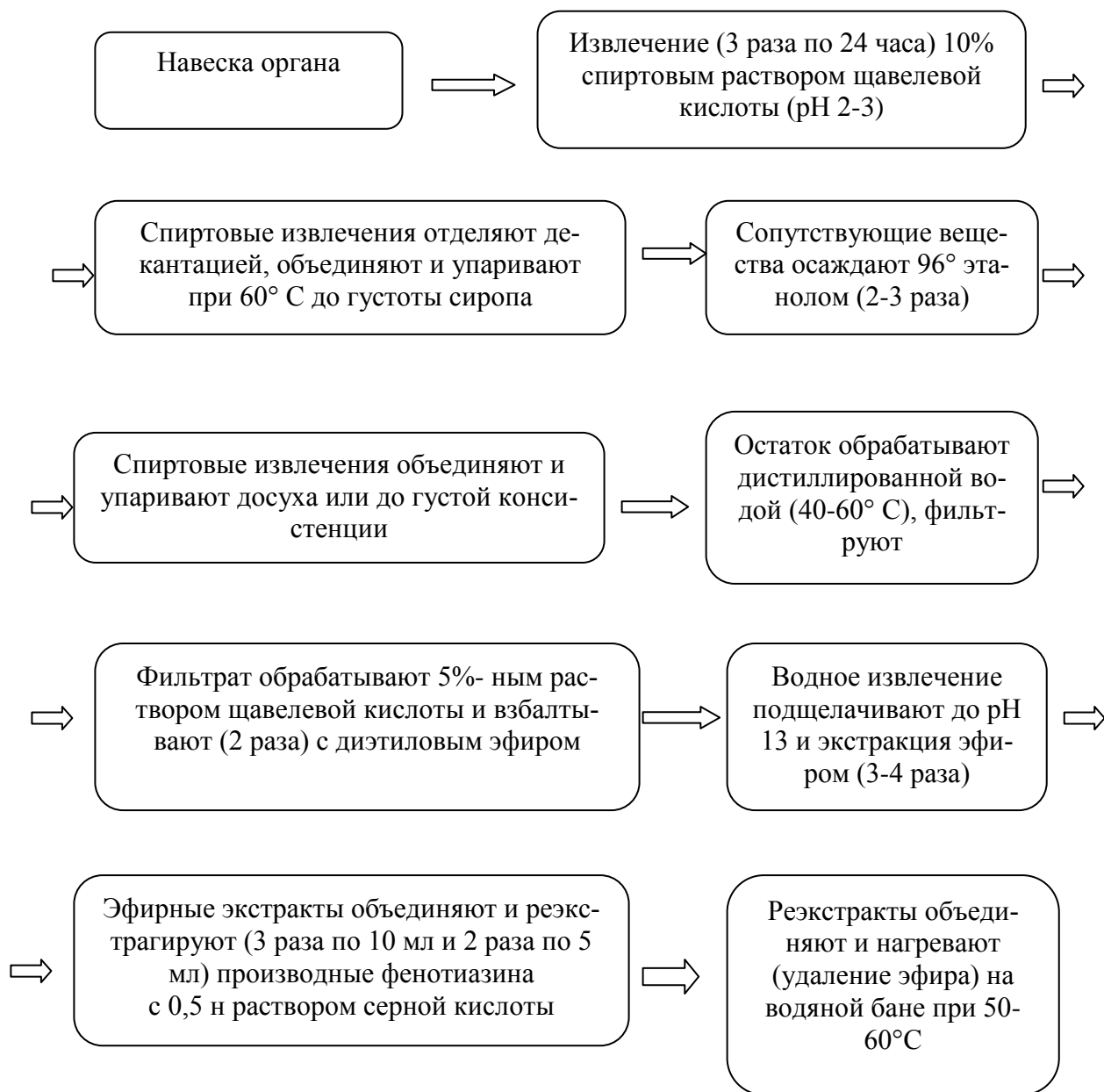
Метод изолирования азотсодержащих органических оснований (метод Карташова)



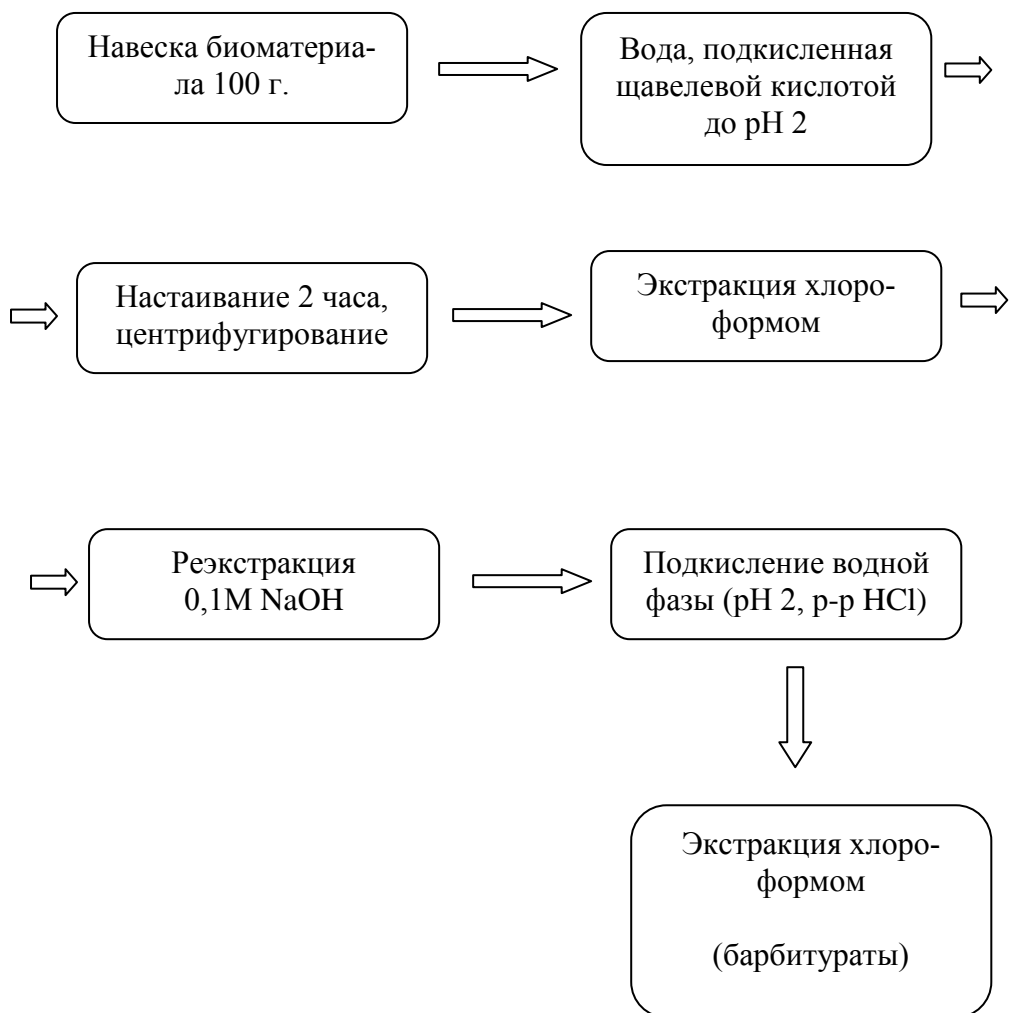
**Метод изолирования производных
фенотиазина ацетонитрилом (метод Саломатина)**



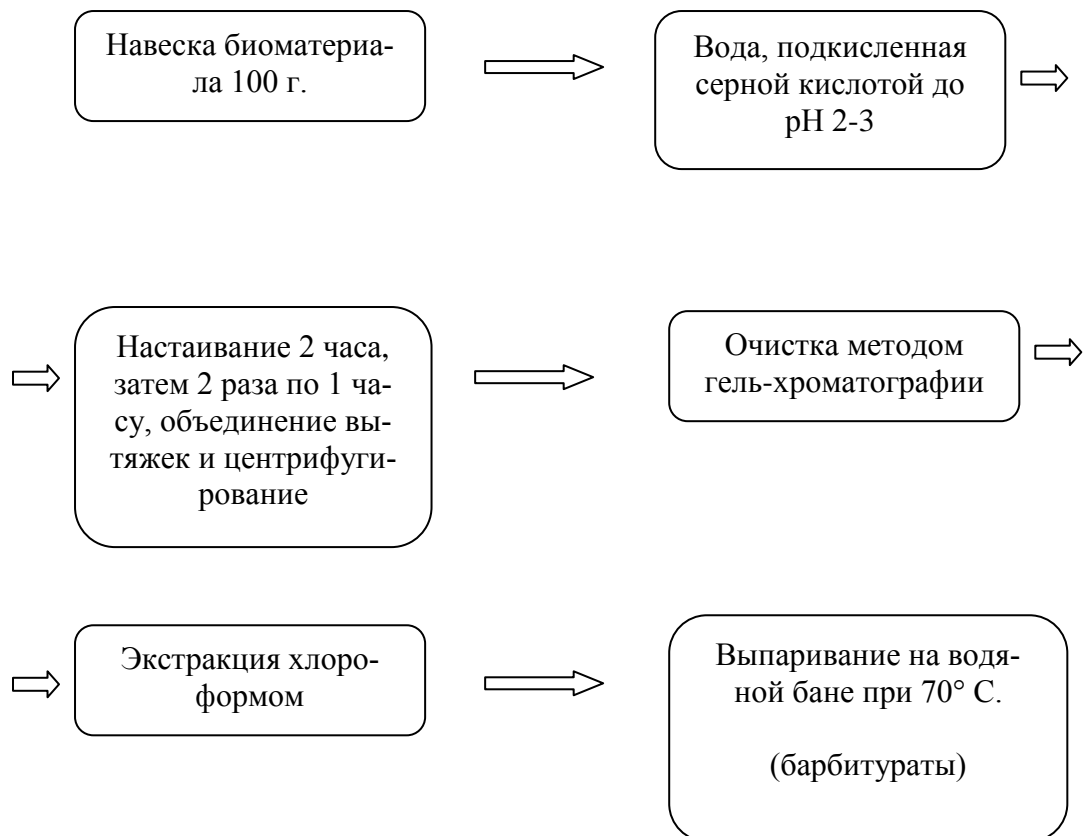
**Метод изолирования производных
фенотиазина подкисленным спиртом (метод Саломатина)**



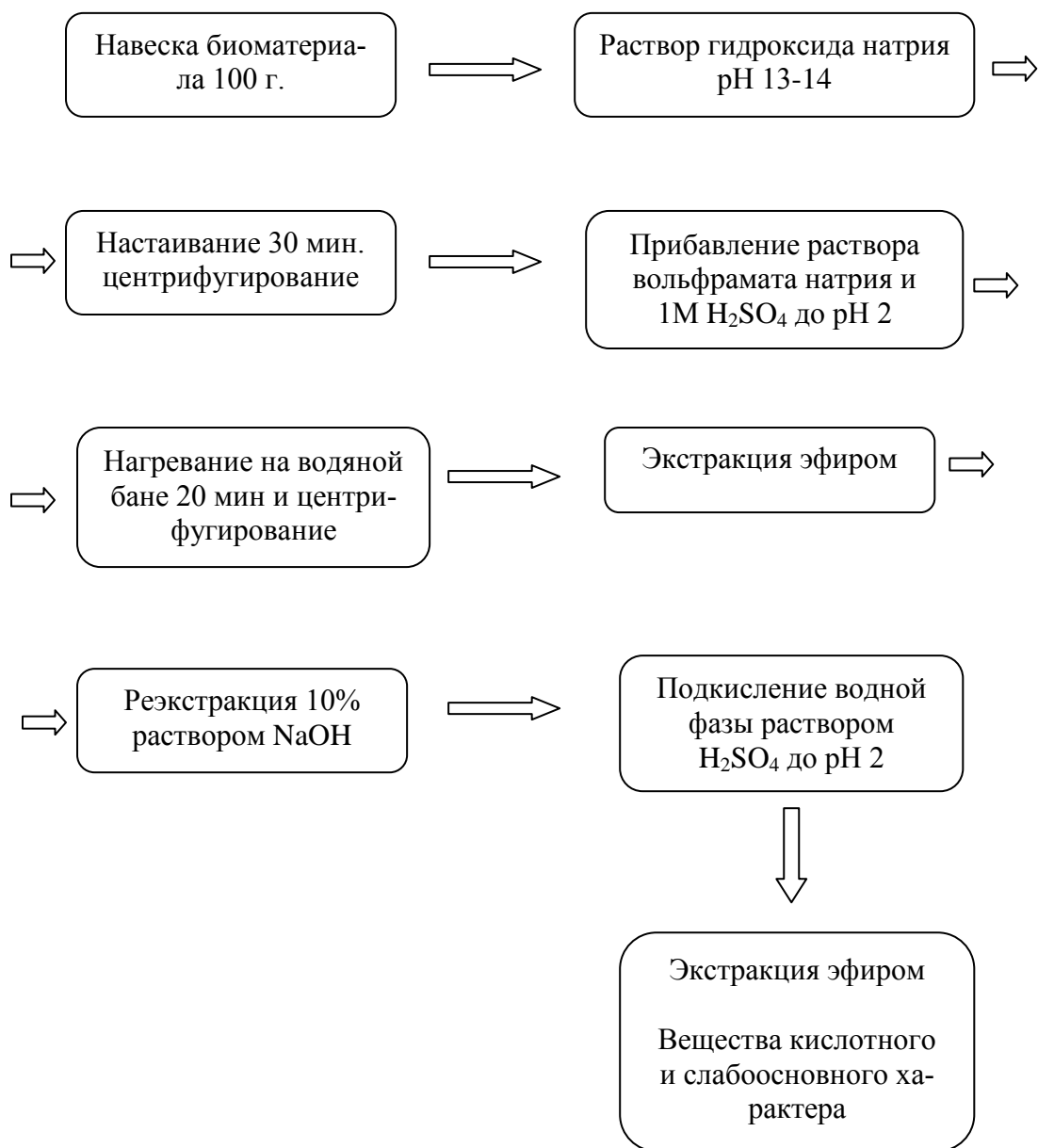
**Метод изолирования барбитуратов подкисленной водой
(метод Швайковой)**



**Метод изолирования
барбитуратов подкисленной водой
(метод Поповой)**



**Метод изолирования барбитуратов подщелоченной водой
(метод Валова)**



2. Свойства растворителей для жидкостной хроматографии [4]

Растворитель	Температура кипения °С	Плотность, d_{20}	Вязкость при 25°С, сП	Коэффициент преломления, n_{D20}	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ϵ^0 на силикагеле	Индекс полярности R'
Ацетонитрил	82	0,78	0,34	1,314	190	0,50	5,8
Бензол	80	0,88	0,60	1,498	280	0,10	2,7
Вода	100	1,00	0,89	1,333	-	1,50	10,2
Гексан	69	0,66	0,30	1,372	190	0,01	0,1
Гептан	98	0,68	0,40	1,385	195	0,01	0,2
Диметилформамид	153	0,94	0,80	1,428	268	1,00	6,4
Диоксан	101	1,03	1,2	1,420	215	0,45	4,8
Дихлорэтан	83	1,25	0,78	1,442	228	0,20	3,5
Диэтиловый эфир	35	0,71	0,24	1,350	218	0,30	2,8
Изооктан	99	0,69	0,47	1,389	197	0,01	0,1
Метанол	65	0,79	0,54	1,326	205	0,7	5,1
Метиленхлорид	40	1,33	-	1,421	233	0,32	3,1
Метилэтилкетон	80	0,86	0,38	1,376	329	0,40	4,7
Пентан	36	0,63	0,22	1,355	195	0,01	0,0
Пропанол-1	97	0,80	1,9	1,385	240	0,55	4,0
Пропанол-2	82	0,79	1,9	1,384	205	0,55	3,9
Тetraгидрофуран	66	0,89	0,46	1,405	212	0,44	4,0
Тетрахлорид углерода	77	1,60	0,90	1,457	265	0,1	1,6
Толуол	110	0,87	0,55	1,494	285	0,10	2,4
Триэтиламин	89	0,73	0,36	1,398	-	-	1,9
Уксусная кислота	118	1,05	1,1	1,370	-	-	6,0
Хлороформ	61	1,49	0,53	1,443	245	0,26	4,1
Циклогексан	81	0,78	0,90	1,423	200	0,02	0,04
Этанол	78	0,79	1,08	1,359	210	0,60	4,3
Этилацетат	77	0,90	0,43	1,370	256	0,38	4,4

3. Спектральные характеристики флуоресцирующих лекарственных веществ

Соединение	$\lambda_{\text{НМ}}^{\text{взб}}$	$\lambda_{\text{НМ}}^{\text{фл}}$	Соединение	$\lambda_{\text{НМ}}^{\text{взб}}$	$\lambda_{\text{НМ}}^{\text{фл}}$
Ампицилин	345	420	Метопролол	280	300
Анаприлин	200	310-330	Пиндолол	220	360
Апоморфин	281	418	Ретинол	325	480
Атенолол	280	300	Рубомицин	480	560
Бетаксоллол	275, 285	305,330	Тиогуанин	330	389
Верапамил	280	314	Токоферол	295	390
Гентамицин	275, 365	418, 440	Фуросемид	275, 233	410, 389
Глауцин	310	340	Хинидин	340	418
Индометацин	305	370	Хинин	350	450
Карминомицин	470	550	Хлорбутин	285	320
Лоназоллак	282	389	Цефалексин	345	420
Метолазон	230	420	Циталопрам	240	300

4. Миксотропная серия растворителей

Вода	Циклогексанол	Хлороформ
Молочная кислота	Изоамиловый спирт	Диизоамиловый эфир
Формаид	1-Пентанол	1,2-Дихлорэтан
Морфолин	Бензиловый спирт	Бромбензол
Муравьиная кислота	Этилацетат	1,1,2-Трихлорэтан
Ацетонитрил	1-Гексанол	1,2-дибромэтан
Метанол	<i>симм</i> -Коллидин	Бромэтан
Уксусная кислота	Пентановая кислота	Бензол
Этанол	Этилформиат	1-Хлорпропан
2-Пропанол	Изовалериановая кислота	Трихлорэтилен
Ацетон	Фуран	Толуол
1-Пропанол	Диэтиловый эфир	Ксилол
1,4-Диоксан	1-Октанол	Четыреххлористый углерод
Пропионовая кислота	Диэтоксиметан	Сероуглерод
Тетрагидрофуран	Капроновая кислота	Декалин
<i>трет</i> -Бутанол	Бутилацетат	Циклопентан
Изомасляная кислота	Диизопропоксиметан	Циклогексан
2-Бутанол	Нитрометан	Гексан
Метилэтилкетон	1-Бромбутан	Гептан
Циклогексанон	Диизопропиловый эфир	Керосин
Фенол	Бутилбутират	Петролейный эфир
<i>трет</i> -Амиловый спирт	1-Бромпропан	Парафиновое масло
1-Бутанол	Дибутиловый эфир	
<i>m</i> -Крезол	Метиленхлорид	

Примечание: растворители, расположенные выше *трет*-бутанола, смешиваются с водой в любых соотношениях

5. Фармакологические пробы на атропин, стрихнин и никотин

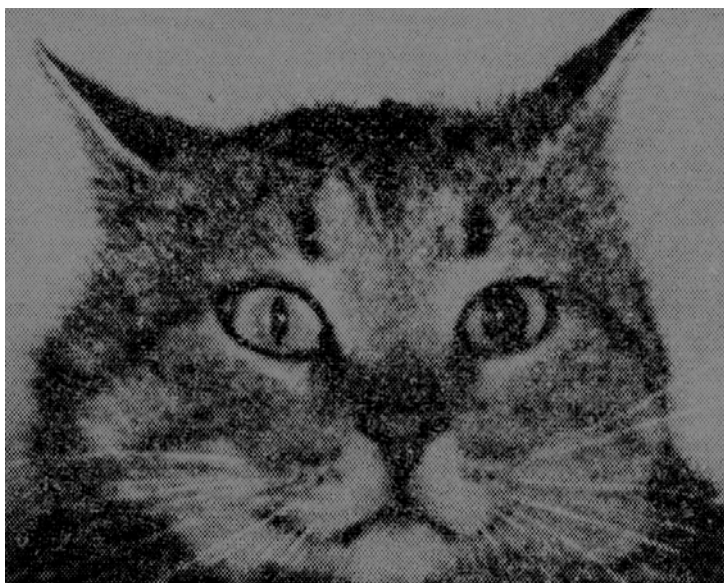


Рис. 1. Реакция глаза кошки на введение атропина.



Рис. 2. Лягушка, отравленная
никотином.



Рис.3. Лягушка под действием
стрихнина

6. Чувствительность общеалкалоидных осадительных реактивов по отношению к некоторым алкалоидам

Алкалоиды	Реактивы					
	Реактив Бушарда	Реактив Драгendorфа	Реактив Майера	Реактив Зонненштейна	Реактив Шейлера	Пикриновая кислота
Атропин	$1:3 \cdot 10^4$	$1:10^4$	$1:2 \cdot 10^3$	$1:10^4$	$1:10^3$	$1:2 \cdot 10^2$
Бруцин	$1:6,5 \cdot 10^4$		$1:5 \cdot 10^4$	$1:10^6$	$1:5 \cdot 10^5$	
Кодеин	$1:10^5$	$1:5 \cdot 10^4$	$1:4 \cdot 10^3$	$1:5 \cdot 10^4$	$1:1,2 \cdot 10^5$	$1:6 \cdot 10^2$
Кокаин	$1:10^5$	$1:1,6 \cdot 10^5$	$1:1,6 \cdot 10^5$	$1:5 \cdot 10^4$	$1:10^6$	$1:1,5 \cdot 10^3$
Морфин	$1:10^5$	$1:1,6 \cdot 10^4$	$1:2,5 \cdot 10^3$	$1:3,3 \cdot 10^4$	$1:3,3 \cdot 10^4$	
Никотин	$1:10^3$	$1:4 \cdot 10^4$	$1:1,5 \cdot 10^4$	$1:4 \cdot 10^4$	$1:5 \cdot 10^5$	$1:10^3$
Папаверин	$1:10^4$	$1:10^4$	$1:5 \cdot 10^4$	$1:10^4$	$1:2 \cdot 10^5$	
Пахикарпин	$1:7 \cdot 10^4$	$1:4 \cdot 10^4$	$1:6 \cdot 10^4$	$1:10^4$		$1:3 \cdot 10^3$
Пилокарпин	$1:2,5 \cdot 10^4$		$1:6 \cdot 10^4$	$1:2 \cdot 10^5$	$1:2 \cdot 10^5$	$1:7 \cdot 10^2$
Стрихнин		$1:4 \cdot 10^5$	$1:4 \cdot 10^5$		$1:6 \cdot 10^5$	$1:9 \cdot 10^3$
Хинин	$1:2 \cdot 10^5$	$1:4 \cdot 10^4$	$1:10^5$	$1:4 \cdot 10^4$	$1:5 \cdot 10^5$	

7. Терапевтические, токсические и летальные концентрации некоторых лекарственных и наркотических веществ в крови

Вещество	Концентрация, мг/л		
	терапевтическая	токсическая	Летальная
1	2	3	4
Аминазин	0,5	1-2	3-12
Ацетилсалициловая кислота	20-100	150-300	500
Барбитураты:			
короткого действия	1	7-10	10-15
среднего действия	1	10-30	> 30
длительного действия	10	40-60	> 80
Диазепам	0,5-2,5	5-20	> 5
Димедрол	0,06-0,14	1,0-10,0	9,2
Имипрамин	0,05-0,16	0,7	2
Кофеин			100
Лидокаин	2	6	
Мепробамат	10	100	200
Метадон	0,48-0,86	2	4
Метамфетамин		5	40
Морфин	0,1		0,05-4
Никотин		10	5-52
Нитразепам	0,04-0,12	0,2	2,9-5,0
Ноксирон	0,2	10-80	30-100
Оксазепам	0,03-2,7		
Парацетамол	10-20	400	1500
Прокаинамид	6	10	
Стрихнин		2	9-12
Теofilлин	20-100		
Тиоридазин	1-1,5	10	20-80
Хлордиазепоксид	1,0-3,0	5,5	20

8. Приготовление реактивов для химико-токсикологического анализа

Дифенилкарбазон 0,02%-й раствор. 0,02 г дифенилкарбазона растворяют в 100 мл хлороформа.

Пикриновая кислота. Готовят насыщенный раствор (приблизительно 1 %).

Реактив Бушарда. В 10–15 мл воды растворяют 2 г иодида калия. К полученному раствору прибавляют 1,27 г иода. После растворения иода прибавляют воду до 100 мл.

Реактив Вагнера. В 10–15 мл воды растворяют 2 г иодида калия. К этому раствору прибавляют 1 г иода. После растворения иода прибавляют воду до 50 мл.

Реактив Драгендорфа. В 20 мл азотной кислоты (пл. 1,18) растворяют 8 г основного нитрата висмута. Полученный раствор вливают в раствор, содержащий 27,2 г иодида калия в 30 мл воды. Через несколько дней жидкость фильтруют и разбавляют водой до 100 мл.

Реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье. В 10 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,85 г основного нитрата висмута и прибавляют 40 мл воды. К этому раствору прибавляют раствор, содержащий 8 г иодида калия в 20 мл воды. Перед употреблением берут 1 мл указанного раствора, прибавляют к нему 2 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды.

Реактив Зонненштейна. К раствору моногидрофосфата натрия прибавляют раствор молибдата аммония в азотной кислоте. Образовавшийся осадок отфильтровывают и растворяют в небольшом объеме карбоната натрия. Раствор выпаривают досуха, сухой остаток прокаливают, а затем охлаждают. К остатку прибавляют десятикратное количество воды и азотную кислоту до растворения осадка.

Реактив Майера. К 1,35 г хлорида ртути (II) прибавляют 20 мл 25%-го раствора иодида калия. После растворения хлорида ртути прибавляют воду до 100 мл.

Реактив Марки. К 1 мл концентрированной серной кислоты прибавляют каплю формалина и охлаждают. Этот реактив используют свежеприготовленным.

Реактив Манделина. К 0,01 г ванадата аммония прибавляют 2 мл концентрированной серной кислоты. Реактив должен быть свежеприготовленным.

Реактив Марме. В горячем растворе, содержащем 10 г иодида калия в 30 мл воды, растворяют 5 г иодида кадмия. Полученный раствор смешивают с равным объемом насыщенного раствора иодида калия.

Реактив Симона представляет собой смесь равных объемов 10% раствора ацетальдегида и 1% раствора нитропруссид натрия (компонент 1) и 2% раствор карбоната натрия (компонент 2).

Модифицированный реактив Симона представляет собой раствор 1 г нитропруссид натрия в 100 мл 5% водного раствора ацетона (компонент 1) и 2% водный раствор карбоната натрия (компонент 2).

Реактив ФПН. К 5 мл 5%-го раствора хлорида железа (III) прибавляют 45 мл 20%-го раствора хлорной кислоты и 50 мл 50%-го раствора азотной кислоты.

Реактив Фреде. К растертому в порошок молибдату аммония (или натрия) прибавляют концентрированную серную кислоту. Смесь интенсивно взбалтывают. Полученный насыщенный раствор молибденовой кислоты в концентрированной серной кислоте сливают с осадка. Реактив используют свежеприготовленным. При стоянии реактив может изменять свою окраску.

Реактив Шейблера. К 20 мл 25%-го раствора вольфрамата натрия прибавляют 10 мл 25%-го раствора фосфорной кислоты и хорошо перемешивают.

Реактив Эрдмана. К 20 мл концентрированной серной кислоты прибавляют 10 капель 15%-й азотной кислоты и взбалтывают.

Сульфаниловая кислота диазотированная. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 5 мл раствора сульфаниловой кислоты (4,5 г сульфаниловой кислоты и 45 мл концентрированной хлороводородной кислоты в 500 мл воды). Колбу охлаждают льдом и прибавляют 2,56 мл 10%-го раствора нитрита натрия. Смесь оставляют на льду на 5 минут, затем прибавляют еще 10 мл 10%-го раствора нитрита натрия, взбалтывают, оставляют на льду в течение 5 минут и объем раствора доводят водой до метки.

Сульфат ртути (II) 2%-й раствор. 5 г желтой окиси ртути растворяют в смеси 100 мл воды и 10 мл концентрированной серной кислоты, охлаждают, доводят водой до 250 мл.

Хлорцинкиод. Растворяют 2 г хлорида цинка в 10 мл воды (раствор А). В другой склянке растворяют 2,1 г иодида калия в 5 мл воды. В полученной жидкости растворяют 0,1 г дважды сублимированного иода (раствор Б). К раствору А прибавляют по каплям при перемешивании раствор Б. К смеси растворов А и Б прибавляют несколько кристаллов дважды сублимированного иода. Через сутки прозрачную жидкость переносят в склянку из оранжевого стекла.

<i>Предисловие</i>	3
<i>Список основных сокращений и условных обозначений</i>	5
Глава 11. МЕТОДЫ ИЗОЛИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ	7
11.1. Классификация лекарственных и наркотических веществ.....	7
11.2. Состояние лекарственных веществ кислотного и основного характера в растворах.....	9
11.3. Особенности анализа биологических объектов на наличие лекарственных веществ.....	10
11.4. Отбор и подготовка проб.....	19
11.5. Основные этапы изолирования экзогенных веществ из биологических объектов.....	20
11.6. Твердо-жидкостная экстракция.....	21
11.7. Жидкость-жидкостная экстракция.....	24
11.8. Сорбционное концентрирование.....	28
11.9. Способы очистки извлечений.....	32
11.10. Общие методы изолирования лекарственных веществ.....	33
11.10.1 Изолирование лекарственных веществ подкисленным спиртом.....	33
11.10.2. Изолирование лекарственных веществ подкисленной водой.....	35
Глава 12. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ	37
12.1. Общая характеристика методов.....	37
12.2. Хроматографические методы.....	40
12.2.1. Жидкостная колоночная хроматография.....	40
12.2.1.1. Жидкостная адсорбционная хроматография.....	44
12.2.1.2. Жидкостный хроматограф.....	48
12.2.1.3. Колонки.....	50
12.2.1.4. Адсорбенты.....	51
12.2.1.5. Подвижные фазы.....	53
12.2.1.6. Детекторы.....	60
12.2.1.7. Распределительная жидкостная хроматография.....	63
12.2.2. Планарная хроматография.....	67
12.2.2.1. Тонкослойная хроматография.....	69
12.2.2.2. Механизмы разделения и выбор элюента.....	70
12.2.2.3. Сорбенты.....	71
12.2.2.4. Техника выполнения ТСХ.....	74
12.2.2.5. Хроматографические характеристики.....	76
12.2.2.6. Типы элюирования.....	77
12.2.2.7. Способы детектирования.....	80

Оглавление

12.2.2.8. Количественное определение.....	81
12.2.3. Хроматографический скрининг лекарственных и наркотических веществ.....	82
12.2.3.1. ТСХ-скрининг лекарственных и наркотических веществ.....	83
12.2.3.2. Газохроматографический скрининг лекарственных соединений.....	90
12.2.4. Хромато-масс-спектрометрия.....	95
12.2.4.1. Хроматографы.....	96
12.2.4.2. Масс-спектрометры.....	97
12.2.4.3. Система газовый хроматограф – масс-спектрометр.....	104
12.2.4.4. Система жидкостный хроматограф – масс-спектрометр.....	108
12.2.4.5. Методы хромато-масс-спектрометрии.....	113
12.2.4.6. Применение хромато-масс-спектрометрии в химико-токсикологическом анализе.....	121
12.2.4.7. Определение токсикантов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды.....	126
12.2.5. Сверхкритическая флюидная хроматография.....	127
12.2.5.1. Общая характеристика и возможности СФХ.....	127
12.3. Электрофорез.....	130
12.3.1. Характеристика и применение электрофореза.....	130
12.4. Методы молекулярной спектрометрии.....	137
12.4.1. Молекулярно-абсорбционные методы.....	138
12.4.1.1. Спектрометрия в видимой и ультрафиолетовой области спектра.....	138
12.4.1.2. ИК-спектрометрия.....	144
12.4.1.3. Метрологические характеристики молекулярно-абсорбционных методов.....	148
12.4.1.4. Количественный анализ.....	149
12.4.2. Молекулярно-эмиссионные методы.....	151
12.4.2.1. Флуоресценция и фосфоресценция.....	151
12.4.2.2. Аппаратура в люминесцентном анализе.....	156
12.4.2.3. Аналитическое применение люминесцентных методов.....	156
12.4.2.4. Хемилюминесценция.....	157
12.5. Иммунохимические методы анализа.....	160
12.5.1. Иммуноферментный метод анализа.....	162
12.5.2. Радиоиммунный анализ (ria – radioimmunoassay).....	171
12.5.3. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (pfia – polarization fluorescence immunoassay).....	172
Глава 13. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА КИСЛОТНОГО ХАРАКТЕРА. ПРОИЗВОДНЫЕ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ.....	176

13.1. Общая характеристика и токсикологическое значение барбитуратов.....	176
13.2. Изолирование барбитуратов из биоматериала.....	183
13.3. Методы определения барбитуратов.....	184
Глава 14. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЕЩЕСТВ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА.....	198
14.1. Общая характеристика веществ основного характера.....	198
14.2. Физико-химические свойства	199
14.3. Факторы, влияющие на степень экстракции	200
14.4. Методы изолирования веществ основного характера.....	203
14.5. Общие методы анализа	205
14.6. Подтверждающие методы анализа	206
14.7. Количественное определение	208
14.8. Классификация веществ основного характера.....	208
14.9. Алкалоиды, производные ксантина.....	209
14.9.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных ксантина.....	209
14.9.2. Изолирование и определение производных ксантина... ..	212
14.10. Лекарственные вещества, производные пиразола.....	215
14.10.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных пиразола.....	216
14.10.2. Изолирование и определение производных пиразола.....	220
14.11. Лекарственные вещества, производные п-аминобензойной кислоты.....	225
14.11.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных п-аминобензойной кислоты.....	226
14.11.2. Изолирование и определение производных п-аминобензойной кислоты.....	228
14.12. Алкалоиды, производные тропана.....	230
14.12.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных тропана.....	231
14.12.2. Изолирование и определение производных тропана.....	234
14.13. Алкалоиды, производные хинолина и изохинолина.....	240
14.13.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных хинолина и изохинолина.....	241
14.13.2. Изолирование и определение хинина и папаверина.....	244
14.14. Лекарственные вещества, производные фенотиазина.....	250
14.14.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных фенотиазина.....	252
14.14.2. Изолирование и определение производных фенотиазина.....	256
14.15. Алкалоиды, производные индола.....	261
14.15.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных индола.....	261
14.15.2. Изолирование и определение производных индола.....	265

Оглавление

14.16. Лекарственные средства группы бензодиазепина	267
14.16.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных 1,4-бензодиазепина.....	268
14.16.2. Изолирование и определение производных 1,4-бензодиазепина.....	275
14.17. Алкалоиды, производные пиридина и пиперидина.....	278
14.17.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных пиридина и пиперидина.....	279
14.17.2. Изолирование и определение производных пиридина и пиперидина.....	280
Глава 15. НАРКОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА.....	283
15.1. Наркомания и токсикомания.....	283
15.2. Производные фенантренизохинолина.....	290
15.2.1. Общая характеристика и токсикологическое значение производных фенантренизохинолина.....	291
15.2.2. Изолирование и определение производных фенантренизохинолина	296
15.3. Производные фенилалкиламина.....	302
15.3.1. Общая характеристика и токсикологическое значение фенилалкиламинов	303
15.3.2. Изолирование и определение производных фенилалкиламинов.....	308
15.4. Каннабиноиды.....	311
15.4.1. Общая характеристика и токсикологическое значение каннабиноидов.....	312
15.4.2. Изолирование и определение каннабиноидов.....	315
15.5. Галлюциногены.....	316
Глава 16. ПЕСТИЦИДЫ.....	321
16.1. Классификация пестицидов.....	321
16.2. Общая характеристика пестицидов.....	324
16.3. Схема систематического анализа биологических жидкостей на основные группы пестицидов.....	324
16.4. Схемы изолирования некоторых групп пестицидов из биологических тканей.....	328
16.5. Методы определения пестицидов, выделенных из биоматериала или экологических проб.....	329
16.6. Фосфорсодержащие пестициды.....	333
16.7. Хлорорганические соединения.....	345
16.8. Эфиры карбаминовой кислоты.....	352
16.9. Синтетические пиретроиды.....	355
Глава 17. АНАЛИЗ ПИТЬЕВЫХ, СТОЧНЫХ ВОД И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ.....	359
17.1. Особенности анализа сточных вод.....	359
17.2. Отбор и консервирование проб.....	360

Оглавление

17.3. Основные показатели качества вод.....	360
17.4. Методы концентрирования микропримесей.....	361
17.5. Химическое и биохимическое потребление кислорода.....	370
17.6. Определение металлов.....	371
17.7. Определение органических веществ.....	371
17.8. Анализ пищевых продуктов.....	374
<i>Заключение</i>	376
<i>Глоссарий</i>	379
<i>Литература</i>	381
<i>Приложения</i>	387
1. Схемы методов изолирования токсических веществ.....	388
2. Свойства растворителей для жидкостной хроматографии.....	403
3. Спектральные характеристики флуоресцирующих лекарственных веществ.....	404
4. Миксотропная серия растворителей.....	405
5. Фармакологические пробы на атропин, стрихнин и никотин.....	406
6. Чувствительность общеалкалоидных реактивов по отношению к некоторым алкалоидам.....	407
7. Терапевтические, токсические и летальные концентрации некоторых лекарственных и наркотических веществ в крови.....	408
8. Приготовление реактивов для химико-токсикологического анализа.....	409