

ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫМОРАЖИВАНИЕ И ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ РЯДА АНТИГИСТАМИННЫХ СРЕДСТВ, НЕЙРОЛЕПТИКОВ, ТРАНКВИЛИЗАТОРОВ, ОПИАТОВ, ОПИОИДОВ, МЕСТНЫХ АНЕСТЕТИКОВ

Поспелова А.А., Малкова Т.Л., Карпова Л.Н.

*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Пермь
614070, г. Пермь, а/я 2600, тел. (342)282-58-65, kuznecovaperm@yandex.ru*

Резюме. Для осуществления аналитического контроля при судебно-химических исследованиях широко применяется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Наряду с традиционным нормально-фазным вариантом, для реализации которого характерно использование полярного сорбента и неполярного элюента, для расширения селективности метода и повышения достоверности получаемых данных в ходе работы был рассмотрен обращенно-фазный вариант (ОФ ТСХ), для которого характерно применение неполярного сорбента и полярного элюента. Исследование посвящено проблеме поиска рационального способа пробоподготовки модельной смеси биологического объекта (мочи) для последующего обнаружения аналитов методом ОФ ТСХ.

Ключевые слова: отравления, судебно-химическое исследование, экстракционное вымораживание, твердофазная экстракция, обращенно-фазная тонкослойная хроматография.

EXTRACTION FREEZING AND SOLID PHASE EXTRACTION IN FORENSIC-CHEMICAL INVESTIGATION OF SOME ANTIHISTAMINES, NEUROLEPTICS, TRANQUILIZERS, OPIATES, OPIOIDS, LOCAL ANAESTHETICS

Pospelova A.A., Malkova T.L., Karpova L.N.

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm

Summary. Thin-layer chromatography is widely used method for analytical control in forensic-chemical study. Nonpolar sorbent and polar eluent are used in traditional normal-phase thin-layer chromatography. Polar sorbent and nonpolar eluent are used in reversed-phase thin-layer chromatography. Reversed-phase thin-layer chromatography was considered for the

increase of method's selectivity and reliability of results. The research deals with rational ways of sample preparation of model mixture of urine for identification of analyzable compounds by reversed-phase thin-layer chromatography.

Key words: poisonings, forensic-chemical investigation, extraction freezing, solid phase extraction, reversed-phase thin-layer chromatography.

Введение. В настоящее время особую озабоченность вызывает злоупотребление лекарственными препаратами, оказывающими обезболивающее, а также снотворное и седативное действие, что неизбежно приводит к многочисленным отравлениям, в том числе и со смертельным исходом [1]. К их числу можно отнести опиаты, опиоиды, нейролептики, транквилизаторы, антигистаминные средства. По частоте развития лекарственных осложнений и немедицинского применения также стоит выделить группу местных анестетиков [2, 3]. Для осуществления аналитического контроля при судебно-химических исследованиях актуально применение высокочувствительных и специфичных методов анализа. В практике химико-токсикологических исследований большой популярностью пользуется метод ТСХ ввиду его доступности, простоты выполнения, экспрессности. Благодаря возможности изменения как сорбентов, так и растворителей удается исключительно быстро решать многие задачи разделения. Наиболее распространенным вариантом ТСХ является нормально-фазный, в котором подвижная фаза менее полярна в сравнении с неподвижной. Для расширения диапазона селективности ТСХ может быть использован ОФ вариант, где применяется сорбент гидрофобного характера и полярный элюент.

Воспроизводимые и надежные результаты гарантирует надлежащая пробоподготовка. Поэтому вопросу изолирования исследуемых соединений из биологической матрицы для последующего ОФ ТСХ-скрининга придается большое значение.

Материалы и методы. В качестве биологического объекта была выбрана моча, так как большинство экзотоксикантов и их метаболитов выводятся из организма с мочой; кроме того, незначительное содержание белковых компонентов в ней облегчает выделение и дальнейший анализ интересующих соединений [4, 5].

Для извлечения токсичных соединений из биообъектов применяют два варианта экстракции – жидкость-жидкостную (ЖЖЭ) и твердо-фазную (ТФЭ). Наиболее распространенным методом изолирования аналитов из мочи является ЖЖЭ [4]. Тем не менее, влияние эндогенных веществ мочи в экстрактах, полученных с применением ЖЖЭ,

значительно затрудняет определение анализируемых соединений методом ОФ ТСХ [6, 7]. Альтернативный вариант ЖЖЭ с применением экстракционного вымораживания был рассмотрен Бехтеревым и соавт. [8] для производных 1,4-бензодиазепаина [6].

В ходе исследования в отношении ряда антигистаминных средств (клемастин, дифенгидрамин, доксиламин), нейролептиков (азалептин), транквилизаторов (тофизопам), опиатов (кодеин, этилморфин), опиоидов (тримеперидин, трамадол), местных анестетиков (тримекаин, пиромекаин, кокаин, анилокаин) рассмотрено несколько вариантов экстракционного вымораживания аналитов в водорастворимый органический слой ацетонитрила.

Для модельных смесей, содержащих исследуемые соединения в количестве 3 мкг/мл, была опробована методика экстракционного вымораживания I, результаты применения которой представлены в таблице 1. К 4 мл мочи, содержащей исследуемые соединения, добавляли 2 М раствор калия гидроксида до pH 10 для перевода аналитов в форму оснований, 4 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали и помещали в морозильную камеру (температура -18—22 °С). После образования в нижней части флакона твердой фазы льда верхний слой ацетонитрила сливали. К оставшейся ледяной части пробы после размораживания при комнатной температуре добавляли 2 мл ацетонитрила и после перемешивания также помещали в морозильную камеру. Процедуру экстракции с 2 мл ацетонитрила повторяли дважды. Объединенные ацетонитрильные извлечения после трехкратной экстракции упаривали в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл органического растворителя и наносили на хроматографическую пластину с привитой фазой C18 («Merck») в виде полосы; параллельно наносили по 5 мкг стандартных растворов анализируемых соединений. Хроматографирование осуществляли в системах общего и частного скрининга (табл. 1, 2, 3, 4); детектирование вели УФ-облучением пластины при 254 нм.

В соответствии с методикой изолирования II (табл. 1, 2, 3, 4) к образцу мочи в количестве 4 мл добавляли 3 мл ацетонитрила, перемешивали, и, закрыв герметично флакон, помещали в морозильную камеру (температура -18—22 °С). После образования в нижней части флакона твердой фазы льда и отделения верхней жидкой фазы к растаявшей при комнатной температуре водной части добавляли новую порцию ацетонитрила в количестве 3 мл, перемешивали и вновь помещали в морозильную камеру. Образовавшуюся жидкую фазу прибавляли к первой порции экстракта. К объединенному ацетонитрильному извлечению добавляли 6 мл воды очищенной, 2 мл 25 % раствора аммония сульфата, доводили 25 % раствором аммиака до pH 10 и проводили экстракцию

хлороформом по 5 мл 2 раза. Объединенные хлороформные извлечения упаривали в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл органического растворителя и наносили на хроматографическую пластину в виде полосы. Параллельно на пластину наносили по 5 мкг стандартных растворов анализируемых соединений.

Роль метода ТФЭ для быстрой и селективной подготовки образцов на сегодняшний день возрастает. К достоинствам метода ТФЭ можно отнести одновременное проведение процессов изолирования, концентрирования и очистки при правильном подборе условий. Это позволяет сократить временные затраты на пробоподготовку, уменьшить расход растворителей, увеличить точность последующего анализа. За счет специфических взаимодействий можно селективно концентрировать и извлекать каждое из определяемых соединений, отделять их от соэкстрактивных компонентов [9, 10]. В ходе эксперимента по изучению влияния балластных веществ мочи на результаты последующего определения применяли ТФЭ с применением картриджей Evolute ABN 25 мг/3 мл. Сорбент используемых картриджей позволяет эффективно экстрагировать различные вещества ввиду оптимальной комбинации гидрофобных и гидрофильных взаимодействий между анализируемыми соединениями, сорбентом и элюирующими компонентами.

Перед проведением ТФЭ образец мочи разбавляли 1 % раствором муравьиной кислоты (1:1) для разрушения связей аналитов с белками. Процесс сольватации обычно является первым шагом экстракции и включает в себя пропускание органического растворителя (3 мл метанола) через колонку. Органический растворитель смачивает сорбент, что гарантирует его взаимодействие с образцом матрицы. После сольватации проводили уравнивание колонки растворителем, подходящим для образца (3 мл 0,1 % раствора муравьиной кислоты). При вводе пробы (0,5 мл) необходимо соблюдать скорость ее прохождения через сорбент, так как очень высокая скорость может стать причиной снижения воспроизводимости. Элюирование балластных веществ биопробы осуществляли смесью метанола и 0,1 % раствора муравьиной кислоты (5:95) – методика изолирования III (табл.1); смесью метанола и воды (5:95) – методика изолирования IV (табл. 1, 2, 3, 4). Завершающим этапом ТФЭ является вымывание анализируемых соединений из экстракционной колонки (3 мл метанола); для получения корректных результатов необходимо также следить за скоростью прохождения элюирующего растворителя.

Для максимизации получения достоверных и сопоставимых данных при судебно-химических исследованиях важно оценить качество результатов измерений, полученных с использованием методики в течение длительного промежутка времени. После наработки

экспериментального материала в количестве 10 серий (2 определения в каждой серии) в условиях повторяемости были рассчитаны значения величин R_f .

Результаты и обсуждение. Ацетонитрильные извлечения, полученные по методике изолирования I (табл. 1), содержат помимо анализируемых соединений значительное количество соэкстрактивных веществ, что затрудняет идентификацию аналитов. Вероятно, большое количество балласта на хроматограмме связано с тем, что водорастворимый органический растворитель – ацетонитрил – обладает сродством к широкому кругу соединений и способен извлекать вещества как в ионизированной, так и в молекулярной форме.

Далее был рассмотрен перевод эндогенных веществ мочи в слой ацетонитрила при pH 3 с последующим отбрасыванием органического слоя. Экстракцию аналитов из оставшейся водной части проводили хлороформом при pH 10. Обнаружение анализируемых соединений методом ОФ ТСХ не выявило их присутствия на пластине, что также демонстрирует способность ацетонитрила извлекать аналиты совместно с эндогенными веществами биологического объекта.

Изолирование по методике II (табл. 1) позволило уменьшить интенсивность области распределения балластных веществ на хроматограмме. Тем не менее, как и при использовании методики I границы расположения соэкстрактивных веществ совпадают с областью расположения анализируемых соединений, что затрудняет обнаружение искомых веществ при общем скрининге.

При сравнении методик изолирования на основе экстракционного вымораживания I и II (табл. 1), стоит отметить более интенсивный фон балласта на хроматограмме при применении методики I.

Применение ТФЭ (методики изолирования III и IV, табл. 1) также не позволило получить экстракты, свободные от соэкстрактивных веществ. Распределение балласта по полю хроматограммы перекрывает область расположения аналитов.

Таблица 1 – Хроматографическое поведение анализируемых и соэкстрактивных веществ при изолировании из мочи методом экстракционного вымораживания и ТФЭ

Подвижная фаза при ОФ ТСХ-скрининге	Методика изолирования	$R_f \times 100$ аналитов	Зоны соэкстрактивных веществ, $R_f \times 100$
--	--------------------------	---------------------------	--

<u>Ацетонитрил-этанол-25 %</u> <u>раствор аммиака 3:6,5:0,5</u> (система для общего скрининга)	I	Кодеин – 64 Трамадол – 71 Этилморфин – 64	53 – 97
	II	Промедол – 76 Тримекаин – 83 Пиромекаин – 83 Кокаин – 84	55 – 90
	III	Анилокаин – 79 Клемастин – 61 Дифенгидрамин – 74	67 – 72; 75 – 93
	IV	Доксиламин – 72 Азалептин – 75 Тофизопам – 87	65 – 69; 74 – 96

Вследствие значительного воздействия соэстрактивных веществ на способность идентификации исследуемых соединений в системе общего скрининга, рассмотрено хроматографическое поведение анализируемых веществ и балласта в системах частного скрининга (табл. 2, 3, 4).

Таблица 2 - Хроматографическое поведение опиатов, опиоидов и соэстрактивных веществ при изолировании из мочи методом экстракционного вымораживания и ТФЭ

Подвижная фаза при ОФ ТСХ-скрининге	Методика изолирования	Rf×100 аналитов	Зоны соэстрактивных веществ, Rf×100
<u>Метанол-вода-25 %</u> <u>раствор аммиака 6:4:6</u> (система для частного скрининга опиатов, опиоидов)	II	Кодеин – 42 Трамадол – 28 Этилморфин – 34 Тримеперидин – 24	15 – 25
	IV		79 – 99

В ходе применения методики изолирования II (табл. 2) балластные вещества в частной системе для группы опиатов, опиоидов на хроматограмме расположились в области, отличной от зоны расположения аналитов, что позволяет провести их идентификацию. При проведении ТФЭ по методике изолирования IV (табл. 2) соэстрактивные вещества также не «мешают» обнаружению искомым соединений, располагаясь в верхней области поля хроматограммы.

Таблица 3 - Хроматографическое поведение ряда местных анестетиков и соэкстрактивных веществ при изолировании из мочи методом экстракционного вымораживания и ТФЭ

Подвижная фаза при ОФ ТСХ-скрининге	Методика изолирования	Rf×100 аналитов	Зоны соэкстрактивных веществ, Rf×100
<u>Этанол-вода-25 % раствор аммиака 6:2:4</u> (система для частного скрининга ряда местных анестетиков)	II	Тримекаин – 49 Пиромекаин – 27 Кокаин – 62 Анилокаин – 47	78 – 98
	IV		78 – 98

В системе для частного скрининга ряда местных анестетиков стоит отметить пригодность применения варианта экстракционного вымораживания II (табл. 3) и ТФЭ – IV (табл. 3) для их изолирования из мочи ввиду расположения зоны соэкстрактивных веществ в верхней части хроматограммы, что не перекрывает область расположения аналитов.

Таблица 4 - Хроматографическое поведение ряда ряда антигистаминных средств, средств, действующих на центральную нервную систему посредством различных механизмов и соэкстрактивных веществ при изолировании из мочи методом экстракционного вымораживания и ТФЭ

Подвижная фаза при ОФ ТСХ-скрининге	Методика изолирования	Rf×100 аналитов	Зоны соэкстрактивных веществ, Rf×100
<u>Метанол-25 % раствор аммиака 7:3</u> (система для частного скрининга ряда антигистаминных средств, средств, действующих на центральную нервную систему посредством различных механизмов)	II	Клемастин – 30 Дифенгидрамин – 61 Доксиламин – 68 Азалептин – 55	53 – 58; 81 – 90
	IV	Тофизопам – 73	81 – 85

Система для частного скрининга ряда антигистаминных средств и средств, действующих на центральную нервную систему посредством различных механизмов, позволяет разделить аналиты и соэкстрактивные вещества на хроматограмме. Разделение возможно как в ходе применения методики изолирования II, так и – IV (табл. 4).

Необходимо отметить, что более интенсивные полосы балласта наблюдались при использовании ТФЭ – IV в сравнении с методикой экстракционного вымораживания II (табл. 2, 3, 4).

Выводы. При направленном исследовании на группы анализируемых соединений системы для частного скрининга позволяют разделить области расположения соэкстрактивных и исследуемых веществ в поле хроматограммы. Таким образом, применение метода экстракционного вымораживания и ТФЭ может быть успешно реализовано в практике судебно-химических исследований. При проведении общего скрининга рекомендуем применять альтернативные способы пробоподготовки мочи.

Литература.

1. Химико-токсикологическое исследование доксиламина / А.В. Киреева [и др.] // Судеб.-мед. экспертиза. – 2007. – № 3. – С. 22–25.
2. Столяров, Е.Е. Определение ряда местных анестетиков в биологических жидкостях при химико-токсикологических исследованиях / Е.Е. Столяров, Ю.Н. Карпенко, Т.Л. Малкова // Судеб.-мед. экспертиза. – 2009. – № 3. – С. 24–27.
3. Экспертное исследование кокаина : метод. рекомендации // Новые лекарств. препараты. – 2006. – В. 2. – С. 63–71.
4. 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 ; под ред. Б.Н. Изотова. – М. : Мысль, 1993. – 271 с.
5. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов : учеб. пособие / под ред. Н.И. Калетиной. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016 с. : ил.
6. Пospelова, А.А. Использование жидкость-жидкостной экстракции при определении производных 1,4-бензодиазепина и фенотиазина в моче методом обращенно-фазной тонкослойной хроматографии / А.А. Пospelова // Морфология критических и терминальных состояний : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки РФ, профессора В.И. Алисиевича / под ред. Е.С. Тучика, Д.В. Сундукова, Е.Х. Баринаова. – М., 2011. – С. 149–153.
7. Пospelова, А.А. Применение жидкость-жидкостной экстракции при определении ряда представителей опиатов, опиоидов и местных анестетиков

в моче методом обращено-фазной тонкослойной хроматографии / А.А. Поспелова // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 75-летию Пермск. гос. фармацевт. академии (7–9 дек. 2011 г.). – Пермь, 2011. – С. 129–132.

8. Бехтерев, В.Н. Использование экстракционного вымораживания для анализа 1,4-бензодиазепинов в моче / В.Н. Бехтерев, С.Н. Гаврилова, И.В. Маслаков // Судеб.-мед. экспертиза. – 2007. – № 2. – С. 32–35.
9. ЗАО «Аквилон» [Электронный ресурс] : официальный сайт. – Электрон. дан. – Режим доступа : <http://www.prochrom.ru/ru/?idp=SPE>.
10. ЗАО «БиоХимМак СТ» [Электронный ресурс] : официальный сайт. – Электрон. дан. – Режим доступа : <http://www.bcmst.ru/analyt3/ppboij>.