

Лекция № 3.

Методы изолирования ксенобиотиков из биологических объектов при проведении судебно-химического анализа.

Сравнительная характеристика общих и частных методов изолирования. Теоретические основы пробоподготовки при исследовании биожидкостей. Экстракция в системах жидкость-жидкость и твердая фаза-жидкость. Способы очистки изолятов.

Классификация веществ, вызывающих отравление, в соответствии с методами изолирования при проведении ХТА.

I. Токсические вещества органической природы.

1. Группа токсикологически важных веществ, изолируемых дистилляцией («летучие яды»): синильная кислота, спирты, этиленгликоль, алкилгалогениды (хлороформ, хлоралгидрат, четыреххлористый углерод, дихлорэтан), формальдегид, ацетон, фенол, уксусная кислота.

2. Группа токсикологически важных веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией:

- лекарственные средства (барбитураты, алкалоиды, синтетические лекарственные вещества – 1,4-бензодиазепины, производные фенотиазина, фенилалкиламины);
- наркотические вещества (каннабиноиды, эфедрон);
- пестициды (ФОС, хлорорганические – гептахлор, гексахлорциклогексан, производные карбаминовой кислоты – севин).

II. Токсикологические вещества неорганической природы.

- 1. Группа токсикологически важных веществ, изолируемых минерализацией:** «металлические яды» - соединения Ba, Pb, Mn, As, Cu, Sb, Bi, Hg и др.
- 2. Группа токсикологически важных веществ, изолируемых экстракцией водой:** кислоты (серная, азотная, соляная), щелочи (гидроксиды натрия, калия, аммония), нитраты и нитриты.
- 3. Группа токсикологически важных веществ, требующих особых методов изолирования:** соединения фтора.
- 4. Группа веществ, не требующих особых методов изолирования:** вредные пары и газы, оксид углерода.

Наиболее распространенный способ выделения ядов - их извлечение из объектов с помощью различных растворителей.

В токсикологической химии путем **экстракции** выделяют ядовитые вещества из *твердой фазы* (различные ткани, органы, растительные объекты) и из *жидкой фазы* (кровь, моча, слюна, промывные воды желудка, перитонеальная жидкость и др).

Выделение токсических веществ из жидкой фазы (**реэкстракция**) часто используется и для очистки извлечений от примеси эндогенных соединений.

Таким образом, **жидкостная экстракция** является одним из главных способов выделения многих ядов из биологических объектов.

С помощью жидкостной экстракции рекомендуется проводить выделение из объектов различных групп соединений. Среди них лекарственные, наркотические вещества, пестициды и др.

В токсикологической химии рассматриваются следующие **группы лекарственных и наркотических веществ**, производные:

- пиридина и пиперидина (никотин, анабазин, пахикарпин);
- тропана (атропин, кокаин, скополамин);
- хинолина(хинии);
- тетрагидроизохинолина (наркотин);
- бензилизохинолина (папаверин);
- фенантренизохинолина (опиаты: морфин, кодеин, наркотин, тебаин, этилморфин, диацетилморфин (героин));
- опиоидные анальгетики - промедол, фентанил, трамал, метадон;
- индола (стрихнин, бруцин, LSD и др.);
- пурина (кофеин);
- фенциклидин и его аналоги (тиеноциклидин, ролициклин, этициклидин);
- производные барбитуровой кислоты: фенobarбитал, барбамил, бутобарбитал, этамиал-натрий, барбитал;
- производные 1,4-бензодиазепина: хлордиазепоксид, диазепам, оксазепам, нитразепам;
- производные п-аминобензойной кислоты: новокаин, новокаионамид;
- производные фенотиазина: аминазин, дипразин, левомепрамазин, тиоридазин;
- каннабиноиды: каннабидиол, каннабинол, тетрагидроканнабинол, тетрагидроканнабиноловая кислота;
- фенилалкиламины: эфедрин, эфедрой, амфетамин, метамфетамин.

Характерной их особенностью является способность давать ионизированные и неионизированные формы. Существование различных форм зависит от величины **константы ионизации вещества** и значения **pH** среды.

Для **кислот** константа ионизации определяется уравнением:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

или в логарифмической форме:

$$pK_a = pH + \lg [HA] - \lg [A^-]$$

Для **оснований**:

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [B]}{[BH^+]}$$

в логарифмической форме:

$$pK_a = pH + \lg [B] - \lg [BH^+].$$

Кислота будет полностью (99,9%) ионизирована при $pH = pK_a + 3$, а основание - при $pH = pK_a - 3$ в *водных растворах*. В смешанных или неводных растворителях эти соотношения могут изменяться. Достичь условий полной ионизации веществ удастся не всегда. В этих случаях ограничивают значения **pH** до величины **$pK_a \pm 2$** и даже меньше. При $pH = pK_a$ только 50% вещества будет находиться в ионизированной форме.

Первый этап изолирования - извлечение ядовитых веществ из твердых объектов (твердая фаза) водным или спиртовым раствором кислоты или основания (**твердо-жидкостная экстракция**). На этом этапе измельченные внутренние органы заливают экстрагентом, устанавливают необходимое значение pH и настаивают в течение определенного времени.

Выбор растворителя и время настаивания зависят от многих факторов.

Вода и спирт отвечают многим требованиям, предъявляемым к экстрагентам. В них хорошо растворяются многие соли оснований и кислот.

Время настаивания зависит от скорости проникновения экстрагента внутрь ткани.

Продолжительность настаивания определяется моментом наступления равновесия между концентрацией токсического вещества в ткани и окружающей жидкости.

Вода имеет большее сродство к тканям. Поэтому вода легко проникает в ткани. Время настаивания объекта с водой и наступление равновесия составляет 1-2 ч.

Спирт денатурирует белковые молекулы на поверхности кусочков биологического материала, его проникновение в ткани затрудняется, и равновесие возникает не менее чем через 6 часов.

Для создания необходимого **значения pH среды** объект с экстрагентом подкисляют органической или неорганической кислотой (разбавленной). Природа кислоты может оказывать влияние на степень изолирования алкалоидов и органических оснований из биологического материала.

Чем лучше растворяются соли ядовитых веществ в данном растворителе, тем лучше они будут извлекаться.

Второй этап изолирования ядовитых соединений из трупного материала - **жидкость-жидкостная экстракция**. Самостоятельно применяется при извлечении веществ из крови, лимфы, слюны, перитониальной жидкости, мочи и промывных вод желудка.

Жидкость-жидкостная экстракция - это метод выделения, разделения и концентрирования веществ, основанный на распределении растворенного вещества между двумя жидкими несмешивающимися фазами.

В токсикологической химии чаще всего одной жидкой фазой является вода, другой - органический растворитель.

Органический растворитель должен обладать высокой растворяющей способностью для анализируемого вещества, иметь низкую температуру кипения (диэтиловый эфир и хлороформ). Выбор органического растворителя определяется свойствами анализируемого соединения.

В условиях равновесия отношение концентраций вещества в обеих фазах представляется **константой распределения (K)**, которая не зависит от общей концентрации вещества.

$$K = \frac{[C_o]}{[C_v]}$$

Чем больше K_p , тем эффективнее идет экстракция

Коэффициент распределения определяют экспериментально в реальных условиях. Его значение используют для разработки условий экстракции ядовитого вещества.

Степень извлечения (процент экстракции) R при однократной экстракции рассчитывают по формуле:

$$R = \frac{100 \cdot D}{D + V_B/V_O}$$

где D - коэффициент распределения
 V_{H_2O} - объем водной фазы
 $V_{орг}$ - объем органической фазы

При **многократной экстракции** удастся добиться полной экстракции значительно меньшим объемом органического растворителя. В этом случае расчет степени экстракции проводится по формуле:

$$R = 100 \cdot \left[1 - \left(\frac{V_B}{DV_O + V_B} \right)^n \right]$$

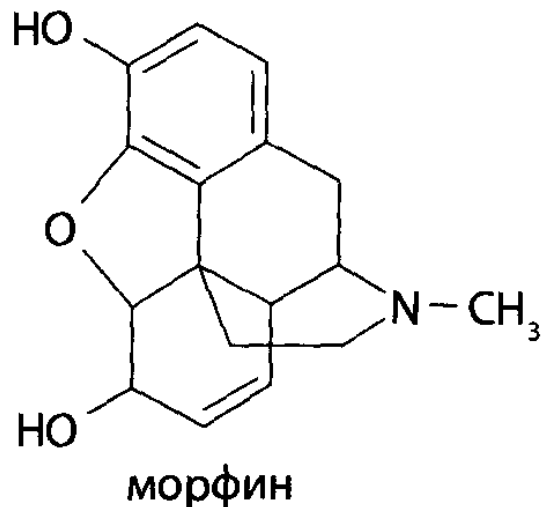
где n - кратность экстракции.

Добавление электролитов в водную вытяжку оказывает высаливающее действие за счет понижения растворимости ядовитых веществ в воде. В результате повышается степень их экстракции органическим растворителем.

Влияние pH зависит от характера извлекаемого вещества:

- при экстракции органическим растворителем вещество в водной фазе должно находиться в молекулярном, неионизированном состоянии;
- для веществ кислотного характера необходимо создать в растворе $\text{pH} = \text{pK}_a - 2$, а для оснований - $\text{pH} = \text{pK}_a + 2$;
- для веществ нейтрального характера значение pH особого значения не имеет. Эти соединения экстрагируются как из кислой, так и из щелочной среды;
- для веществ, являющихся амфолитами, расчет pH для экстракции производится иначе. В этих соединениях имеются кислотная и основная группы, и для каждой известна величина pK_a .

Расчет оптимальных значений pH для экстракции морфина



Морфин проявляет кислотные свойства за счет фенольного гидроксила ($pK_{a1}=10$) и основные свойства за счет третичной аминогруппы ($pK_{a2}=6,17$).

$$pH_{\text{экстракции}} = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{10 + 6,17}{2} = 8,08$$

Методы изолирования токсических веществ экстракцией органическими растворителями.

1. Общие методы:

- Метод Стасса-Отто (изолирование подкисленным спиртом)
- Метод Швайковой-Васильевой (изолирование подкисленной водой)

2. Частные методы:

- Метод Крамаренко
- Метод Валова
- Метод Поповой
- Метод Саломатина
- Метод Карташева
- др.

Изолирование подкисленным спиртом (метод Стасса-Отто)

1 этап

- Настаивание измельченного объекта 100 г с этиловым спиртом 96%, подкисленным щавелевой кислотой до $\text{pH} = 2,5-3$, в течение суток, трижды.
- Упаривание объединенных спиртовых извлечений при температуре 40-50°C до густого остатка, в который по каплям добавляют абсолютный этанол для коагуляции белков.
- Упаривание фильтрата при той же температуре до густого остатка и разбавление горячей водой для удаления смолистых веществ, жиров и пигментов.

2 этап

- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата хлороформом при $\text{pH} = 2$ (трехкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).
- Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя до $\text{pH} = 9-10$, экстрагирование веществ сильноосновного характера (трехкратная экстракция) хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

Изолирование подкисленным спиртом (метод Стасса-Отто)

Достоинства метода:

1. Метод универсален, т.к. этанол является хорошим растворителем для многих веществ этой группы (как ионизированных, так и молекулярных форм).
2. Метод предусматривает очистку извлечения от балластных веществ.

Недостатки метода:

1. Длительность (8-10 рабочих дней) и многостадийность.
2. Потери искоемых веществ.
3. Сравнительная дороговизна метода.

Изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой Швайковой-Васильевой

- Настаивание измельченного объекта 100 г с водой, подкисленной щавелевой кислотой до $\text{pH} = 2-3$ (1:2), в течение двух часов, затем 1 час.
- Центрифугирование 30 мин при 3000 об./мин.
- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата (центрифугата) хлороформом при $\text{pH} = 2$ (трехкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).
- Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя 25% раствором аммиака до $\text{pH} = 9-10$, экстрагирование веществ основного характера трехкратной экстракцией хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

Достоинства метода:

1. Быстрота (анализ можно провести в течение одного рабочего дня).
2. Меньшее количество операций, меньшие потери искоемых веществ.
3. Экономичность и дешевизна.

Недостаток метода:

Образование стойких эмульсий при экстрагировании веществ из водной фазы хлороформом. Метод не пригоден при анализе загнившего материала.

Изолирование барбитуратов подщелоченной водой (метод Валова)

- **Настаивание** измельченного объекта 100 г с водой, подщелоченной 20% раствором гидроксида натрия до $\text{pH}=10$ и более, в течение 30 минут. Центрифугирование.
- **Очистка** водного извлечения путем насыщения вольфраматом натрия в кислой среде (H_2SO_4) до $\text{pH } 2$, нагревание, фильтрование раствора или центрифугирование.
- **Экстрагирование** диэтиловым эфиром при $\text{pH}=2$. Реэкстракция водным раствором гидроксида натрия. Повторная экстракция диэтиловым эфиром при $\text{pH}=2$, концентрирование эфирного извлечения упариванием.

Достоинство метода:

Метод дает достаточно чистые извлечения, т.к. включает стадию очистки (осаждение белков вольфраматом натрия), что повышает качество последующего анализа. Позволяет выделить 50-90% барбитуратов.

Недостаток метода:

Соосаждение барбитуратов с белками при обработке вольфраматом натрия.

Частный метод изолирования алкалоидов водой, подкисленной серной кислотой (по В.Ф.Крамаренко)

- Настаивание измельченного объекта 100 г с водой, подкисленной 20% раствором серной кислоты до pH 2-3, в течение двух часов, затем 1 часа. Объединение, центрифугирование.
- Очистка водного извлечения от белковых соединений путем насыщения его сульфатом аммония, настаивания в течение часа и фильтрования или центрифугирования образовавшегося осадка.
- Очистка фильтрата от жиров, смол, пигментов путем экстракции эфиром. Эфирное извлечение отбрасывают.
- Подщелачивание водного извлечения 20% раствором гидроксида натрия и экстрагирование веществ основного характера хлороформом при pH 8,5-9 (четырекратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием.

Достоинства метода:

1. Быстрота
2. Хорошая очистка извлечений от соэкстрактивных веществ

Недостаток метода:

Потеря искоемых веществ из-за соэкстракции на стадии очистки.

Метод В.И.Поповой

1-й этап. Измельченный объект массой 100 г заливают 80 мл 0,02 М раствора серной кислоты ($\text{pH}=2,3$) и настаивают 3 раза: 2 ч, 1 ч и 1 ч. Водную вытяжку процеживают через тройной слой марли и центрифугируют в течение 25-30 мин при скорости 3000 об./мин. Надосадочную жидкость отделяют и очищают с помощью гель-хроматографии. С этой целью предложен **гель сефадекс G-25**. Барбитураты с колонки элюируют с помощью 0,02 М раствора серной кислоты.

2-й этап. Элюат подвергают концентрационному экстрагированию путем повторной экстракции хлороформом или диэтиловым эфиром.

Оценка метода. Метод обеспечивает хорошую очистку извлечений. Он применим при исследовании объектов, подвергшихся гнилостным изменениям, однако может использоваться для изолирования ограниченного числа веществ, в частности барбитуратов.

Метод Е.М.Саломатина. Производные фенотиазина, обладая слабыми основными свойствами, при $\text{pH}=2-3$ образуют ионизированную форму, а при $\text{pH}>7$ - неионизированную.

1 -й этап. Объект заливают 96% этиловым спиртом, подкисляют щавелевой кислотой до $\text{pH}=2-3$ и настаивают 3 раза по 2 ч. Спиртовые вытяжки упаривают при 40°C до густоты сиропа. В остатке осаждают белки 96% спиртом, фильтруют и выпаривают досуха. Очищенный остаток растворяют в 100 мл воды, нагретой до температуры $40-60^{\circ}\text{C}$, охлаждают и фильтруют.

2-й этап. Фильтрат экстрагируют дважды диэтиловым эфиром при $\text{pH}=2-3$. Затем водную фазу подщелачивают 50% раствором гидроксида натрия и вновь экстрагируют диэтиловым эфиром. Объединенные эфирные вытяжки взбалтывают с 0,5 М раствором серной кислоты и полученный кислый водный реэкстракт используют для обнаружения производных фенотиазина.

Оценка метода. Метод позволяет достичь максимальной экстракции при изолировании и уменьшить потери исследуемых веществ как при изолировании, так и при экстракции.

Изолирование нейтральным ацетоном (В. А. Карташова).

В качестве экстрагента предложен амфифильный растворитель ацетон, который способен смешиваться как с водой, так и с липидами.

Схема метода

1-й этап. 5 г гомогенизированного биологического материала четырехкратно извлекают ацетоном последовательно 10,0; 5,0; 5,0 и 5,0 мл с помощью аппарата для встряхивания, каждый раз в течение 5 мин. Затем пробы центрифугируют при 2,5 тыс. об./мин в течение 5 мин. Ацетоноводный экстракт смешивают с 4 г высушенного карбоната калия. Ацетоновый слой отделяют, добавляют 20 мл 0,5 М раствора хлороводородной кислоты и 10 мл н-гексана, встряхивают. Органическую фазу, содержащую гидрофобные примеси, отбрасывают.

2-й этап. Водную фазу экстрагируют эфиром, эфир испаряют и анализируют на вещества кислотного характера. Оставшийся водный раствор подщелачивают 25% раствором аммиака до $\text{pH}=9-10$, добавляют 3 г хлорида натрия (для высаливающего эффекта) и экстрагируют диэтиловым эфиром. Эфир испаряют и остаток исследуют на вещества основного характера.

Оценка метода. Способ позволяет получать достаточно чистые экстракты. В процессе гомогенной экстракции анализируемые вещества практически не теряются. При реэкстракции потери веществ не превышают 5-6%.

Теоретические основы пробоподготовки при исследовании биологического материала.

Экстракция в системах жидкость-жидкость и твердая фаза-жидкость.

Способы очистки изолятов.

Подготовка объектов к изолированию ядовитых веществ

Внутренние органы (печень, почки, мышечная ткань и др.).

- **измельчение** до размеров кусочков 0,5х0,5х0,5 см. Более мелкое измельчение приводит к увеличению экстракционной поверхности и одновременно к значительному увеличению количества балластных эндогенных соединений (белков, ферментов, продуктов распада белковых молекул, пигментов и др.) в извлечении. Что потребует особых способов очистки и приведет к потере токсических веществ, особенно при их следовых количествах в объекте.
- **вымораживание** объекта при температуре -30-40°C. При этом в органах образуются льдинки, которые разрывают клетки, ткани и способствуют выходу токсических веществ в окружающую среду, что увеличивает процент изолирования искоемых соединений.
- **лиофилизация**, т.е. высушивание объекта при низких температурах в вакууме. Приводит к потере объектом воды и получению при изолировании более чистых извлечений.
- Если объект законсервирован спиртом, его осторожно удаляют. В случае подозрения на отравление летучими соединениями мышьяка, ртути объект подщелачивают перед удалением спирта карбонатом натрия.

Кровь.

Ядовитые вещества и их метаболиты в крови находятся в свободном виде или могут быть связаны с белками (альбуминами, глобулинами). При пробоподготовке крови к экстракции используют приемы, позволяющие разрушить комплекс анализируемого вещества с белком.

- **Добавление к крови смешивающихся с водой органических растворителей** (этилового, метилового спиртов, ацетонитрила, ацетона). Их количество в 10 раз превышает объем крови. В результате под влиянием ацетона и спиртов (этилового и метилового) происходит агрегация молекул белковых веществ крови, понижается растворимость и происходит выпадение их в осадок.
- **Добавление химических агентов для коагуляции белков:** кислот (трихлоруксусной, хлорной), солей тяжелых металлов (например, солей бария).
- **Термическая обработка крови** (для ядовитых веществ, которые не разлагаются при повышенной температуре).

Процесс пробоподготовки крови к анализу - весьма ответственная операция, при которой возникает опасность адсорбции значительного количества анализируемого вещества на скоагулированном белке.

Моча.

С мочой токсические вещества выделяются в неизмененном виде и в виде метаболитов и конъюгатов с серной, уксусной, глюкуроновой кислотами.

Пробоподготовка мочи к экстракции ТВ и их метаболитов включает **проведение разрушения конъюгатов** с указанными кислотами:

- **Неспецифический кислотный гидролиз.**
- **Специфический ферментативный гидролиз.**

Неспецифический кислотный гидролиз. Быстрый и простой метод. Однако вследствие неспецифичности реакции расщепления ковалентной связи и жестких условий проведения в среде концентрированной кислоты при кипячении в течение длительного времени или при нагревании в автоклаве под давлением, образуется большое количество побочных продуктов.

Экстракция органическим растворителем из полученного гидролизата дает высокий фон и много посторонних пиков при проведении анализа методом газовой хроматографии.

Кислотный гидролиз проводится в герметично закрытых сосудах, которые помещают в водяные бани или специальные нагревательные блоки. Можно использовать кипячение с обратным холодильником или нагревание при 100—125°C в автоклаве под давлением 0,84-1,05 атм.

Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) для опиатов рекомендуется проводить **кислотный гидролиз** по следующей методике:

- в пробирку емкостью 50 мл вносят 10 мл мочи, добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, герметично закрывают пробирку и нагревают в водяной бане при 100°C около 60 мин. После охлаждения проводят экстракцию органическим растворителем.

Ферментативный гидролиз проводится в присутствии одного или смеси ферментов сульфатазы и глюкуронидазы в мягких условиях, что уменьшает образование побочных продуктов, и гидролизат получается более чистым.

Недостаток метода: соблюдение строгих условий гидролиза: pH, состава буфера, температуры, активности ферментов, длительность (12-20 ч).

Методика, рекомендованная ВОЗ для ферментативного гидролиза опиатов, сводится к следующему: в 5-10 мл мочи создают pH=7 с помощью уксусной кислоты, затем добавляют 0,1 мл 0,1 М ацетатного буферного раствора с pH=5,5 и 0,02 мл фермента (75 ЕД/мл) на каждый мл мочи. Смесь оставляют на 24 ч при 37°C или на 1 ч при 55°C. Температура не должна превышать 55°C, иначе фермент может подвергнуться денатурации. После охлаждения проводят экстракцию органическим растворителем.

Слюна.

Для снижения активности ферментов слюну при хранении замораживают. Перед экстракцией ее разбавляют водой очищенной в отношении 1:3, после чего экстрагируют токсические вещества органическими растворителями при соответствующем значении pH.

Волосы, ногти.

Для удаления внешних загрязнений волосы и ногти отмывают 2 М раствором хлороводородной кислоты и метанолом (или этанолом), затем сушат при комнатной температуре и отбирают для анализа навеску 30-40 мг.

Очистка вытяжек из биологического материала на первом этапе изолирования.

В нейтральной среде белки мало растворимы в воде и спирте. Однако при подкислении они в большей степени растворяются в воде. Значительно сильнее в подкисленной воде способны растворяться пептиды и аминокислоты. При анализе биологического материала, находящегося в состоянии гнилостного разложения, количество извлекаемых эндогенных соединений увеличивается.

По составу примесей водная и спиртовая вытяжки отличаются между собой.

В водном извлечении содержится больше низкомолекулярных пептидов и аминокислот.

В спиртовой вытяжке содержатся примеси липопротеидов, липидов, птомаинов, некоторых аминокислот. Белки в спиртовое извлечение переходят в меньшем количестве, чем в водное, так как спирт вызывает денатурацию белка и уменьшает его растворимость.

Очистка вытяжек от балластных веществ достигается несколькими способами: **осаждением примесей различными реагентами, фильтрованием, центрифугированием, гель-хроматографией и другими методами.**

Осаждение белковых молекул методом высаливания проводится путем добавления к водной вытяжке из объекта электролитов. При высоких концентрациях электролитов в растворе, белки выпадают в осадок за счет резкого снижения их растворимости. Поэтому для высаливания белков используют высокие концентрации солей. В качестве электролитов при очистке извлечений из трупного материала применяют соли :

- сульфат аммония - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
- вольфрамат натрия - Na_2WO_4 и др.

Метод высаливания является одним из эффективных способов осаждения примесей из вытяжек, полученных при настаивании гнилостно-разложившегося биологического материала с подкисленной водой.

Осаждение белковых молекул кислотами, спиртом и нагреванием.

Осаждение белков из вытяжек можно проводить с помощью

- трихлоруксусной,
- вольфрамовой,
- фосфорновольфрамовой,
- фосфорномолибденовой кислот.

Белковые вещества могут осаждаться после их денатурации путем нагревания или при добавлении этилового спирта.

Осаждение примесей указанными методами может привести к потере исследуемых соединений, так как не исключено соосаждение ядовитых веществ и их адсорбция на поверхности образующихся осадков белковых молекул. Кроме того, ядовитые вещества, в молекуле которых имеются эфирные группы, при нагревании могут быть разрушены.

Фильтрация и центрифугирование. Эти способы позволяют отделить вытяжки от механических загрязнений и от образовавшихся продуктов осаждения.

- **Фильтрация** - процесс более длительный, и материал фильтров частично адсорбирует ядовитые вещества.
- **Центрифугирование** является эффективным способом отделения примесей и осажденных белков от основного раствора. Современные центрифуги позволяют достигать до 15 тысяч оборотов в минуту и получать сравнительно чистую надосадочную жидкость.

Экстракция примесей из вытяжек на первом этапе применяется очень редко. Это связано с тем, что трудно подобрать условия, при которых возможно отделить большие количества примесей от исследуемых веществ, содержащихся часто в объекте в малых концентрациях.

Гель-хроматография используется для очистки водной вытяжки из биологических объектов от примесей балластных веществ. Этот метод основан на различной способности молекул проникать в поры неионогенного геля, который служит неподвижной фазой. Для гель-хроматографии в токсикологической химии используют гидрофильные полимерные сорбенты, в частности сефадексы.

Например, сефадекс G-25. Это декстран с поперечными сшивками, в воде хорошо набухает, образуя гель, стабильный в разбавленных кислотах и щелочах.

При работе гель помещают в колонку диаметром 2,5 см и высотой 43-45 см. Водную вытяжку из объекта пропускают через колонку. Крупные молекулы белков и пептидов не проникают или проникают только в часть пор. Когда колонку промывают элюентом, первыми вымываются наиболее крупные молекулы, последними - низкомолекулярные вещества.

Метод гель-хроматографии рекомендуется в химико-токсикологическом анализе при изолировании барбитуратов из трупного материала. Он позволяет получать достаточно чистые вытяжки.

Очистка экстрактов на втором этапе изолирования

При извлечении токсических веществ из водной фазы в органической фазе вместе с токсическими соединениями будут содержаться соэкстрактивные вещества (жиры, белки, продукты их распада, птомаины, красящие, дубильные и другие вещества). Эти примеси мешают анализу, загрязняют колонки хроматографов, могут привести к получению ложноположительных результатов (птомаины – продукты распада аминокислот в подвергшемся разложению объекте - дают при анализе характерное свечение в УФ-свете, осадки с общеалкалоидными реактивами и т.д.).

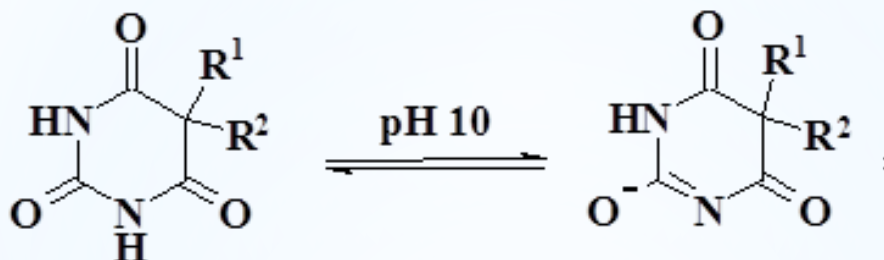
Для очистки экстрактов используют:

- Возгонку
- Реэкстракцию
- Электрофорез
- Хроматографию в тонком слое сорбента и др.

Возгонка (сублимация) применима для веществ, способных при нагревании возгоняться без разложения (барбитураты, салициловая и бензойная кислоты и некоторые алкалоиды). С этой целью после удаления органического растворителя остаток нагревают. Возгон, содержащий исследуемые вещества, осаждается на охлаждаемой с помощью мокрой ваты или марли поверхности (обычно на стекле). При этом соэкстрактивные соединения не возгоняются. Полученный возгон подвергают анализу.

Электрофорез - разделение веществ под действием внешнего электрического поля. Разделению подвергаются вещества, находящиеся в ионизированном состоянии. С этой целью часто используют лист фильтровальной или специальной бумаги для электрофореза, на который наносят 1/25 часть в виде точки и рядом 1/2 часть в виде полосы полученного из объекта экстракта. Бумагу смачивают буферным раствором с определенным значением pH, помещают в аппарат для горизонтального электрофореза, устанавливают необходимую величину напряжения. Условия подбирают таким образом, чтобы степень миграции (передвижения в электрическом поле) искомых соединений и соэкстрактивных веществ была разной или чтобы разделяемые вещества имели неодинаковый заряд и перемещались к противоположным полюсам. Полученную электрофореграмму высушивают и зону, по которой мигрировали вещества из 1/25 части экстракта, обрабатывают подходящим реагентом-проявителем. Непроявленную часть электрофореграммы, соответствующую обнаруженному с помощью реагента-проявителя пятну, вырезают, измельчают, элюируют исследуемое вещество соответствующим растворителем и анализируют.

Изменение pH среды. Этот метод применяют для очистки остатков, содержащих барбитураты и некоторые алкалоиды. Используется различная растворимость их молекулярных и ионизированных форм в воде и в органических растворителях. При очистке остатков, содержащих барбитураты, используется их способность к лактам-лактимной (имида-имидольной) таутомерии.



Экстракт, полученный из водной вытяжки при pH=2, содержит барбитураты в лактамной (имида) форме.

После испарения органического растворителя к остатку добавляют раствор щелочи до pH=10. Барбитураты переходят в соли монолактимной формы. Их особенностью является растворимость в воде и нерастворимость в органическом растворителе.

Примеси из полученного щелочного раствора экстрагируют диэтиловым эфиром. Очищенный щелочной раствор подкисляют до pH=2. При этом барбитураты вновь переходят в лактамную форму, способную экстрагироваться органическим растворителем.

Очистка экстрактов от птомаинов. При очистке остатков, содержащих алкалоиды и птомаины, использование **реэкстракции** основано на способности алкалоидов (оснований) образовывать соли в слабокислой среде, а птомаинов (оснований) - в сильнокислой среде. Экстракт, полученный из водной вытяжки при $pH=8-10$, содержит алкалоиды и птомаины в виде оснований. После испарения органического растворителя такой остаток окрашен в бурый цвет и маслянистый на вид. Остаток после испарения органического растворителя растворяют в воде и добавляют щавелевую кислоту до слабокислой реакции среды, алкалоиды переходят в соли, а птомаины остаются в виде оснований. После экстракции раствора хлороформом в органическую фазу переходят птомаины-основания, а алкалоиды-соли остаются в растворе, который затем подщелачивают раствором аммиака до $pH=8-10$ и экстрагируют очищенные алкалоиды-основания хлороформом. Методы реэкстракции часто сочетают с хроматографической очисткой.

Хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ). Очистка извлечений с помощью ТСХ рекомендуется на последнем этапе химико-токсикологического анализа, когда необходимо определить найденное ядовитое вещество количественно или подтвердить его обнаружение с помощью физико-химических методов.

С этой целью определенную часть экстракта наносят на пластинку в виде полосы (П) или в виде капель, а рядом наносят *стандарт* - раствор известного вещества - С (около 10-15 мкг).

Пластинку помещают в частную систему растворителей, в которой происходит четкое разделение ядовитого вещества, его метаболитов и эндогенных соединений. Когда растворитель поднимется по пластинке на высоту 10 см, ее вынимают, высушивают. С помощью стеклянной пластинки закрывают часть Б и обрабатывают реагентом-проявителем ту часть пластинки (А), по которой двигался *стандарт*. При этом фиксируют только <<пятно-стандарта>> С. Затем стеклянную пластинку снимают и зону сорбента (К), соответствующую <<пятну-стандарту>>, соскабливают и элюируют подходящим растворителем (растворами кислот, щелочей, аммиака, спирта и др.).

Полученный элюат используют для обнаружения или количественного определения найденного ядовитого вещества с помощью ГЖХ, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии, хроматомасс-спектрометрии и др.

Изолирование наркотических и одурманивающих веществ из мочи твердофазной экстракцией. Основан на сорбции токсических веществ на синтетических смолах, модифицированных силикагелях, активированном угле и др.

Метод Бурыкиной-Изотова. Метод разработан для выделения, очистки и концентрирования наркотических и одурманивающих веществ из мочи. Ядовитые вещества сорбируются на полисорбе, а затем элюируются соответствующим элюентом.

Схема метода

- Для изолирования веществ кислотного характера мочу (50 мл) подкисляют до $\text{pH}=2$ хлороводородной кислотой и смесь пропускают через колонку с сорбентом со скоростью 1,5-2 мл/мин.
- Для изолирования веществ основного характера к 50 мл мочи добавляют раствор аммиака до $\text{pH}=8-9$ и также пропускают через колонку с сорбентом.
- Вещества с кислотными и нейтральными свойствами, которые удерживаются гидрофобными группами сорбента, элюируют растворителями средней полярности (этилацетат или смесь ацетона и этилацетата).
- Вещества основного характера, удерживаемые катионообменными группами сорбента в протонированной форме, элюируются смесью хлороформа и изопропанола (9:1 или 4:1).

- Органические растворители (элюенты) удаляют при 40°C под током азота. Сухой остаток анализируют.

Чувствительность метода находится в пределах 0,06-0,4 мкг вещества в 1 мл мочи.

Оценка метода. Метод сорбции (твердофазной экстракции) позволяет упростить методику подготовки объекта к анализу, обрабатывать до 5 и более проб мочи одновременно, повысить чувствительность обнаружения токсических веществ, получить более чистые извлечения, практически исключить присутствие в элюатах веществ, определяющих запах мочи.

В 50 мл мочи методом сорбции можно определить: морфина 20 мкг, кодеина 2-5 мкг, аминазина, дипразина, промедола, пиперазина 4-5 мкг, наркотина 10 мкг, amitriptilina 8-10 мкг, diazepam 5-10 мкг.