

**ГРУППА ВЕЩЕСТВ,  
ИЗОЛИРУЕМЫХ ЭКСТРАКЦИЕЙ И СОРБЦИЕЙ  
(ЛЕКАРСТВЕННЫЕ И НАРКОТИЧЕСКИЕ  
ВЕЩЕСТВА)**

**СПОСОБЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ.  
МЕТОДЫ ИЗОЛИРОВАНИЯ ТОКСИКАНТОВ  
ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.**

**Лектор:  
доцент, к.ф.н.  
Передеряев Олег Игоревич**

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗУЧАЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

## □ Производные барбитуровой кислоты

(барбитал, фенобарбитал, циклобарбитал, барбамил)

## □ Опиаты

(морфин, кодеин, героин)

## □ Каннабиноиды

## □ Фенилалкиламины

(амфетамин, метамфетамин, эфедрин, норэфедрин, эфедрон)

## □ Кокаин

## □ Производные 1,4-бензодиазепина

(оксазепам, диазепам, нитразепам, феназепам)

## □ Производные фенотиазина

(аминазин, дипразин, левомепромазин, тиоридазин)

**ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К  
ПРОБОПОДГОТОВКЕ ОБЪЕКТОВ НА  
ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И  
НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

# ПРОБОПОДГОТОВКА

**ЭТО СОВОКУПНОСТЬ ДЕЙСТВИЙ НАД ОБЪЕКТОМ АНАЛИЗА (измельчение, гомогенизация, экстракция, гидролиз, осаждение и пр.) с целью превращения пробы в подходящую для последующего анализа форму (сухой остаток, раствор и пр.), состояние вещества (основание, солевая форма, гидролиз конъюгатов и пр.), а также избавления от мешающих анализу компонентов.**

# Основные задачи пробоподготовки

- Удалить возможные мешающие компоненты пробы, как для разделения, так и для детектирования (повышение селективности).
- Увеличить концентрацию определяемого вещества (повышение чувствительности).
- Превратить аналит в форму, пригодную для экстракции, разделения, для качественного и количественного анализа.

# Исследуемые объекты от живых лиц

- **Кровь**
  - цельная (с антикоагулянтом)
  - плазма (без форменных элементов)
  - сыворотка (плазма без фибриногена)
- **Моча**
- **Рвотные массы / промывные воды**
- **Слюна**
- **Волосы, ногти (ретроспектива)**

# Исследуемые объекты от у погибших

- **Органы**
  - **печень**
  - **почки**
  - **МОЗГ, САЛЬНИК**
  - **легкие**
  - **фрагмент ЖКТ с содержимым**
- **Кровь**
- **Моча**
- **Содержимое желудка**
- **Волосы, ногти (ретроспектива)**

# Стадии пробоподготовки

- Предварительная обработка
  - Измельчение и гомогенизация
  - Разведение
  - Депротенинизация (цельной крови, плазмы)
  - Ультразвуковая обработка
  - Фильтрация, центрифугирование
    - Гидролиз конъюгированных метаболитов
    - Экстракция
    - Очистка
    - Дериватизация

некоторые стадии могут  
отсутствовать

# Предварительная обработка

## Измельчение и гомогенизация (виды)

- **Механическая гомогенизация (блендер, мясорубка, лабораторные мельницы и пр.)**
- **Химический способ (волосы – щелочной гидролиз)**
  - быстро
  - недорого
  - разрушает нестабильные вещества
- **Ферментативный способ (трипсин и др. ферменты)**
  - медленнее
  - дороже
  - подходит для нестабильных веществ

# **Предварительная обработка**

## **Разведение**

- **Обязательно, когда концентрация аналита выше пределов линейности метода**
- **При исследовании органов для разведения используется вода или разбавленные кислоты**
- **При исследовании крови и мочи для разведения может быть использована отрицательная кровь и моча**

# Предварительная обработка

## Депротейнизация (преципитация)

- Добавление полярного растворителя (снижение растворимости): ацетонитрилом, ацетоном (обычно, 2-3 части растворителя на 1 часть биожидкости), центрифугировать для отделения надосадочной жидкости
- Обработка кислотой (денатурация) (муравьиной, трихлоруксусной, хлорной)
- Обработка неорганическими солями (высаливание) (сульфат аммония, сульфат цинка и др.)

### *Недостатки*

Потери анализа за счет абсорбции с денатурированными (осажденными) белками или химической дегградации (сильными кислотами или щелочами)

# **Предварительная обработка**

## **Обработка ультразвуком**

**Увеличение выхода путем разрушения клеток или конгломератов коагулированных клеток (цельная кровь)**

- Ультразвуковые ванны**
- Ультразвуковые генераторы**

# Предварительная обработка

## Фильтрация и центрифугирование

- Получение плазмы или сыворотки
- Удаление твердых частиц, которые могут засорить катридж ТФЭ, повлиять на иммуноанализ
- Осушение органических растворителей (фильтрация через безводный сульфат натрия)

Центрифугирование предпочтительнее, т.к. позволяет избежать потерь при фильтрации (на смачивание и промывание фильтра, сорбция на фильтре) и, как правило, дешевле.

# Гидролиз конъюгированных метаболитов

(Получение свободных метаболитов)

- Конъюгированные метаболиты не подходят для анализа методом ГХ (полярны и имеют большой молекулярный вес)
- Растворимы в воде, а не в органических растворителях (экстракция)
- Стандартные образцы конъюгатов трудно доступны из-за большого количества этих производных

# Виды гидролиза

- Химический (сильными кислотами и щелочами)
- Энзиматический (ферментативный) (глюкуронидаза из *Escherichia coli*)

## *Недостатки кислотного гидролиза*

- Разрушение метаболитов и производных наркотических веществ и как следствие потеря информации об их употреблении (например разрушение 6-МAM (героина, обнаружение общего морфина)
- Деградация бензодиазепинов до метаболитов

# Экстракция

- Жидкость жидкостная экстракция или экстракция растворителем (ЖЖЭ)
- Твердофазная экстракция (ТФЭ)

# Жидкость жидкостная экстракция

- Выделение аналита в системе двух несмешивающихся жидкостей
- Коэффициент распределения:  $[A_{\text{орг}}]/[A_{\text{водн.}}]$ .  
отношение концентраций аналита в двух несмешивающихся фазах при равновесии
- Оптимальный выход и селективность достигается различной растворимостью (полярность растворителя, высаливание) и контролем pH
- Увеличение выхода повторной экстракцией

# Жидкость жидкостная экстракция

## *Полярность растворителя.*

- Чем лучше подобрана полярность экстрагента, тем лучше обеспечивается растворимость аналита в органической фазе
- Наименее полярными являются гексан, гептан, диэтиловый эфир, циклогексан, толуол, хлороформ, хлористый метилен. Более полярными являются - амиловый, пропиловый и бутиловый спирты, ацетон, этилацетат, ацетонитрил
- Увеличение полярности растворителя достигается добавлением небольшого объема полярного растворителя (например, этилацетата, изопропанола) к низкополярному (например, гексану)
- Используют как одиночные растворители, так и многокомпонентные смеси

# Жидкость жидкостная экстракция

## *Высаливание*

- Добавление инертной нейтральной соли (сульфат натрия, хлорид натрия) позволяет уменьшить растворимость аналита в водной фазе (как следствие увеличения ионной силы)
- Снижает смешиваемость воды с органическим растворителем (более резкая граница между двух фаз)
- Снижает образование эмульсий
- Не оказывает эффекта на дериватизацию

# Жидкость жидкостная экстракция

$pK_a$  (константа диссоциации) -  $pH$  при котором аналит ионизирован на 50%(равновесие)

Кислоты:

$pH > pK_a$  усиливает ионизацию

$pH < pK_a$  подавляет ионизацию

Основания:

$pH < pK_a$  усиливает ионизацию

$pH > pK_a$  подавляет ионизацию

Уравнение Гендерсона-Гассельбаха

$$pH = pK_a + \lg (\text{соль/кислота})$$

$pH$  экстракции является функцией  $pK_a$  аналита:

- 2 единицы ниже  $pK_a$  для кислых веществ;
- 2 единицы выше  $pK_a$  для основных веществ.

# Очистка

- Очистка достигается ионизацией аналита и удалением нейтральных загрязняющих веществ Ж/ЖЭ.
- Очистка достигается обратной экстракцией (разделение основного вещества в разбавленную кислоту и реэкстракция после подщелачивания). В воде остаются белки. В органическом растворителе – липиды.

*Реэкстракция не рекомендуется для скрининга бензодиазепинов из-за разложения их в кислой среде.*

# Жидкость жидкостная экстракция

## Недостатки

- Трудоемкий и длительный процесс
- Плохой выход очень полярных аналитов (или большой выход ценой селективности: «грязные» экстракты)
- Дегградация аналита при критических величинах рН
- Работа с токсическими растворителями
- Трудно автоматизировать

# Жидкость жидкостная экстракция

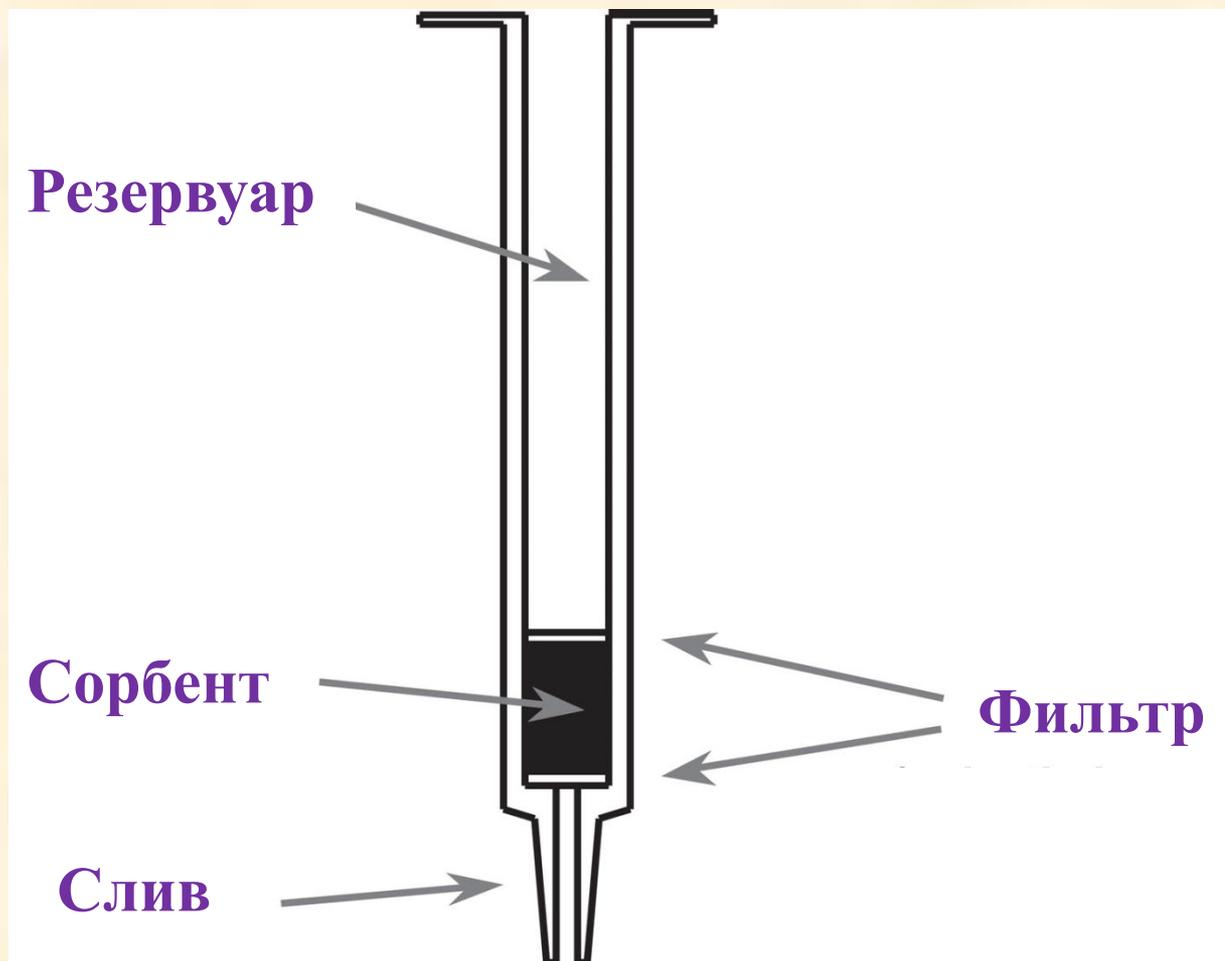
## Достоинства

- Метод более дешевый и стабильный по сравнению с ТФЭ
- С появлением инструментального анализа отпала необходимость в фракционных разделениях, больших объемах – достаточно однократной экстракции и экстрагента объемом 0,5-1,0 мл

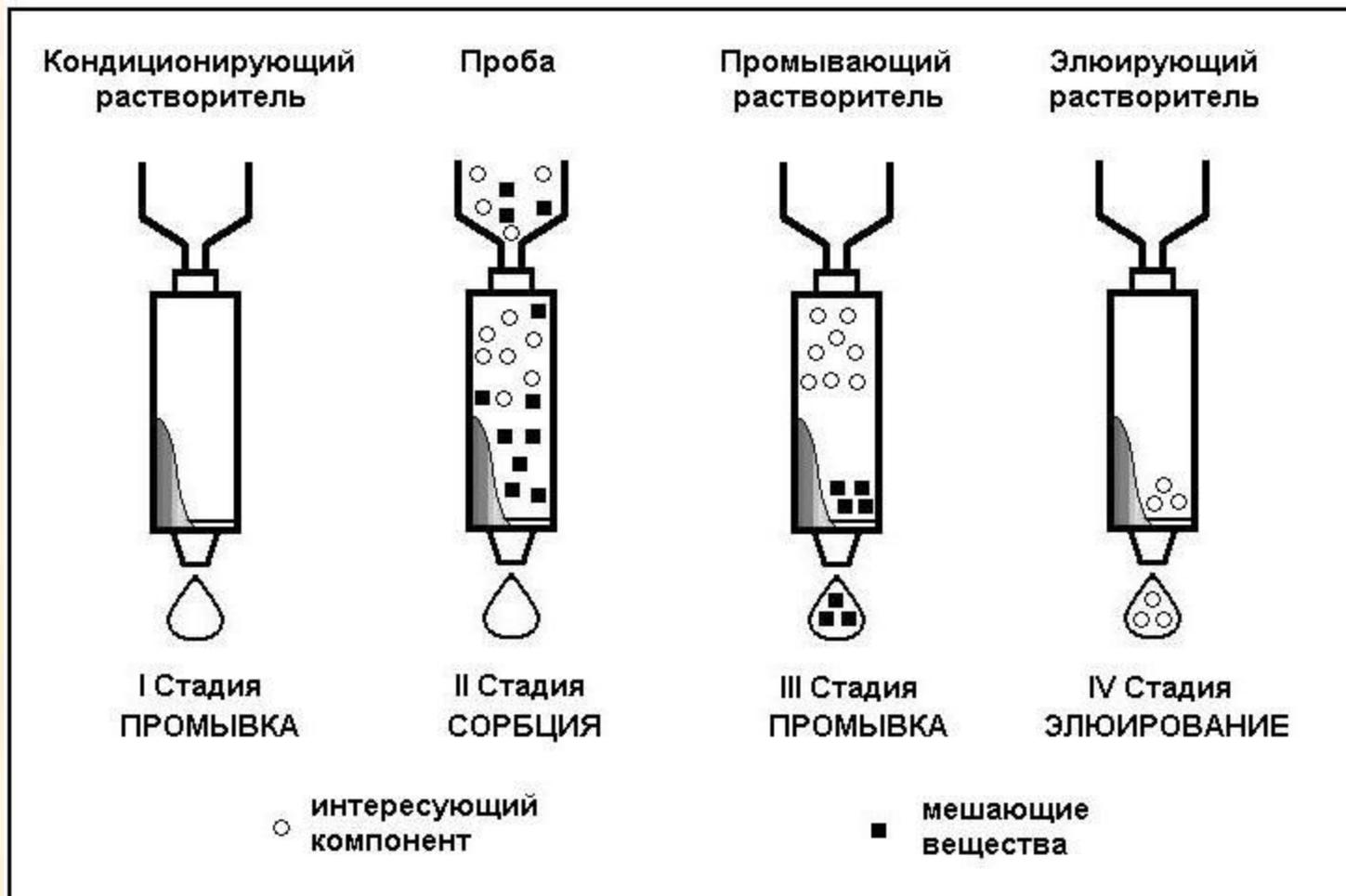
# Твердофазная экстракция ТФЭ

метод пробоподготовки, состоящий в концентрировании и отделении от матрицы целевого вещества для анализа (аналита) с использованием твердых сорбентов, с последующим вымыванием (экстракцией) подходящими растворителями.

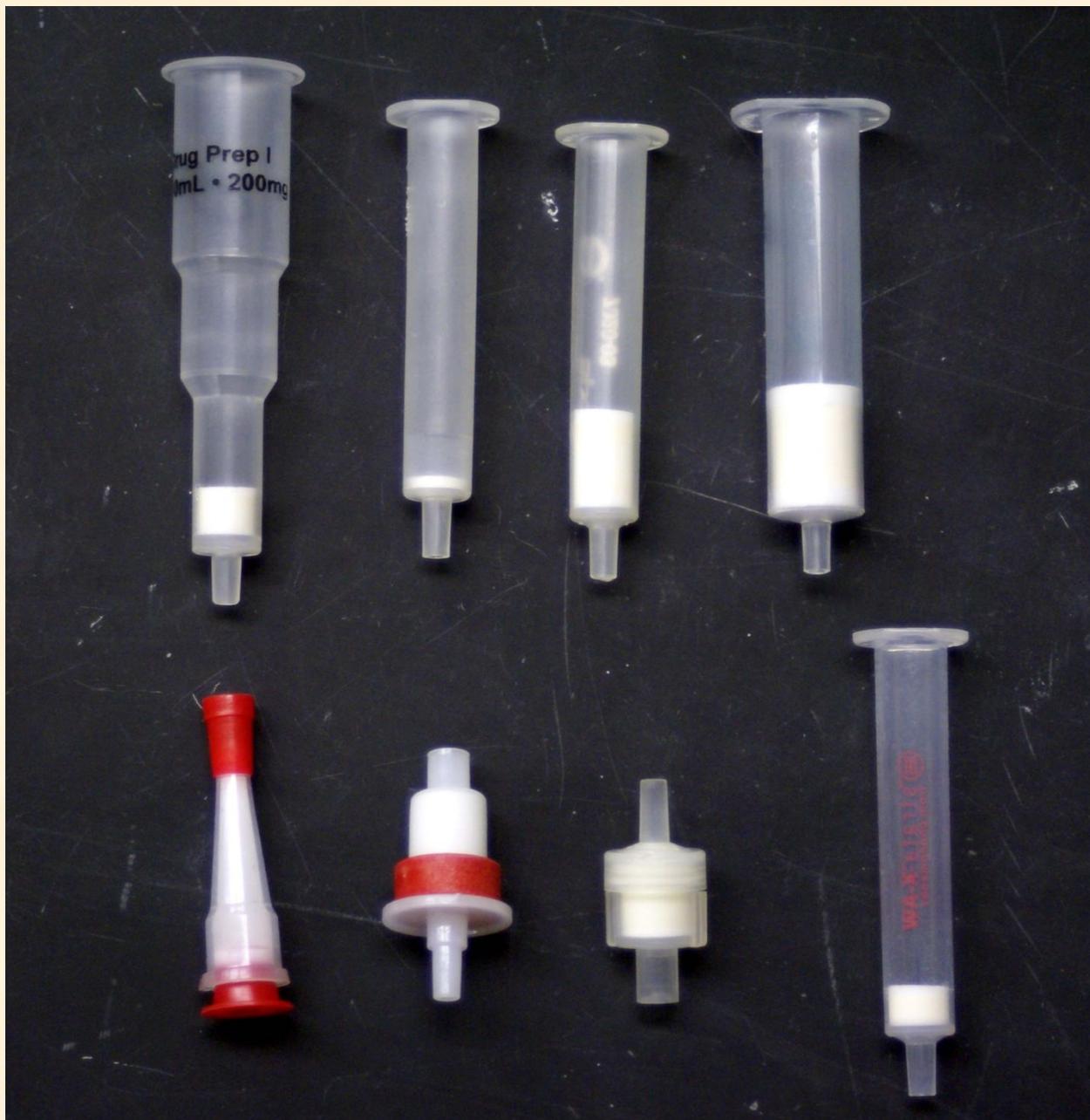
# Твердофазная экстракция ТФЭ



# Твердофазная экстракция ТФЭ



# Твердофазная экстракция ТФЭ



# Твердофазная экстракция ТФЭ

## Преимущества

- Больше выход экстракции, чем ЖЖЭ
- Подходит для очень полярных веществ (глюкурониды)
- Менее зависим от небольших изменений рН
- Более чистые экстракты
- Меньший расход растворителей
- Процесс автоматизирован

## Недостатки

- Более дорогой
- Возможна разница между партиями ТФЭ материала (выход)
- Ограниченная емкость загрузки пробы

# Дериватизация

**это получение производных анализируемого вещества, обладающих иными (лучшими с точки зрения используемого аналитического метода) аналитическими свойствами (например, иным УФ-спектром, флуоресценцией, термической стабильностью, летучестью и пр.)**

# **«СТАНДАРТНЫЕ» СПОСОБЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБЪЕКТОВ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

- Изолирование веществ кислотного и основного характера с помощью ацетона**
- Метод А.А. Васильевой (модифицированный)**
- Метод Стаса-Отто (модифицированный)**
- Метод В.Ф. Крамаренко**
- Метод Грусц-Харди**
- Метод П. Валова**

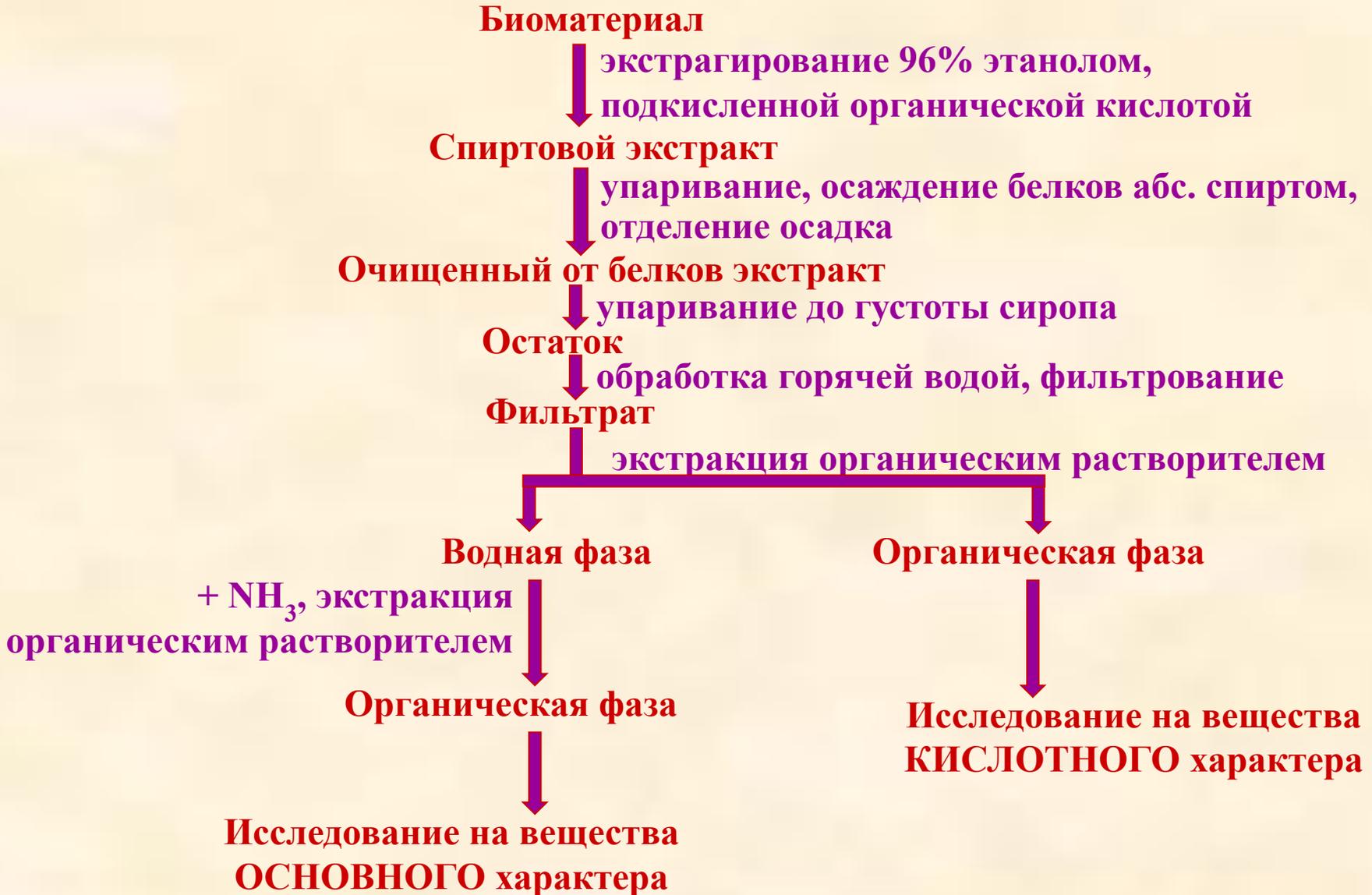
# ИЗОЛИРОВАНИЕ ВЕЩЕСТВ КИСЛОТНОГО И ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА С ПОМОЩЬЮ АЦЕТОНА



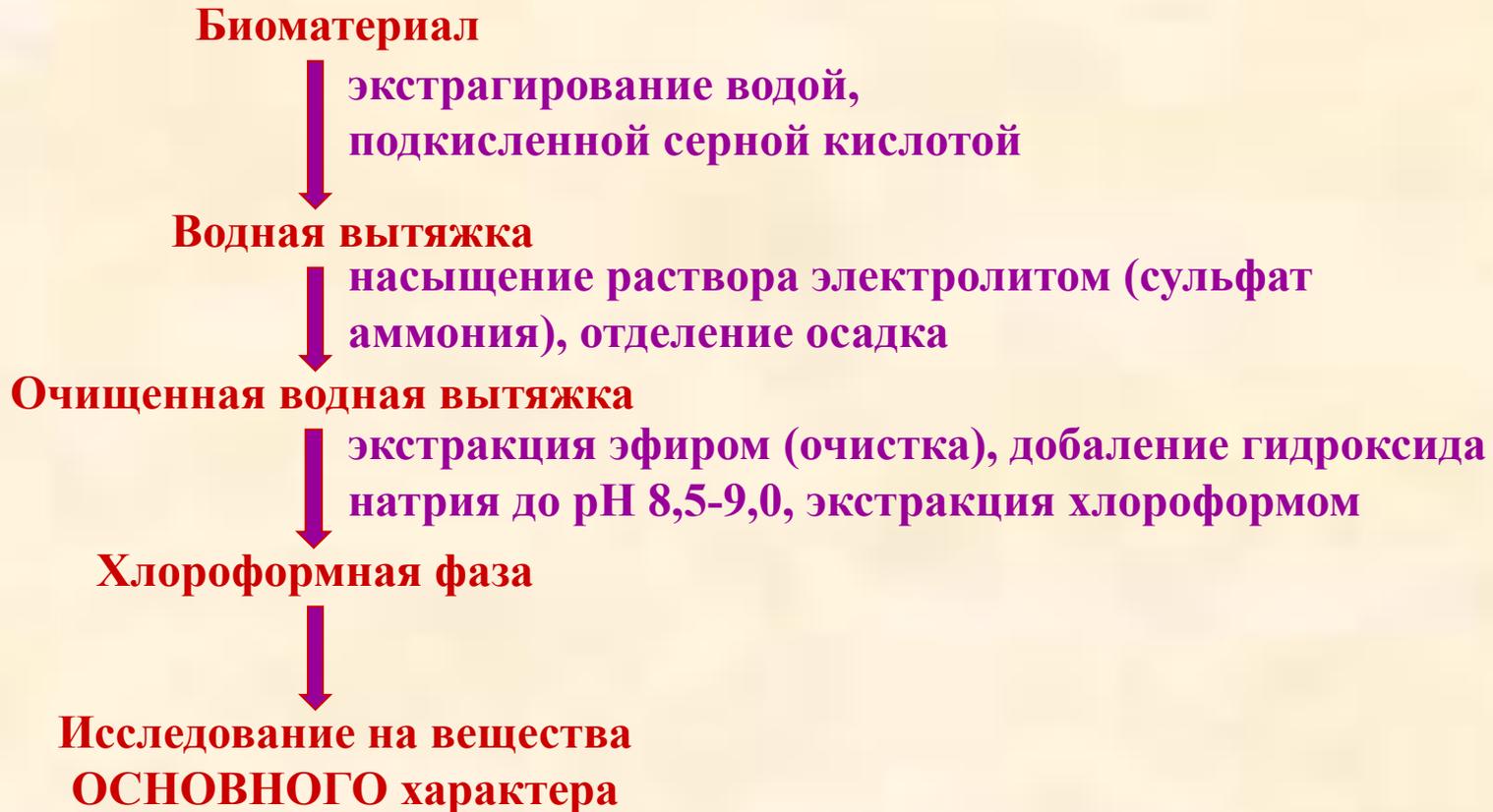
# МЕТОД А.А. ВАСИЛЬЕВОЙ (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ)



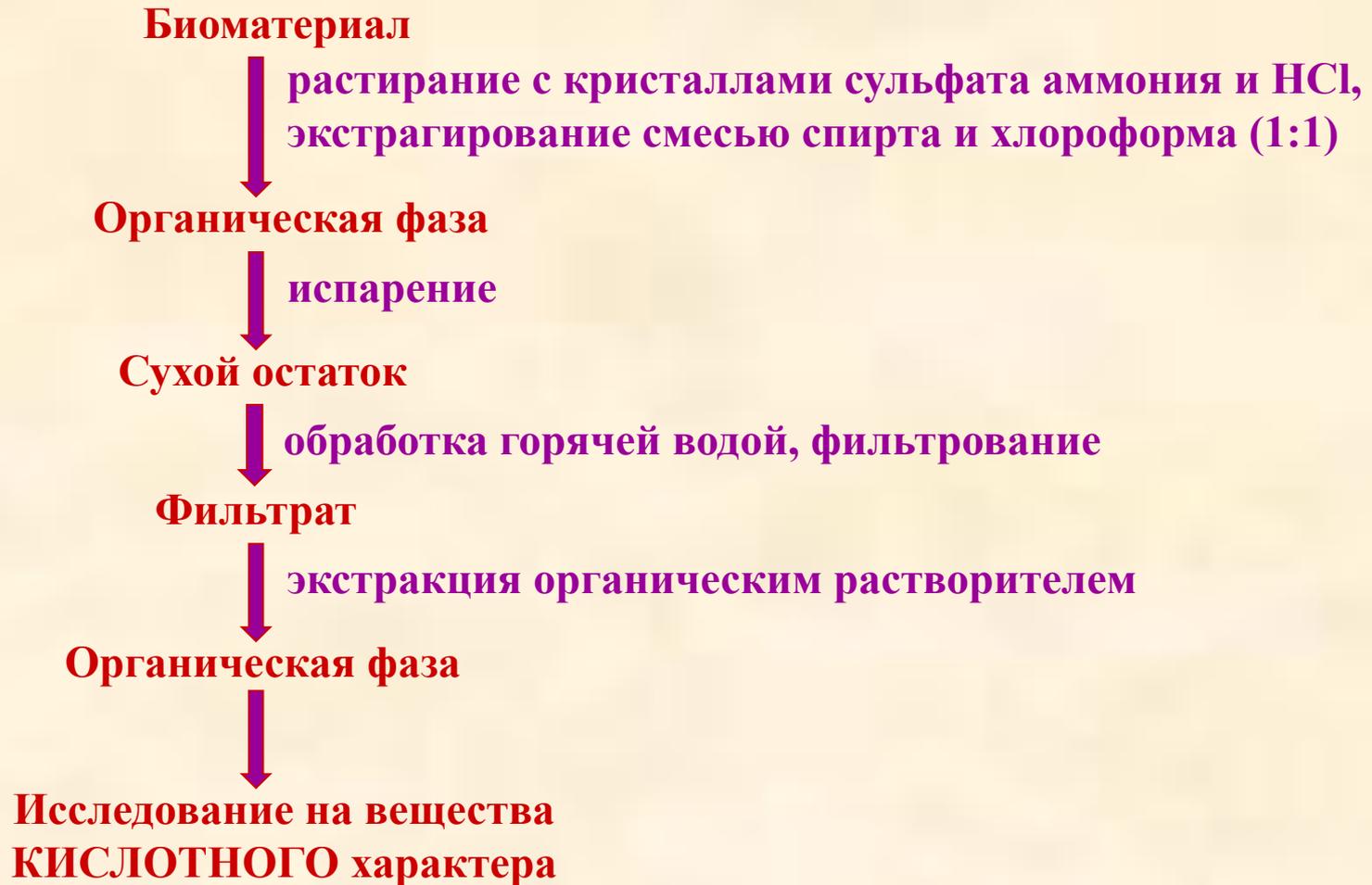
# МЕТОД СТАСА-ОТТО (МОДИФИЦИРОВАННЫЙ)



# МЕТОД В.Ф. КРАМАРЕНКО



# МЕТОД ГРУСС-ХАРДИ



# МЕТОД П.ВАЛОВА

