

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

**С. Н. БОРИСЕВИЧ**

# **ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие к курсу по выбору студента



Минск БГМУ 2012

УДК 615.099.07 (075.8)  
ББК 54.194 я73  
Б82

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия 29.02.2012 г., протокол № 5

Р е ц е н з е н т ы: д-р биол. наук, проф. Е. В. Барковский; д-р биол. наук, проф. А. Д. Таганович

**Борисевич, С. Н.**

Б82 Организация лабораторной диагностики острых отравлений : учеб.-метод. пособие к курсу по выбору студ. / С. Н. Борисевич. – Минск : БГМУ, 2012. – 92 с.  
ISBN 978-985-528-571-8.

Содержит методические материалы для подготовки к занятиям по химико-токсикологическому анализу.

Предназначено для студентов 6-го курса лечебного, педиатрического, военно-медицинского и медико-профилактического факультетов по выбору к курсу «Методы лабораторной диагностики острых отравлений».

УДК 615.099.07 (075.8)  
ББК 54.194 я73

---

Учебное издание

**Борисевич Светлана Николаевна**

**ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ**

Учебно-методическое пособие к курсу по выбору студента

Ответственная за выпуск О. Н. Ринейская

В авторской редакции

Компьютерный набор С. Н. Борисевич, К. Г. Бурдашкина, И. С. Тарасевич

Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 01.03.12. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Zoom».

Печать ризографическая. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 5,35. Уч.-изд. л. 4,9. Тираж 60 экз. Заказ 251.

Издатель и полиграфическое исполнение:

учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

ЛП № 02330/0150484 от 25.02.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.

**ISBN 978-985-528-571-8**

© Оформление. Белорусский государственный медицинский университет, 2012

# АНАЛИТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ И НАРКОМАНИЙ

## ВВЕДЕНИЕ

В наше время интенсивного развития химической и фармацевтической промышленности все новые химические вещества внедряются в жизнедеятельность человека. Они призваны облегчить жизнь и быт, способствовать урожайности сельскохозяйственных культур, оказывать влияние на сохранение здоровья и устранение страданий человека от различных болезней. При определенных же условиях многие из химических веществ оказывают неблагоприятное влияние на организм, вызывают отравления различной тяжести, становятся опасными для жизни.

Потенциальные возможности отравлений заложены в широком использовании химических средств в медицине, промышленности и быту, в доступности различных химических веществ широким слоям населения, не всегда достаточно знакомым с токсическими свойствами средств, применяемых в качестве лекарств, пестицидов, препаратов бытовой химии, в попытках самолечения и т. п.

Наука о механизмах действия ядов на организм, методах диагностики, лечения и профилактики отравлений, а также принципов неотложной медицинской помощи при острых отравлениях — **токсикология** (от греч. *toxikon* — яд, *logos* — учение) — изучает токсичность веществ и определяет их уровни, безопасные для человека. Для врача любой специальности обязательным является знание основ токсикологии.

Токсическое действие ксенобиотиков рассматривается как патология, связанная с нарушением функции гомеостатических систем разных уровней. Влияя на молекулярные механизмы функционирования биохимических систем (рецепторы, ферменты, биологические мембраны), токсические вещества нарушают процессы гомеостаза.

Клиническая токсикологическая служба развивается в Республике Беларусь с 1980 года, когда в Больнице скорой медицинской помощи (БСМП) г. Минска было открыто первое в республике токсикологическое отделение (сейчас преобразовано в Республиканский токсикологический центр по лечению острых отравлений химической этиологии). В 90-е гг. были организованы областные токсикологические центры, в 2005 году постановлением Минздрава № 38 выделена отдельная медицинская специальность «Врач-токсиколог», а для специалистов клинических и химико-токсикологических лабораторий (ХТЛ) утверждено новое наименование должности «Врач лабораторной диагностики», которую может занимать специалист с высшим медицинским образованием.

В 2009 году для обсуждения актуальных проблем служб токсикологии Беларуси и России Министерством здравоохранения Республики Беларусь была проведена научно-практическая конференция «Лекарственная безопасность и актуальные вопросы клинической токсикологии», на которой главный внештатный токсиколог Минздрава И. М. Григорьев изложил историю развития и структуру токсикологической службы нашей страны, привел статистику отравлений: структуру острых отравлений по нозологиям по стране (отравления этанолом и суррогатами составляют 44,8 %, лекарственными средствами — 25 %, наркотиками — 2,9 %), структуру острых отравлений химической этиологии в отделении по лечению острых отравлений (рис. 1), структуру смертности от острых экзогенных отравлений; структуру и динамику основных нозологических форм отравлений по областям республики; возрастную структуру и структуру пациентов по полу; долю суицидентов в структуре пациентов токсикологического профиля, а также эфферентные методы детоксикации в комплексном лечении острых отравлений в целом по стране и по областям.

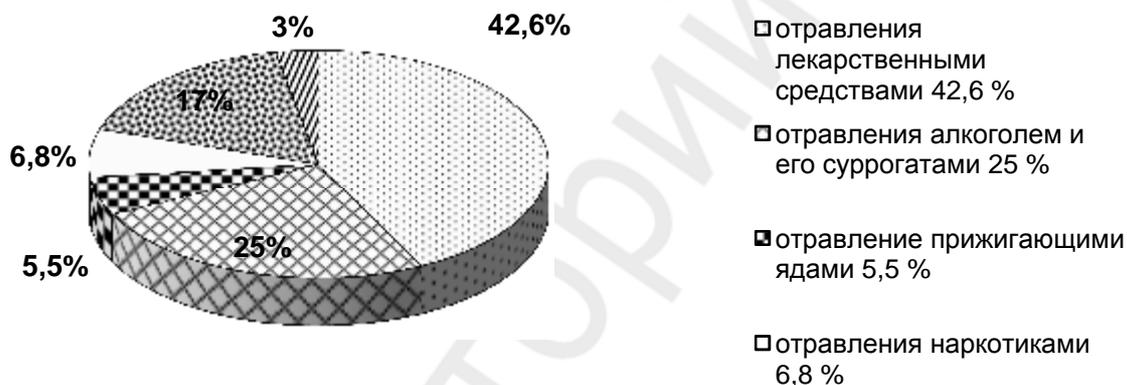


Рис. 1. Структура острых отравлений химической этиологии в отделении по лечению острых отравлений (2008 г., БСМП)

В целях совершенствования оказания токсикологической помощи населению планируется принятие постановления МЗ Республики Беларусь «Об утверждении Инструкции о порядке оказания токсикологической помощи населению в организациях здравоохранения и мерах по обеспечению химической безопасности населения Республики Беларусь».

При анализе современных проблем токсикологической службы И. М. Григорьев указал на недостаточное оснащение оборудованием в регионах, отсутствие консультативно-информационного центра, а также на недостаточную подготовленность медицинского персонала, в том числе выпускников университетов, по вопросам токсикологии.

Проблема подготовки врачей по вопросам токсикологии решается определенным образом и на кафедрах Белорусского государственного медицинского университета. Так, на кафедре биорганической химии организован 40-часовой элективный курс (курс по выбору студента) «Методы ла-

бораторной диагностики острых отравлений», предназначенный для студентов 6 курса лечебного, педиатрического, военно-медицинского и медико-профилактического факультетов. Электив предполагает углубление знаний будущих специалистов по наиболее актуальным методам химикотоксико-логического анализа: химическим, физико-химическим и биологическим.

По данным ВОЗ больные с острым отравлением составляют 15–20 % всех лиц, экстренно поступающих на стационарное лечение. Исход отравления зависит от того, насколько быстро будет поставлен диагноз, эффективно и целенаправленно оказана медицинская помощь пострадавшему. Медицинская и химическая составляющие токсикологии тесно связаны между собой. Только с помощью химических методов можно произвести определение токсикантов и поставить окончательный диагноз отравления.

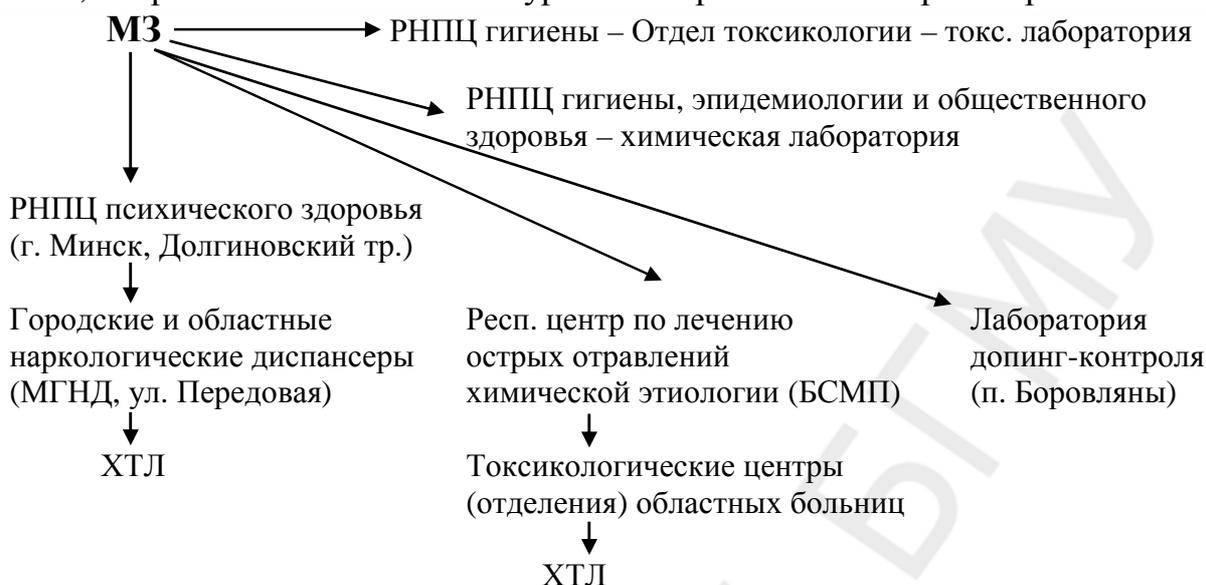
Химические аспекты токсикологии (токсикодинамика, токсикокинетика, определение ксенобиотиков) является предметом токсикологической химии. **Токсикологическая химия** — наука о химических, физических, физико-химических и биологических методах изолирования, обнаружения и количественного определения ядовитых и сильнодействующих веществ, продуктов их превращений в тканях и жидкостях организма, а также в окружающей человека среде и предметах (вода, почва, воздух, пищевые продукты, лекарства и т. п.). Современная токсикологическая химия представлена разными направлениями: судебно-химическим, клиническим, наркологическим и экологическим (рис. 2).

В 1959 году в Витебском медицинском институте был организован фармацевтический факультет. С 1962 года при кафедре фармацевтической химии для студентов 4-го курса читается курс «Судебная химия». В 1965 году организована кафедра аналитической и токсикологической химии. В 1995 году кафедра отнесена к кафедрам фармацевтического профиля и переименована (кафедра токсикологической и аналитической химии), ее бессменным руководителем является доктор фармацевтических наук, профессор А. И. Жебентяев.

Решение задач клинической токсикологической химии (изолирование, обнаружение и определение ядов в живом организме) направлено, в первую очередь, на диагностику отравлений и оказание эффективной помощи пострадавшему, на мониторинг лечения отравлений, а также на их предупреждение.

Лекарственная токсикология — раздел токсикологии и токсикологической химии, оценивает патологические проявления, вызываемые лекарственными веществами, а также композициями лекарственных и вспомогательных веществ. Отравления лекарствами также являются предметом лекарственной токсикологии.

Токсикологической службой МЗ нашей страны проводится большая работа, направленная на снижение уровня смертности от острых отравлений.



### **Прокуратура**

↓  
Гос. служба медицинских судебных экспертиз  
↓  
Центральная судебно-химическая лаборатория (г. Витебск)  
↓  
СХЛ областных и крупных районных центров

### **МВД**

Экспертно-криминалистический центр (г. Минск, ул. Володарского)

### **Минюст**

Институт криминалистики, криминологии и судебных экспертиз (г. Минск, ул. Кальварийская)

### **Таможенный комитет**

↓  
Минская центральная таможня  
↓  
Центральная таможенная лаборатория (г. Минск, ул. Могилевская)

### **Министерство сельского хозяйства и продовольствия**

Лаборатории по исследованию качества сырья и продовольствия

### **Министерство коммунального хозяйства**

Лаборатории по исследованию природных сред

### **Академия наук**

Институт проблем использования природных ресурсов и экологии

## ОТРАВЛЕНИЯ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

**Отравлением**, или интоксикацией, называется комплекс патологических изменений, возникающих в организме под влиянием лекарственных или других веществ, называемых ядами.

Имеется несколько классификаций отравлений. Одни основаны на учете особенностей клинического течения (острые и хронические), путей поступления ядов в организм (пероральные, ингаляционные, чрескожные, инъекционные и др.), другие — на учете причин возникновения (случайные и умышленные), условий возникновения (бытовые, производственные).

**Острые отравления** наступают в результате действия на организм завышенных доз ядовитых веществ. Они сопровождаются быстро нарастающей симптоматикой и могут заканчиваться смертельным исходом в течение нескольких минут, часов или суток. Чаще острые отравления являются случайными, но могут быть и умышленные острые отравления с целью убийства или развития у пострадавшего беспомощного состояния (для завладения имуществом, с целью изнасилования) — это криминальные отравления. Ядовитые вещества могут приниматься и для самоубийства — суицидальные отравления.

Известны случаи острых отравлений лиц, принимавших сильнодействующие фармацевтические препараты с целью самолечения. Относительно редко, но встречаются случаи острых отравлений из-за ошибок медперсонала или работников аптек (введение завышенных доз лекарств или неправильный способ введения; случайная замена одних препаратов другими, более токсичными).

**Хронические отравления** возможны при повторном применении в течение длительного времени малых доз кумулирующих в организме ядовитых и сильнодействующих веществ, не вызывающих острых отравлений, но достаточных для поражения той или иной функции организма (например, препараты сердечных гликозидов). Хронические отравления характеризуются медленным течением и неясно выраженной симптоматикой.

**Профессиональные отравления** происходят на предприятиях или в химических лабораториях, которые вырабатывают или используют ядовитые вещества. Обычно при нарушениях правил техники безопасности при работе с такими веществами развиваются хронические отравления. Однако при авариях котлов, аппаратов, емкостей для хранения и транспортировки ядов у персонала могут развиваться и острые отравления.

**Бытовые отравления**, как правило, носят случайный характер. Они возникают в результате небрежного хранения или употребления вместо

лекарственных препаратов токсических веществ домашнего и хозяйственного обихода (средства для уничтожения грызунов, вредных насекомых; жидкости для мытья окон или чистки одежды и т. п.). Причинами бытовых отравлений являются недостаточная осведомленность населения о токсичности применяемых веществ или ошибочное применение ядовитых жидкостей вместо алкогольных напитков. Нередки случаи бытовых отравлений детей лекарственными и токсическими веществами домашнего обихода из-за небрежного их хранения в доступных для детей местах.

К числу бытовых отравлений относятся алкоголизм, наркомания и токсикомания. Алкоголизм — систематическое употребление спиртных напитков в количествах, вызывающих алкогольное опьянение. В результате длительного неумеренного употребления алкоголя возникает ряд патологических изменений в организме (хронический алкоголизм). О широком распространении алкоголизма свидетельствует статистика отравлений в нашей стране за 2008 год: основное место среди причин смертельных отравлений занимает этиловый спирт и его суррогаты (68 %), 2-е место — оксид углерода (II) — 28 %, затем — лекарственные и наркотические средства (1,6 %), уксусная кислота и другие едкие яды (0,6 %) и прочие отравления (1,8 %) (рис. 3).

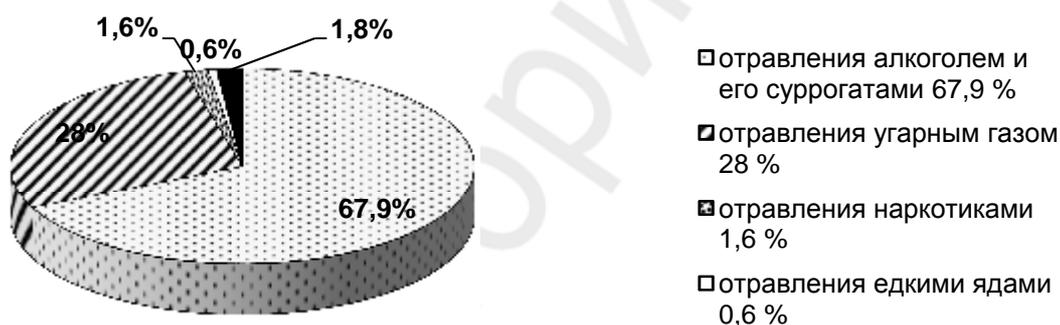


Рис. 3. Структура смертности от острых экзогенных отравлений (2008 г., БСМП)

Важной социальной проблемой является наркомания, возникающая в результате систематического употребления наркотических веществ. При наркомании проявляется трудно преодолимое влечение к постоянному приему все возрастающих количеств наркотических средств.

Отрицательные медицинские последствия, связанные со злоупотреблением наркотиками, проявляются в глубоких расстройствах психики наркоманов, подавлении умственной деятельности, нарушении функций и одряхлении организма.

Отрицательные социальные последствия наркомании проявляются в снижении трудоспособности наркоманов, распаде семьи, совершении уголовных преступлений и т. д.

Вещества, злоупотребление которыми имеет отрицательные медицинские и социальные последствия, относятся к наркотическим тогда,

когда они соответствующими государственными органами юридически признаны таковыми и включены в «Республиканский перечень наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь» (утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь 28 мая 2003 г. № 26 наряду с постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь «О критериях отнесения комбинированных лекарственных средств, содержащих наркотические средства и психотропные вещества, к наркотическим средствам и психотропным веществам, подлежащим государственному контролю в Республике Беларусь» от 31 июля 2009 г. № 89). Токсикомания возникает в результате злоупотребления некоторыми веществами (органические растворители, технические жидкости, средства бытовой химии, части растений) или лекарственными средствами, которые не входят в вышеназванный перечень, но систематическое применение которых имеет отрицательное медицинское и социальное значение.

## **ОРГАНИЗАЦИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

При острых отравлениях пациент нуждается в оказании неотложной медицинской помощи на догоспитальном этапе и далее в отделениях токсикологического или реанимационного профиля. Пациенты с острыми экзогенными отравлениями средней и тяжелой степени госпитализируются в больничные организации здравоохранения в обязательном порядке. Функции контроля за организацией оказания медицинской помощи пациентам с острыми экзогенными отравлениями химической этиологии осуществляет Республиканский токсикологический центр (Центр) на базе Городской клинической больницы скорой медицинской помощи г. Минска.

В структуре Центра (отделения) острых экзогенных отравлений химической этиологии функционирует химико-токсикологическая лаборатория, главная задача которой заключается в оказании помощи врачам-токсикологам и реаниматологам в диагностике острых отравлений, а также обеспечение токсикологического контроля в процессе лечения. В лаборатории могут работать врачи, имеющие **специальность «Клиническая лабораторная диагностика»**.

Работа лаборатории осуществляется **круглосуточно**. Ее местонахождение должно обеспечивать **доставку объектов исследования в течение нескольких минут** после взятия пробы. Для обнаружения токсических соединений должны применяться методы, обеспечивающие получение достоверных **результатов в течение не более 2 часов**. Таким требованиям удовлетворяют **экспрессные, высокочувствительные и специфичные, требующие малых количеств биоматериала методы тонкослойной и**

**инструментальной хроматографии, иммуноферментного анализа, спектрофотометрии, а также некоторые хромогенные и микрокристаллоскопические реакции.**

**Объектами химико-токсикологического анализа (ХТА)** являются биожидкости (кровь, моча, слюна, ликвор), смывы с рук и губ, промывные воды желудка, диализаты после перитониального диализа, а также связанные с отравлением вещественные доказательства: лекарственные препараты, остатки пищи, растительные объекты, средства бытовой химии, пестициды и т. д.

Лаборатория осуществляет следующие **функции**:

1) проведение исследования биологических и других объектов на наличие токсических веществ с целью химико-токсикологической экспресс-диагностики острого химического отравления по направлениям Центра, других отделений организации здравоохранения, других организаций здравоохранения; за исключением биологических проб, отобранных и упакованных с нарушением инструкции; веществ, которые не могут быть исследованы в лаборатории на имеющемся оборудовании; трупного материала;

2) выполнение обязательного минимума исследований, включающих следующие группы и отдельные препараты: этанол и алифатические спирты (метанол, пропанол, бутанол, пентанол); хлорированные углеводороды (хлороформ, четыреххлористый углерод, трихлорэтилен, перхлорэтилен, дихлорэтан); ароматические углеводороды (бензол, толуол), диэтиловый эфир, ацетон, этилацетат; этиленгликоль; алкалоиды опийной группы (морфин, кодеин); амфетамины (амфетамин, метамфетамин); метадон; каннабиноиды; трамадол; неопиоидные анальгезирующие и жаропонижающие средства; бета-адреноблокаторы; блокаторы кальциевых каналов; сердечные гликозиды; ингибиторы АПФ; производные барбитуровой кислоты (групповая идентификация); производные 1,4-бенздиазепина (групповая идентификация); производные фенотиазина (групповая идентификация); трициклические антидепрессанты (амитриптилин); лепонекс (азалептин); карбамазепин (финлепсин); димедрол; хлорпротиксен;

3) проведение расширенного общего исследования веществ в установленном порядке;

4) проведение регистрации каждой принятой пробы, процесса и результата ХТА в соответствующих журналах, отражающих прохождение объектов исследования, объективные данные каждого этапа исследования;

5) доведение результатов до сведения дежурного токсиколога немедленно по окончании исследования с последующим письменным актом результатов ХТА; оценку результатов ХТА производит врач-токсиколог совместно с врачом лабораторной диагностики;

б) оказание консультативной помощи отделениям и лабораториям организаций здравоохранения.

Срочность выполнения исследований в ХТЛ диктуется тем, что результаты химических исследований необходимы лечащему врачу для уточнения диагноза и срочного принятия необходимых мер с целью обезвреживания яда в организме и лечения больного.

Процесс обезвреживания яда и ускорения его выведения из организма называется детоксикацией. Освобождение организма от яда производится путем:

– естественной детоксикации, т. е. усиления определенных физиологических процессов (промывание желудка, вызывание рвоты, очищение кишечника, проведение форсированного диуреза, проведение гипервентиляции легких);

– искусственной детоксикации (проведение гемодиализа, перитонеального диализа, гемосорбции, обменного переливания крови и др.);

– проведения антидотной терапии.

Аналитическая служба, осуществляющая ХТА наркотических и психоактивных средств, является, кроме того, одним из инструментов государства в борьбе с наркоманией и токсикоманией, поскольку хорошо налаженная и оснащенная аналитическая служба позволяет контролировать такие уголовно наказуемые деяния как изготовление, транспортировка и распространение наркотических и психотропных средств, оборудования и полупродуктов для их производства (в соответствии с Законом Республики Беларусь «О наркотических средствах, психотропных веществах и их прекурсорах», принятым 8 мая 2002 г.), а также способствует эффективной диагностике и лечению больных наркоманией.

Надежность работы химико-токсикологической лаборатории определяется соответствием ее целому ряду **требований**:

1) лаборатория должна пройти внешнее профессиональное тестирование и быть аттестованной;

2) врач лабораторной диагностики должен пройти специализацию и регулярно повышать квалификацию на профильных кафедрах (кафедра клинической лабораторной диагностики БелМАПО и др.);

3) каждый аналитический прибор должен иметь паспорт и инструкцию по эксплуатации;

4) все используемые реагенты должны быть паспортизированы и иметь отметку о дате изготовления;

5) используемые эталонные вещества сравнения (стандарты) должны быть паспортизированы;

6) используемые методики должны быть подробно описаны и иметь метрологическую характеристику (воспроизводимость, чувствительность

и др.); должны быть известны пределы обнаружения анализируемых веществ по каждому используемому аналитическому методу;

7) правила отбора и хранения образцов должны быть строго регламентированы; должна быть известна степень стабильности анализируемых веществ в условиях хранения;

8) каждый положительный результат должен быть подтвержден другим аналитическим методом; исключение может быть сделано лишь в случае направленного анализа.

Особенностью анализа токсических, в том числе наркотических веществ является то, что он должен быть системным, т. е. сопровождаться контролем каждой **стадии анализа**:

- отбора и хранения проб;
- подготовки пробы к анализу;
- предварительных и подтверждающих методов анализа;
- обработки результатов.

## ВОПРОСЫ

1. Почему для врача любой специальности обязательным является знание основ токсикологии, а для токсиколога, реаниматолога, нарколога, судмедэксперта и врача лабораторной диагностики — знание основ химико-токсикологического анализа?

2. К какому типу отравлений относятся острые отравления алкоголем, наркотическими и токсикоманическими веществами? Какие вещества относятся к наркотическим?

3. Каковы задачи и особенности функционирования ХТЛ Центров по лечению острых отравлений?

## ЭТАПЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

### ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

Отбор образцов биологических объектов (кровь, моча, промывные воды и др.) для ХТА производится медицинской сестрой (см. прил.). Перед отбором у пациента **крови** для обнаружения и количественного определения этилового спирта и токсических веществ чистый сухой стеклянный флакон обрабатывают антикоагулянтом: вносят 3–5 капель гепарина или 0,8 мл 3%-ного водного раствора цитрата натрия и встряхиванием флакона смачивают его стенки. Кровь в количестве не менее 10 мл для определения этанола и не менее 20 мл для обнаружения наркотических и других токсических веществ отбирается пункцией кубитальной или другой доступной вены шприцом при соблюдении асептических условий и медленно помещается в подготовленный флакон. Флакон закрывается пробкой, и содержимое тщательно встряхивается с целью предотвращения

образования сгустков. Затем флакон опечатывается согласно требованиям (см. ниже). Кожа в месте пункции обрабатывается растворами этакридина лактата 1 : 500, фурацилина 1 : 5000, Рокала 1 : 100 или Аятина 1 : 100. Дезинфекция кожи спиртом, эфиром, настойкой йода или другими жидкостями, содержащими этиловый спирт, не допускается.

Установлено, что неионизированные формы токсического вещества, находящиеся в плазме крови, пассивно диффундируют в *слюну*, так что существует прямая зависимость между концентрацией анализируемого вещества в крови и его концентрацией в слюне. В соответствии с действующими нормативами слюна является одним из объектов исследования при определении этилового спирта и его суррогатов.

**Моча (слюна)** для исследований с целью определения этилового спирта и его суррогатов в количестве на менее 10 мл (слюна — не менее 5 мл) отбирается в чистый сухой флакон, который тотчас плотно закупоривается, флакон опечатывается. Для определения наличия наркотических и иных веществ у физического лица отбирается моча в количестве не менее 100 мл, которая разделяется на 2 порции. Первая из этих порций в количестве до 5 мл используется для установления наличия наркотических средств при помощи экспресс-тестов, оставшаяся часть — для лабораторных исследований. Моча помещается в чистый сухой стеклянный флакон без консервантов, который плотно укупоривается и опечатывается. Отбор мочи производится в условиях, исключающих возможность ее подмены или разведения водой.

При курении гашиша его действующее начало — тетрагидроканнабинол — частично конденсируется на поверхности кожи рук и лица курильщика. Отбор пробы осуществляется путем обтирания ватными или марлевыми отдельными тампонами, смоченными этиловым спиртом, поверхности рук и лица вокруг губ курильщика. Спирт из тампонов испаряется при комнатной температуре. Тампоны упаковываются в отдельные полиэтиленовые пакеты и опечатываются.

В соответствии с **правилами опечатывания биологических объектов** на пробку флакона накладывается листок белой бумаги размером 6 × 6 см, а затем таких же размеров листок полиэтиленовой пленки, поверх которых вокруг горловины флакона туго на узел завязывается нить. Концы нити спускаются вдоль флакона на 1 см ниже его дна. Нить фиксируется листком белой бумаги с оттиском личной печати врача, назначившего проведение химико-токсикологического исследования, и штампом государственной организации здравоохранения. Аналогичным образом опечатываются пакеты с тампонами. На боковую поверхность флакона или пакета медицинской сестрой, проводившей отбор биоматериала, наклеивается **этикетка**, в которой указываются: название биосреды (кровь, моча, промывные воды); фамилия и инициалы пациента; порядко-

вый номер биосреды, зарегистрированной в Журнале регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов (журнал должен быть пронумерован, прошнурован, скреплен печатью и подписью руководителя организации здравоохранения); дата забора биологического образца; подпись врача, назначившего проведение химикотоксикологического исследования.

**Доставка образцов** биологических объектов в ХТЛ должна осуществляться медицинским работником непосредственно после отбора с соблюдением условий, исключающих возможность механических повреждений флаконов с образцами или их подмены. В исключительных случаях допускается хранение опечатанных образцов биологических объектов в холодильнике при температуре не выше +4 °С не более 5 суток.

В лабораторию биосреды передаются в опечатанном контейнере с **письменным направлением**, в котором указываются: название организации здравоохранения, направившей биосреду; Ф.И.О. и год рождения пациента; порядковый номер биосреды (в соответствии с Журналом регистрации результатов анализов); вид биосреды (кровь, моча, промывные воды и т. д.); количество биосреды в мл; дата и время отбора; цель исследования; фамилия и инициалы врача, назначившего проведение химикотоксикологического исследования, его подпись и личная печать; фамилия и инициалы медицинской сестры, проводившей отбор образца. В направлении врач по возможности конкретизирует название вещества или указывает группу веществ, обнаружение которых необходимо произвести.

Доставленные в токсикологическую лабораторию образцы принимаются дежурным врачом. Проверяется сохранность образца биологического объекта, соответствие записей на этикетке флакона и в направлении.

**Исследование образцов** проводится сразу после их передачи в лабораторию (в общем случае — не позднее 3 календарных суток с момента доставки). Для исследования используется необходимое минимальное количество образца.

Оставшаяся после исследования часть биологического объекта **хранится** в лаборатории в течение 35 суток после окончания анализа при температуре не выше +4 °С (в холодильнике) с соблюдением условий, исключающих возможность подмены образцов.

Во время хранения мочи ее рН увеличивается из-за действия бактериальной флоры, выделяющей аммиак, что нежелательно. Для предотвращения таких процессов при исследовании очень быстро разлагающихся веществ мочу хранят с добавлением антисептиков (борная кислота, фторид натрия) или ее лиофилизируют, предварительно переведя летучие соединения в соответствующие соли.

## ПОДГОТОВКА ПРОБЫ К АНАЛИЗУ

Специфической **особенностью** ХТА является необходимость проведения исследования в подавляющем большинстве случаев не химически индивидуальных веществ, а смесей с посторонними веществами, сопровождающими их в биообъекте и оказывающими то или иное влияние на результаты обнаружения и количественного определения ядовитых соединений. Указанные обстоятельства требуют выделения токсического вещества из исследуемого объекта (с целью его изолирования и концентрирования) для последующего анализа токсиканта и выдачи окончательного заключения по его содержанию в биоматериале.

Методами преданалитической подготовки образца чаще всего являются экстракция органическим растворителем и твердофазная экстракция.

**Жидкостная экстракция** — процесс распределения растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, одной из которых является вода, второй — несмешивающийся с водой органический растворитель. Экстракция — извлечение вещества органическим растворителем из водной фазы; реэкстракция — извлечение вещества из фазы органического растворителя в водную. Переход экстрагируемого вещества из одного растворителя в другой происходит в результате разности концентраций и неодинаковой растворимости этого вещества в обоих растворителях.

Количественными характеристиками процесса экстракции являются **константа распределения** и **степень экстракции**. Согласно закону распределения вещество, растворенное в двух несмешивающихся жидкостях, распределяется между ними в постоянном соотношении, которое зависит от температуры и природы вещества и не зависит от концентрации. Закон справедлив в том случае, если распределяемое вещество в обеих фазах находится в одной и той же форме.

Постоянная величина, выражающая отношение концентраций распределяемого вещества, находящегося в обеих фазах в одной и той же форме, называется **константой распределения ( $P_o$ )**:

$$P_o = [A]_o/[A]_в,$$

где  $[A]$  — концентрация вещества в воде (в) и органическом растворителе (о), моль/л.

**Степень экстракции** (или % экстракции,  $R$ ) — это отношение количества экстрагированного вещества к начальному количеству этого вещества в водном растворе:

$$R = A \cdot 100/N,$$

где  $A$  — количество вещества, которое экстрагировалось органическим растворителем;  $N$  — начальное количество вещества в водном растворе.

Степень экстракции можно определить экспериментально или путем расчетов, зная константу распределения и соотношение объемов водной и

органической фаз. Степень экстракции с указанными величинами связана следующим соотношением:

$$R = P_o \cdot 100 / (P_o + V_B / V_o), \text{ соответственно} \\ V_B / V_o = [P_o(100 - R)] / R,$$

где  $V_B$  и  $V_o$  — объем водной фазы и органического растворителя, мл.

На основании табличных значений константы распределения и степени экстракции можно рассчитать ряд других количественных характеристик процесса экстракции, например, объема органического растворителя, необходимого для однократной экстракции.

**Пример.** Рассчитать объем органического растворителя, который нужно взять для однократной экстракции 99 % вещества из 100 мл его водного раствора, если константа распределения этого вещества между органической и водной фазами равна 20.

Значение  $V_B / V_o$  рассчитывают по формуле:  $V_B / V_o = [20(100 - 99)] / 99 = 0,2$ ;  $V_o = V_B / 0,2 = 100 / 0,2 = 500$  мл.

**Экстракция органических кислот.** Недиссоциированные молекулы органических кислот в водных растворах являются электронейтральными и слабо гидратируются молекулами воды. При контакте водных растворов с органическими растворителями такие молекулы легко сольватируются и переходят в слой органического растворителя. Ионы, образующиеся в водных растворах при диссоциации слабых кислот, легко и прочно гидратируются диполями воды, поэтому слабо сольватируются и не экстрагируются органическими растворителями из водных растворов. Изменение концентрации водородных ионов в водной фазе приводит к увеличению или уменьшению количества недиссоциированных молекул, а, следовательно, и к изменению экстрагируемости кислоты.

С понижением рН в водном растворе увеличивается число молекул недиссоциированной кислоты и возрастает ее экстрагируемость органическими растворителями. При значительном понижении рН слабую кислоту можно количественно перевести в органический растворитель. В зависимости от задачи, стоящей перед токсикологом, производные барбитуровой кислоты, например, сохраняют в водном растворе или переводят в слой органического растворителя, создав в водном растворе кислую среду.

**Экстракция органических оснований.** К органическим основаниям относятся алкалоиды и их синтетические аналоги, являющиеся фармпрепаратами. В нейтральной среде основания обычно неионизированы, под действием же кислот образуются их соли, хорошо диссоциирующие в водных растворах.

Недиссоциированные молекулы органических оснований слабо гидратируются, но хорошо сольватируются и экстрагируются из водных растворов органическими растворителями. Ионы, образующиеся при диссоциации солей органических оснований, хорошо гидратируются молекулами

воды и поэтому соли органических оснований, за небольшим исключением, не экстрагируются органическими растворителями. Органические основания являются слабыми электролитами и степень их ионизации зависит от pH среды. При их подкислении уменьшается число неионизированных молекул, и, следовательно, уменьшается степень экстракции этих веществ органическими растворителями, а в щелочной среде, соответственно, увеличивается и количественно может быть переведено в слой органического растворителя.

При проведении экстракции следует учитывать наличие эндогенных и экзогенных веществ в пробе, влияющих на чистоту экстракта и конечный результат анализа яда и его метаболитов. На содержание эндогенных и экзогенных компонентов в экстракте влияют:

- возраст, пол и вес пациента, определяющие во многом распределение яда и его метаболизм;

- одновременное присутствие других экзогенных химических веществ (лекарства, кофеин, табак, алкоголь), изменяющих фармакокинетические и фармакодинамические параметры яда;

- диета — свободные жирные кислоты связываются с альбуминами и конкурируют на этапе связывания яда с белком. Если токсическое вещество введено до приема пищи, то вследствие особенностей всасывания усиливается реабсорбция яда в тонком кишечнике и соответственно повышается его концентрация в крови;

- генетический эффект — отдельные индивидуумы обладают повышенной устойчивостью к действию некоторых химических агентов; если для одних доза введенного яда является смертельной, то для других эта же доза относительно безвредна;

- болезнь, которая может дать повышенный фон некоторых эндогенных соединений.

При подготовке пробы к анализу следует учитывать особенности каждого биообъекта.

**Кровь.** Обработке экстракцией может быть подвергнута цельная кровь, плазма или сыворотка (плазма, лишенная фибриногена) крови. Следует учитывать, что антикоагулянт гепарин вытесняет жирные кислоты из мест их связывания с альбумином. Это влияет, с одной стороны, на увеличение связывания токсических веществ с белками, с другой — на переход жирных кислот в органический растворитель при экстракции. Из других эндогенных соединений в экстрактах крови встречаются различные стероидные гормоны (тестостерон и др.), холестерин, которые в крови находятся в связанном состоянии с протеинами плазмы.

**Моча,** вследствие низкого содержания белковых компонентов в ней, является наиболее простым биообъектом для анализа. Из потенциальных эндогенных соединений в моче могут присутствовать низкомолекулярные

продукты метаболизма аминокислот и сахаров (амины, мочевины, карбоновые кислоты), небольшие количества пептидов, сахаров, стероидов и пигмент уробилин, окрашивающий мочу в желтый цвет ( $\lambda = 490$  нм) и мешающий спектрофотометрическому определению.

Экстракцию крови и мочи производят без резких встряхиваний, иначе за счет присутствия белка образуются трудноразделяемые эмульсии, для разрушения которых необходимо центрифугирование.

**Смывы** с рук и губ, содержащие каннабиноиды, экстрагируют путем обработки тампона диэтиловым эфиром (этанолом или этилацетатом) два раза порциями по 10 мл в течение 1 мин. Объединенный экстракт упаривают до объема 0,1–0,3 мл и используют для определения.

**Твердые вещества**, являющиеся простыми соединениями или простыми смесями (таблетки, капсулы, соли, остатки «неизвестного» порошка и т. п.) готовят к анализу следующим образом: 100 мг пробы обрабатывают 10 мл этанола, фильтруют (фильтрат подвергают анализу); остаток на фильтре обрабатывают 10 мл воды, фильтруют (фильтрат подвергают анализу).

Наряду с жидкость-жидкостной экстракцией в ХТА в процессе пробоподготовки может использоваться **метод твердофазной экстракции**. Метод подобен колоночной хроматографии и основан на специфическом межмолекулярном взаимодействии выделяемого из биоматериала компонента с сорбентом.

### АНАЛИЗ ПРОБЫ

В силу специфики анализа на содержание токсических, в том числе наркотических и других психоактивных веществ (сокрытие факта употребления, фальсификация проб, бессознательное состояние пациента) в основу его **методологии** положен метод скрининга, используемый при ненаправленном анализе, т. е. при анализе на неизвестное вещество.

**Скрининг** (screening — просеивание) — система методических приемов, позволяющая выбрать научно обоснованную последовательность операций, в результате которых поэтапно «отсеиваются» (или определяются) группы соединений и/или отдельные вещества.

Первый этап скрининга — **проведение предварительных методов исследования** — ставит своей целью получение наименьшего количества ложноотрицательных результатов. Ложноотрицательный результат — это необнаружение экзогенного вещества при фактическом его присутствии в пробе. Получение ложноотрицательных результатов может быть связано с недостаточной чувствительностью используемого метода, преднамеренной фальсификацией пробы, недостаточной квалификацией врача лабораторной диагностики, систематическими ошибками исследований.

Второй этап — **проведение подтверждающих методов исследования** — состоит в удалении ложноположительных результатов. Ложнополо-

ложительный результат (наиболее серьезная ошибка ХТА) — это обнаружение экзогенного вещества с помощью определенной методики при фактическом его отсутствии в пробе. Ложноположительные результаты обусловлены недостаточной специфичностью метода за счет перекрестных реакций, загрязненными реагентами, недостаточной квалификацией врача лабораторной диагностики, систематическими ошибками исследований. Под специфичностью понимают способность метода отличить химическую структуру данного соединения от аналогов.

В качестве основных предварительных скрининговых методов в ХТА используются:

- химические методы (хромогенные и микрорекристаллографические реакции);
- иммунохимические методы;
- метод тонкослойной хроматографии.

В качестве подтверждающих методов исследования используются газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), инструментальная хроматография с масс-спектрометрией. Подтверждающие методы должны быть выше или равными по чувствительности, но обязательно должны быть выше по специфичности для того, чтобы снизить количество ложноположительных результатов.

При выборе аналитического метода необходимо учитывать его преимущества и недостатки, и в любом случае, в том числе при использовании самых чувствительных методов, результаты скрининга должны быть подтверждены аналитическими методами, основанными на других физико-химических принципах.

Для получения идентичных аналитических данных при использовании разных методов исследователю необходимо иметь рациональную программу использования стандартных веществ, вспомогательных материалов, их качественную и количественную статистику.

**Стандартное вещество** — это чистое вещество в химически стабильной сухой порошкообразной форме. Стандартные вещества хранятся в сейфе, а нестойкие — в холодильнике или морозильной камере.

**Эталонные растворы** представляют собой растворы стандартного вещества точной (до 0,00001 г) концентрации в деминерализованной воде или органическом растворителе; готовятся в мерных колбах первого класса точности. Они должны быть помечены, датированы и должна быть указана фамилия приготовившего. Концентрация раствора периодически проверяется. Хранение осуществляется в холодильнике или морозильной камере в стеклянных сосудах с плотно завинчивающимися крышками. Эталонные растворы применяются для калибровки аналитических приборов или аналитического контроля.

**Рабочие растворы** готовятся путем разбавления эталонных растворов водой или органическим растворителем. Готовятся на короткое время и используются для построения калибровочной кривой.

**Контрольный образец** (модельный опыт) — биологический образец, содержащий анализируемое вещество известной концентрации в биоматрице, идентичной исследуемым объектам. Этот образец анализируется в одной серии с неизвестным образцом для того, чтобы проконтролировать качество анализа.

**Холостой образец** — образец, идентичный по составу биоматериалу контрольного, не содержащий подозреваемого вещества. Холостой опыт производится для того, чтобы определить систематическую ошибку, называемую фоном. Фон — это аналитический сигнал, являющийся результатом совместного действия компонентов в биоматрице, вводимых реагентов и операций, производимых с образцом до момента измерения. Фон биоматрицы может исказить результаты анализа, давая положительную или отрицательную ошибку. При проведении количественного определения сначала должен быть поставлен холостой, а затем контрольный опыт.

**Внутренний стандарт** — соединение, химически схожее с анализируемым и используемое как метка в качественном или количественном анализе (например, пропанол при количественном исследовании этанола).

При выборе как предварительных, так и подтверждающих методов исследования руководствуются следующими соображениями:

- доступностью метода, оборудования, реагентов;
- наличием необходимой инфраструктуры для размещения и обслуживания прибора;
- трудоемкостью;
- экспрессностью;
- простотой выполнения анализа;
- заменяемостью узлов прибора;
- техникой безопасности.

## **ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ**

Используя полученные результаты, врач лабораторной диагностики должен не только констатировать обнаружение или необнаружение токсического вещества, но и, по возможности, интерпретировать результат: определить время приема токсина путем сравнения его концентрации в крови и моче, при исследовании на наличие наркотических средств различать случаи хронического и разового использования путем сопоставления концентрации обнаруженного вещества и его метаболитов и т. д.

## Документальное оформление в ХТА

Как было уже сказано, основанием для выполнения ХТА является **направление** на химико-токсикологическое исследование, подписанное врачом и медицинской сестрой.

В ходе выполнения исследования врачом лабораторной диагностики ведется в произвольной форме **индивидуальный рабочий журнал**, куда записываются операции, проведенные с исследуемой пробой, на основании которых дается заключение. При количественном исследовании должны быть показаны данные приборов и расчеты, приложены спектрограммы, хроматограммы, на которых должны быть указаны данные субъекта обследования (Ф.И.О., номер медицинской карты, дата и т. д.).

В **общелабораторный журнал регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов** (прил.) переносят результаты анализа на основании записей в рабочем журнале. Нумерация анализов в журнале регистрации сквозная, записи ведутся ручкой с синими чернилами, все графы заполняются без прочерков, исправления скрепляются подписью. Журнал начинается в 0 часов 1 января и заканчивается в 24 часа 31 декабря каждого года. Страницы журнала должны быть пронумерованы, прошнурованы и скреплены печатью и подписью руководителя организации.

Результаты ХТА оформляются также **актом исследования** (прил.) в 2 экземплярах, который подписывается лицом, производившим исследование, и заведующим лабораторией. Один экземпляр акта отправляется в направившую инстанцию, другой хранится в лаборатории.

Окончательный диагноз отравления ставит врач-токсиколог на основании результатов химико-токсикологического анализа в комплексе с данными клинического обследования больных.

### ВОПРОСЫ

1. Каковы правила отбора и хранения крови для исследования на наличие наркотических веществ?
2. Какие методы подготовки биологической пробы к анализу в ХТА Вам известны, в чем их суть?
3. Какие методы исследования используются в качестве предварительных и подтверждающих скрининговых методов?

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Борисевич, С. Н.* Методы лабораторной диагностики острых отравлений : учеб.-метод. пособие / С. Н. Борисевич. Минск : БГМУ, 2010. 64 с.
2. *Клиническая токсикология детей и подростков* : в 2 ч. / под ред. И. В. Марковой, В. В. Афанасьева, Е. К. Цыбулькина. СПб. : Интермедика, 1999. Ч. 1. 302 с.
3. *Токсикологическая химия* : учеб. для вузов / под ред. Т. В. Плетеновой. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. 512 с.

4. Жебентяев, А. И. Токсикологическая химия : учеб. пособие / А. И. Жебентяев, Н. А. Алексеев. Витебск : ВГМУ, 2003. 203 с.

5. Романовский, И. В. Значимость химико-токсикологической подготовки в формировании знаний и умений студентов и выпускников БГМУ / И. В. Романовский, О. Н. Ринейская, С. Н. Борисевич // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены. Минск : РНМБ, 2011. Вып. 17. С. 104–107.

## БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ОРГАНИЗМЕ

### ТОКСИКОДИНАМИКА И ТОКСИКОКИНЕТИКА ЯДОВ В ОРГАНИЗМЕ

В токсикологии ядовитым веществом называют такое химическое соединение, которое, будучи введенным в организм в малых количествах и действуя на него химически или физико-химически, при определенных условиях может привести к болезни или смерти. Абсолютных ядов, т. е. химических веществ, способных приводить к отравлению в любых условиях, в природе не существует. Химическое вещество становится ядом при определенных условиях: доза, условия применения, состояние организма и т. п.

Отравления ядовитыми веществами могут изучаться с точки зрения их токсикодинамики и токсикокинетики. Под термином токсикодинамика подразумевают механизм действия ядовитых веществ на организм. Токсикокинетика изучает процессы, происходящие с ядовитыми веществами в организме (всасывание, распределение, превращения, выделение из организма). Знание токсикокинетики ядов позволяет специалисту правильно произвести химико-токсикологическое исследование и оценить его результаты.

#### Пути поступления ядов в организм

Яды могут поступать в организм различными путями: через рот, дыхательные пути, кожу, слизистые оболочки, плаценту и др.

Яды, поступившие в организм *через рот*, всасываются как во рту, так и в других отделах ЖКТ. Вещества, всасывающиеся слизистой оболочкой полости рта, поступают непосредственно в кровь, минуя печень. К таким ядам относятся цианиды, никотин, фенол, нитроглицерин, частично — этиловый спирт.

Значительно большее число ядов, принятых *per os*, всасывается в желудке и кишечнике, при этом скорость всасывания зависит от физико-химических свойств веществ и pH содержимого желудка и кишечника. Ядовитые вещества кислого и основного характера всасываются в пищевом канале в виде недиссоциированных молекул. В кислой среде желудка

подавляется диссоциация поступивших кислот, и они хорошо всасываются (это барбитураты, некоторые липофильные вещества); вещества основного характера здесь хорошо протонируются, приобретают положительный заряд и не всасываются. Содержимое тонкого кишечника имеет  $pH = 5-7$ , при этом большинство алкалоидов, их синтетических аналогов, аминов находится в неионизированном состоянии и хорошо всасываются. Здесь, как и в желудке, всасываются некоторые липофильные вещества.

**Через дыхательные пути** в организм могут проникать ядовитые вещества, находящиеся в окружающем воздухе в виде газов, паров и пыли (хлорпроизводные углеводородов, спирты, летучие соединения серы, азота, фосфора, мышьяка, сероуглерод, синильная кислота, ацетон, бензин, диэтиловый эфир, формальдегид, аэрозоли). Это происходит, главным образом, в недостаточно вентилируемых производственных помещениях. Отравление оксидом углерода (II) (угарным газом) через дыхательные пути может произойти в быту. При ингаляционном пути отравления яды быстро поступают в кровь. Это объясняется большой поверхностью легочных альвеол, через которые всасываются яды, незначительной толщиной альвеолярных мембран, интенсивным током крови в легочных капиллярах.

**Кожа** является одним из возможных путей поступления ядов в организм. Через эпидермис проникают только растворимые в липидах вещества; проникновению водорастворимых препятствует жировой слой, образующийся на поверхности кожи в результате секреторной деятельности сальных желез. Через кожу легко проникают никотин, тетраэтилсвинец, хлорпроизводные углеводородов, хлорсодержащие ядохимикаты, ароматические амины, углеводороды жирного ряда (от  $C_6$  до  $C_{10}$ ), мелкоизмельченные соли таллия, ртути и других металлов. При механическом повреждении кожи, ожогах проникающая способность ядов через кожу увеличивается.

При **парентеральном введении** ядов (инъекции под кожу, в мышцы, вену, серозные полости) они поступают прямо в кровь, минуя ЖКТ. Такие отравления встречаются крайне редко.

Яды могут поступать **через плаценту**, от матери к плоду. Описаны случаи отравлений плода этиловым спиртом, ядохимикатами, солями тяжелых металлов.

## ВСАСЫВАНИЕ ЯДОВ В ОРГАНИЗМЕ

Токсические вещества из внешней среды поступают в циркулирующую кровь и лимфу, с их током переносятся в межклеточную жидкость, а затем — в клетки. Кроме кровообращения, распределение ядов по органам и тканям зависит от их связывания белками плазмы и органов, растворимости в липидах, степени ионизации и других факторов.

Свободному проникновению ядов в клетки препятствуют покрывающие их мембраны, основу которых составляет липидный бислой. Молекулы мембранных липидов дифильны: гидрофобные группы (углеводородные цепи) обращены внутрь, а гидрофильные ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ) направлены наружу. Поверхность двойного слоя липидов покрыта мономолекулярным слоем белка. На поверхности мембраны находятся олигосахариды, моносахариды, полимеры. Для каждого типа мембран характерно определенное соотношение специфических полярных липидов и белков.

Мембраны первого типа препятствуют прохождению ионов и пропускают нейтральные молекулы в зависимости от их липофильных свойств. Через мембраны первого типа вещества в клетки проникают по законам диффузии: переход вещества через мембрану происходит тогда, когда концентрация его в клетке меньше, чем в межклеточной жидкости; переход продолжается до уравнивания концентраций по обе стороны мембраны. Через мембраны первого типа переносятся в клетку липофильные вещества — этиловый спирт, ацетон, фенол и его производные, бензол, толуол, нитробензол, ароматические амины, хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорметан, синильная кислота, сероуглерод, газообразные соединения, содержащие хлор, серу, азот, фосфор, мышьяк.

Мембраны второго типа для большинства полярных молекул и некоторых ионов непроницаемы, но они проницаемы для комплексов этих соединений с некоторыми ферментами или специфическими белковыми компонентами мембран. Проникнув в клетку, эти комплексы расщепляются с высвобождением полярного вещества. Таким путем проникает, например, глюкоза в эритроциты крови человека.

Через мембраны третьего типа осуществляется активный перенос: вещества переходят из среды с меньшей их концентрацией в среду с большей. Это происходит подобно тому, как в мембранах второго типа, однако, здесь переносчик претерпевает химическое превращение, для осуществления которого требуется определенная энергия, источником которой может быть реакция гидролиза АТФ.

Мембраны четвертого типа отличаются от первых трех мозаичным строением, они состоят из липидных цилиндров и белковых ячеек. Такие мембраны имеют поры, через которые свободно проникают молекулы воды и анионы небольшого размера, но не проникают катионы. Разная проникающая способность ядов определяет их разное распределение в тканях и их избирательную токсичность.

Действие токсических веществ, вступивших в контакт с клетками организма, проявляется при их взаимодействии с рецепторами. Рецепторы представляют собой группы атомов или молекул, способных взаимодействовать с ядовитыми веществами, поступившими в организм. Функции рецепторов выполняют группы атомов — сульфгидрильные, гидроксиль-

ные, карбоксильные, аминные и фосфорсодержащие группы белковых и других жизненно важных соединений в организме. Свойствами рецепторов также могут обладать некоторые аминокислоты, ферменты, витамины, гормоны.

В зависимости от химического строения и свойств ядов и соответствующих им рецепторов прочность химической связи между ними может быть различной. Взаимодействие может осуществляться за счет образования ковалентных (самых прочных), ионных (менее прочных), непрочных водородных связей, а также наименее прочных связей за счет сил Ван-дер-Ваальса.

Так, при отравлениях солями тяжелых металлов и другими неорганическими веществами образуются ковалентные связи с сульфгидрильными группами молекул белков. Особенно прочны такие связи с ионами мышьяка, сурьмы, ртути, висмута. Это учитывается при проведении химикотоксикологического исследования при отравлении тяжелыми металлами: изолирование металлических ядов из биоматериала требует разрушения органических веществ концентрированными минеральными кислотами при нагревании (минерализация). В то время как при изолировании ядов, связанных с рецепторами ионными или другими менее прочными связями, применяют методы экстракции или настаивания биоматериала с водой или этиловым спиртом.

### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЯДОВ В ОРГАНИЗМЕ

Поступившие в кровь ядовитые вещества разносятся ею по всему организму. Содержание яда в каждом органе зависит от его кровоснабжения: через сердце, легкие, мозг и печень протекает значительно больше крови, чем через другие органы.

Распределение токсических веществ в организме зависит от их физических и химических свойств (растворимость в воде и липидах, диссоциация и др.). Так, хорошо растворимые в жирах токсические вещества (анестетики, снотворные, седативные лекарственные средства, хлорсодержащие инсектициды) хорошо проникают через биологические мембраны, быстро и селективно распределяются в богатых липидами, хорошо снабжаемых кровью органах — головном и костном мозге. Другие жирорастворимые яды депонируются в жировой ткани (органические растворители, хлорпроизводные углеводов). В костной ткани отлагаются свинец, барий, фтор, антибиотики тетрациклинового ряда. Аминазин локализуется, главным образом, в головном, а бензол — в костном мозге. В коже откладываются золото и серебро. Такие элементы, как висмут, ртуть, мышьяк накапливаются в тканях, богатых белками и содержащих сульфгидрильные группы. Так, ртуть накапливается в почках, вызывая в них некротические изменения.

Ионы кальция и некоторых других элементов связываются с гликопротеинами межклеточной жидкости. Водорастворимые вещества находятся в меж- и внутриклеточной жидкости (у человека массой 70 кг — 14 л межклеточной и около 28 л внутриклеточной жидкости).

Место локализации токсических веществ зависит и от характера отравления: при остром отравлении ртуть и мышьяк локализуются в печени и почках, а при хроническом могут откладываться в ногтях, костях, волосах, нервной ткани.

Знание распределения ядов в организме необходимо для проведения судебно-химического и химико-токсикологического их исследования.

### ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА

Токсические вещества, поступившие в организм, оказывают определенное действие, а затем выделяются в неизменном виде или в виде метаболитов преимущественно через почки, печень, легкие, кишечник, или одновременно несколькими путями (как этиловый спирт).

**Почки** выводят хорошо растворимые в воде и способные диссоциировать на ионы соединения. Чем меньше молекулярная масса этих соединений, тем легче они выводятся с мочой. Фактором, влияющим на выделение слабых органических кислот и оснований, является рН мочи, от которой зависит диссоциация указанных веществ. Слабые органические основания (хинин, амитриптилин, кофеин, теофиллин, антипирин и др.) лучше переходят в мочу, если она имеет более кислую реакцию, чем плазма крови. Слабокислые вещества лучше переходят в мочу щелочной реакции, это барбитураты, сульфаниламиды, антикоагулянты, салициловая кислота и др.

Некоторые металлы в виде ионов или комплексов с органическими веществами также выделяются через почки.

Липофильные вещества не выделяются из организма почками, однако, большинство их метаболитов являются растворимыми в воде и выделяются с мочой.

Моча, наряду с кровью — важный объект исследования химико-токсикологических лабораторий.

В **печени** происходит метаболизм большого числа токсинов, которые выводятся затем с желчью преимущественно в виде конъюгатов. Желчь доставляет токсины в кишечник, которые либо выделяются через кишечник, либо снова всасываются здесь в кровь и выделяются почками.

**Легкие** являются главным органом выведения из организма летучих жидкостей и газообразных веществ. Эти вещества легко проникают из крови в альвеолы через их мембраны и выделяются с выдыхаемым воздухом. В неизменном виде так выделяются оксид углерода (II), этанол, се-

роводород, диэтиловый эфир, ацетон, бензол, бензин, хлорпроизводные углеводов.

**Кожа.** Ряд лекарственных и ядовитых веществ частично выводится через потовые железы кожи, это соединения мышьяка и некоторых тяжелых металлов, бромиды, йодиды, хинин, камфора, этанол, ацетон, фенол, хлорпроизводные углеводов.

**Молоко.** С молоком матери могут попадать в организм грудного ребенка этиловый спирт, аспирин, барбитураты, никотин, морфин, кодеин. Коровье молоко может содержать отдельные пестициды.

## ВОПРОСЫ

1. Какие вещества и при каких условиях относятся к ядам?
2. Почему знание путей поступления ядов в организм, их распределения и выделения из организма необходимо при их химико-токсикологическом исследовании?

## ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ТОКСИЧНОСТЬ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

### ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ТОКСИЧНОСТЬ

Токсичность ядовитых веществ зависит от следующих факторов:

- доза и концентрация;
- физические и химические свойства;
- пути и скорость проникновения в организм;
- возраст, пол, индивидуальная предрасположенность к яду и т. д.

Одним из важнейших факторов, определяющих токсичность химических соединений, является их **доза**. Терапевтическая доза — это доза вещества, вызывающая определенный лечебный эффект. Токсической называется доза вещества, вызывающая патологические изменения в организме, не приводящие к летальному исходу. Летальной называется доза, вызывающая гибель организма. Дозы лекарств и ядов выражают в массе (г, мг), объеме (мл, капли) и в единицах биологической активности.

Действие яда зависит и от времени пребывания в организме — от начала резорбции до времени полной элиминации. Период резорбции продолжается от момента поступления яда в организм до достижения максимальной его концентрации в крови. Период элиминации начинается с момента достижения максимальной концентрации в крови до полного исчезновения токсина из крови. Показатель, отражающий время, необходимое для снижения концентрации вещества в плазме крови на 50 %, называется периодом полувыведения ( $T_{1/2}$ ).

Для сравнительной оценки токсичности ядов пользуются величиной ЛД<sub>50</sub> (мг/кг). Эта величина является средней дозой, после поступления которой в организм (в желудок, брюшную полость, на кожу) в течение 3 суток наступает гибель 50 % подопытных животных.

Токсичность газообразных и других веществ в окружающей среде характеризуется не дозой, а **концентрацией**. Предельно допустимая концентрация (ПДК) — это наименьшая концентрация химических соединений, которая при ежедневном воздействии на организм человека в течение длительного времени не вызывает каких-либо патологических изменений или заболеваний, обнаруживаемых современными методами исследования.

С целью санитарной оценки производится определение ПДК токсических веществ в атмосферном воздухе, в воздухе рабочей зоны и в воде водоемов. На основании определения ПДК разрабатываются мероприятия по очистке воздуха предприятий и воды водоемов от загрязнений токсическими веществами.

**Физические и химические свойства** токсинов (агрегатное состояние, растворимость в воде и жирах, степень диссоциации) влияют на их токсичность. Газы и пары действуют быстрее, чем жидкие и твердые вещества. Токсичность твердых веществ зависит от размера их частиц: тонкоизмельченные яды являются более токсичными, т. к. быстрее растворяются. Токсичность связана с растворимостью в жирах и воде: жирорастворимые вещества быстрее проникают из крови в клетки через мембраны. Токсичность веществ зависит и от их диссоциации. Так, нитрат и хлорид бария хорошо диссоциируют в воде и обладают высокой токсичностью, а нерастворимый сульфат бария нетоксичен; слабо растворимый оксид мышьяка (III) значительно менее токсичен, чем арсенаты и арсениды щелочных металлов. Растворимые в воде соли тяжелых металлов также более токсичны, чем их оксиды.

Существует и видовая чувствительность к ядам, она варьирует. Например, травоядные животные могут поедать красавку, содержащую алкалоиды, или наперстянку, содержащую сердечные гликозиды, без проявления признаков отравления. Для человека же эти растения ядовиты, что объясняется разной скоростью метаболизма и выделения из организма.

## **ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И ДЕЙСТВИЕ НА ОРГАНИЗМ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

Установлено, что действие на организм химических веществ зависит от их химического строения. Однако закономерности этой зависимости установлены не для всех веществ. Известно, что токсичность химических

соединений обусловлена наличием в их молекуле определенных функциональных групп или двойных связей.

Многие ненасыщенные соединения являются более токсичными, чем близкие к ним по составу насыщенные вещества. Так, аллиловый спирт ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) более токсичен, чем близкий к нему по составу насыщенный пропиловый спирт ( $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ ).

Токсичными являются вещества, в молекулах которых содержатся следующие атомные группы:  $=\text{C}=\text{O}$ ,  $=\text{S}$ ,  $=\text{C}=\text{C}$ ,  $-\text{N}=\text{C}$ ,  $-\text{NO}_2$ .

Токсичность некоторых органических веществ обусловлена введением в их молекулу атомов хлора, фтора, мышьяка, ртути.

Определенные группы атомов усиливают токсичность ( $-\text{C}=\text{C}-$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{NH}_2$ ).

Токсичность химических соединений зависит от их положения в гомологических рядах: с увеличением молекулярной массы токсичность гомологов возрастает (пропионовая кислота токсичнее уксусной, а масляная токсичнее пропионовой).

Алифатические спирты имеют более выраженное токсическое действие, чем их изомеры с разветвленной цепью (пропиловый и бутиловый спирты токсичнее, чем изопропиловый и изобутиловый).

С увеличением числа атомов углерода в молекулах спиртов и альдегидов их токсичность возрастает. Из этого правила есть исключения: метиловый спирт токсичнее этилового, формальдегид токсичнее, чем ацетальдегид.

## МЕТАБОЛИЗМ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Вещества, поступившие в организм с пищей, а также лекарственные и другие соединения под влиянием ферментов подвергаются различным превращениям, этот процесс называется метаболизмом или биотрансформацией.

Белки, жиры, углеводы, гормоны, витамины и другие свойственные организму вещества подвергаются метаболизму с помощью специфических ферментных систем, обеспечивающих энергией и структурными элементами клетки, ткани и деятельность организма в целом.

В организм поступают и не свойственные ему вещества: лекарственные препараты, пищевые добавки, химические средства защиты растений, средства бытовой химии. Они не превращаются в компоненты клеток и тканей и не обеспечивают организм энергией. В определенных условиях эти вещества могут нарушать нормальные процессы метаболизма, вызывать отравления организма. Такие вещества называются чужеродными, или ксенобиотиками.

Для метаболитов ксенобиотиков характерно то, что они чаще всего менее токсичны, чем образовавшие их чужеродные вещества. Метаболи-

ты являются более полярными соединениями, соответственно, более растворимыми и легко выводятся из организма. Поэтому метаболизм лекарств и особенно ядов является одним из путей их детоксикации. В связи с этим изучение метаболизма представляет большой интерес для фармакологов, токсикологов, клиницистов, а также для химиков-токсикологов, т. к. некоторые вещества быстро метаболизируют и могут быть обнаружены только в виде метаболитов. Свойства же метаболитов отличаются от свойств самих чужеродных соединений, соответственно, отличаются и методы их изолирования, обнаружения и определения.

Для полного представления о количестве яда, вызвавшего отравление, и времени, прошедшего с момента его приема, при химико-токсикологическом исследовании необходимо производить обнаружение не только самого ядовитого вещества, но и его метаболитов, а также их соотношения. Однако методы обнаружения и тем более количественного определения многих метаболитов разработаны недостаточно, а работа в этом направлении сталкивается со следующими трудностями: 1) малые количества метаболита в объекте; 2) многопроцедурная работа с биоматериалом, приводящая к потерям метаболита; 3) отсутствие стандартных веществ. Сегодня получены определенные результаты, позволяющие установить состав и строение метаболитов наиболее важных ксенобиотиков и вывести некоторые закономерности процессов биотрансформации.

Как правило, метаболизм чужеродных соединений происходит в 2 фазы:

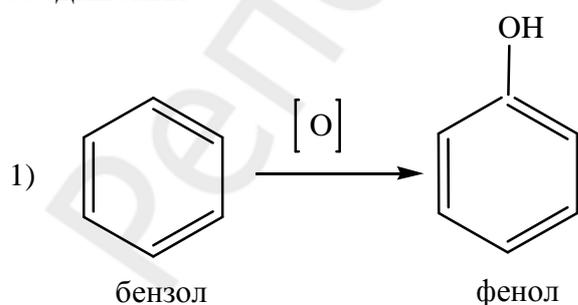
1. — метаболизм под влиянием ферментных систем;

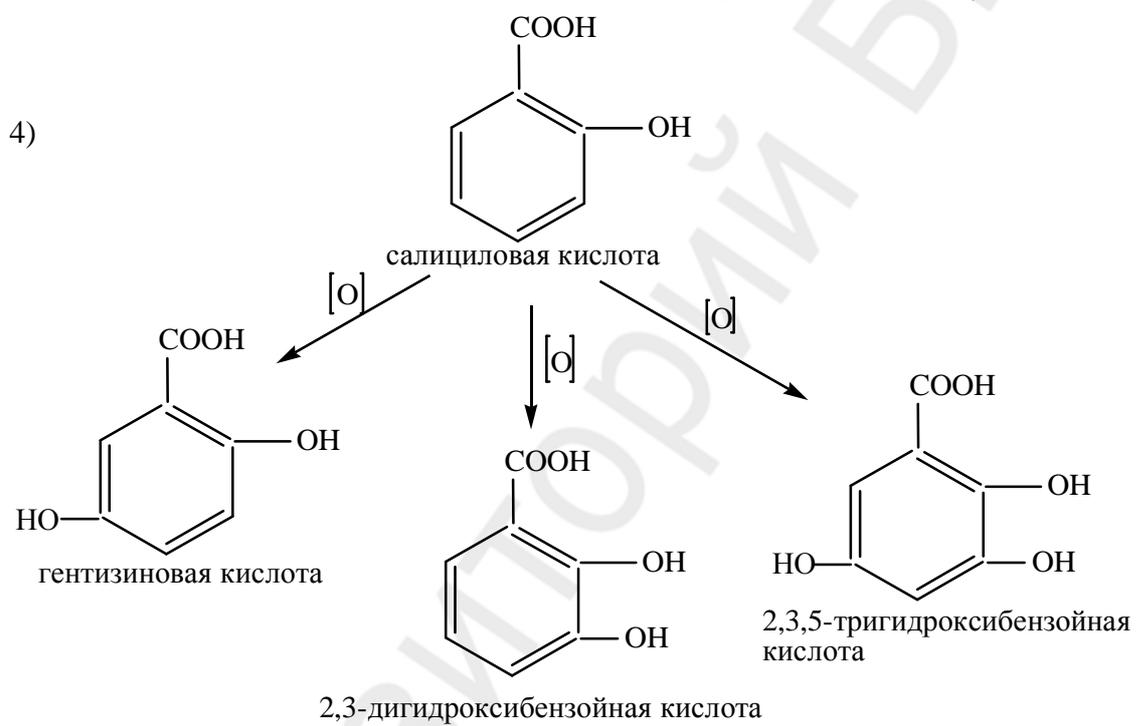
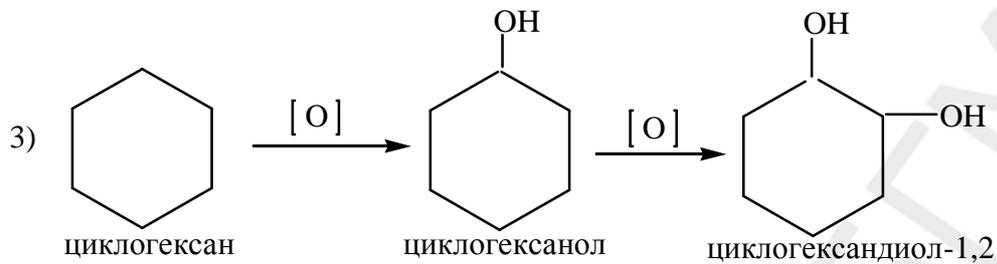
2. — образование конъюгатов метаболитов с некоторыми веществами в организме.

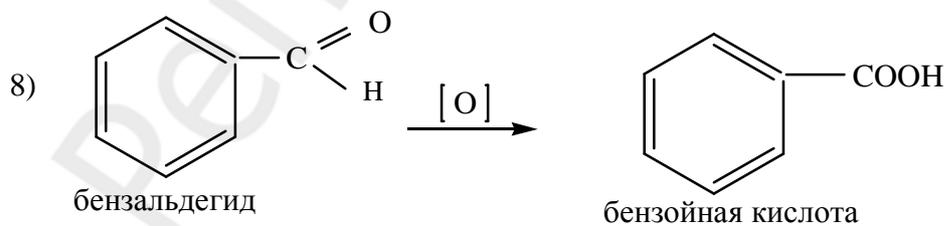
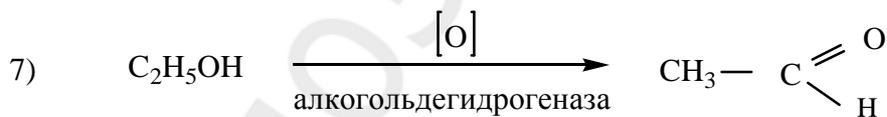
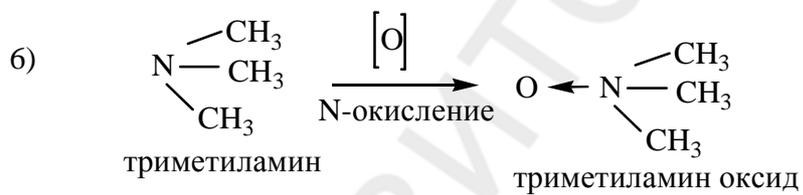
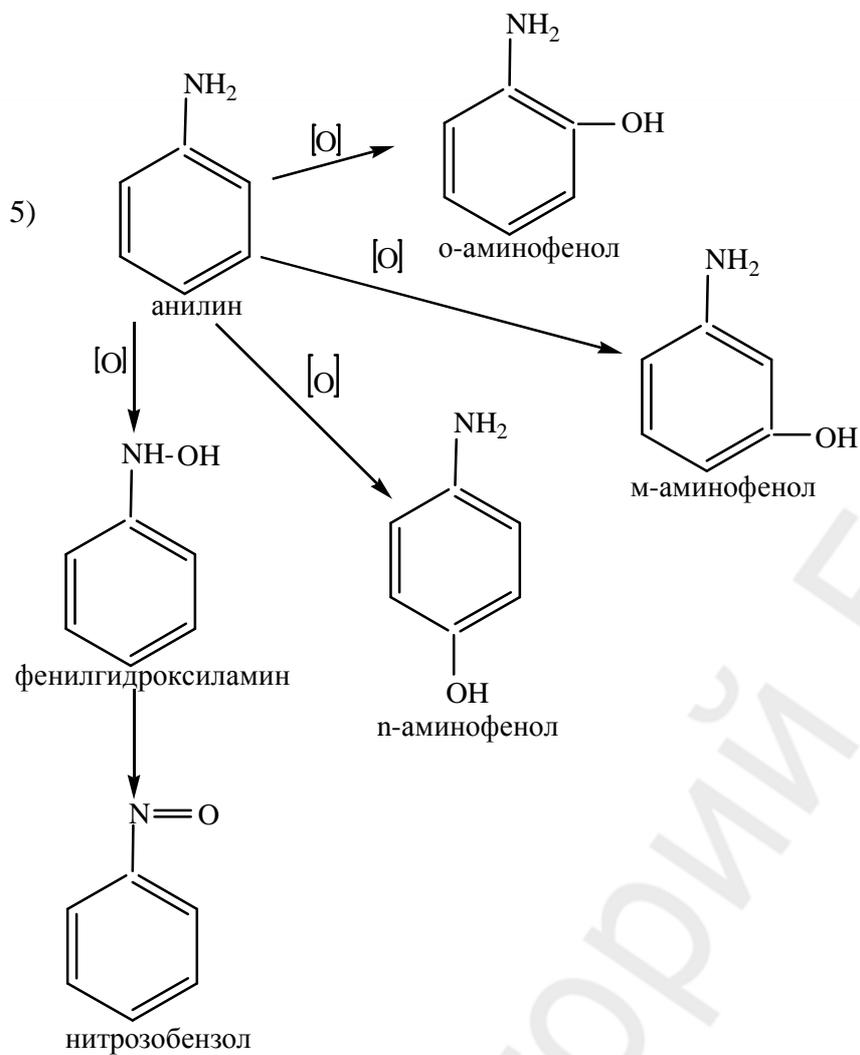
В первой фазе метаболизма чужеродные соединения могут подвергаться окислению, восстановлению, гидролизу, дезаминированию, дезалкилированию, десульфированию и другим превращениям.

При **окислении** чужеродных соединений (под действием ферментов оксидаз) может происходить спиртовое и фенольное гидроксילирование, карбоксилирование, образование оксидов и других соединений.

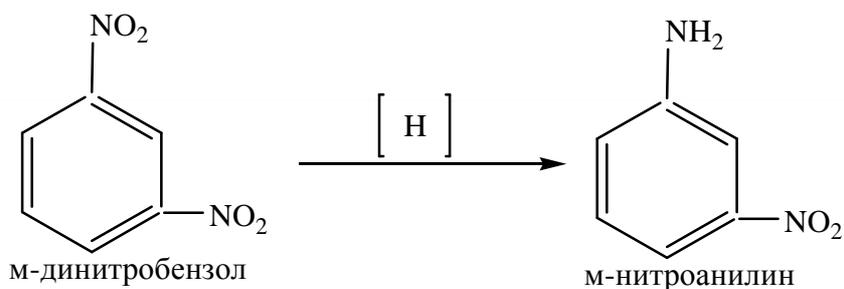
Гидроксילированию подвергаются ароматические и алициклические соединения:



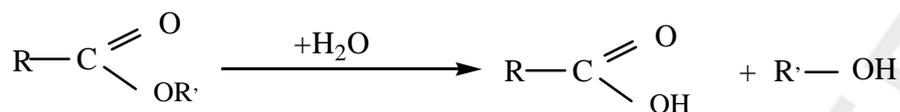




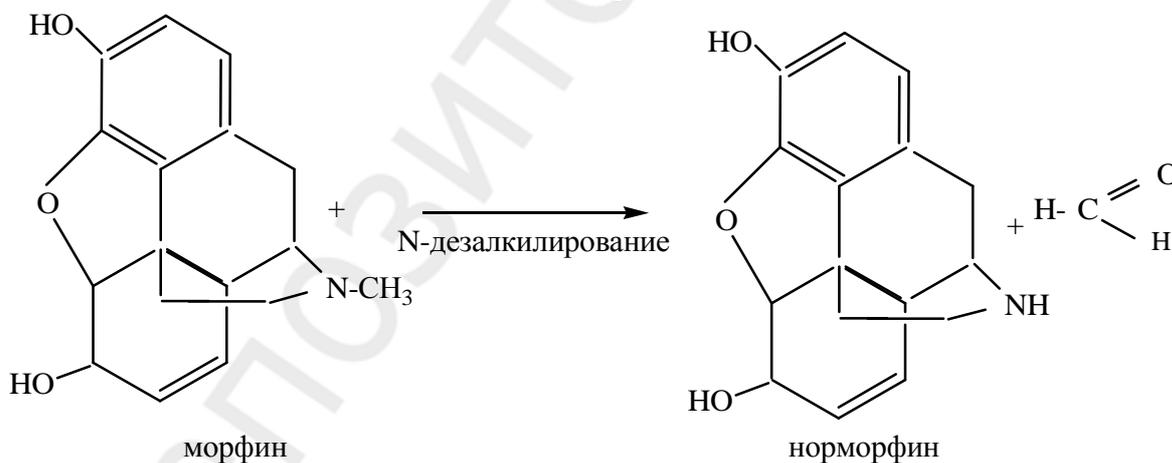
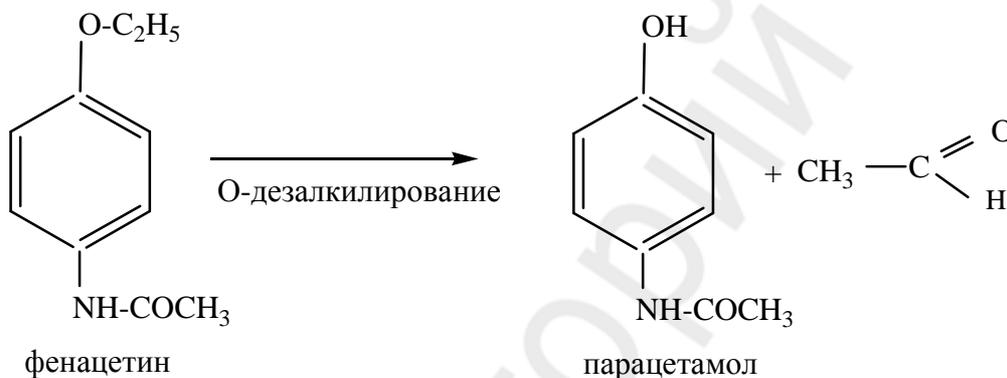
**Восстановление** чужеродных соединений катализируется ферментами редуктазами:



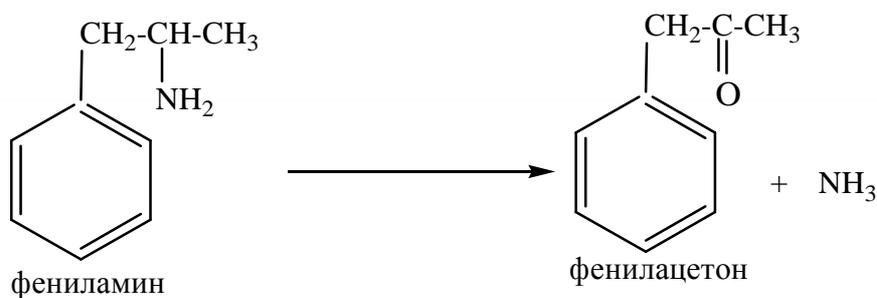
**Гидролиз** ксенобиотиков (сложных эфиров, амидов, карбаматов) происходит под влиянием гидролитических ферментов — эстераз, амидаз и др.



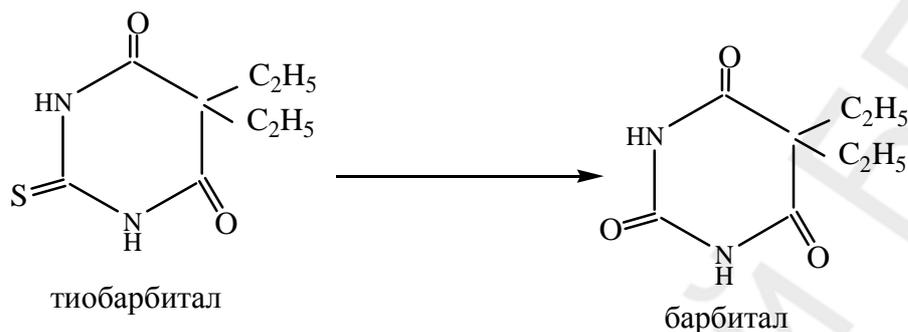
При **дезалкилировании** происходит отщепление алкильных групп при атомах O, N, S; при этом образуются соответствующие фенолы, амины, тиолы:



**Дезаминирование** фенамина происходит с образованием фенилацетона и аммиака:



**Десульфирование** (тиобарбитураты, инсектициды и др.) идет до кислородных аналогов:

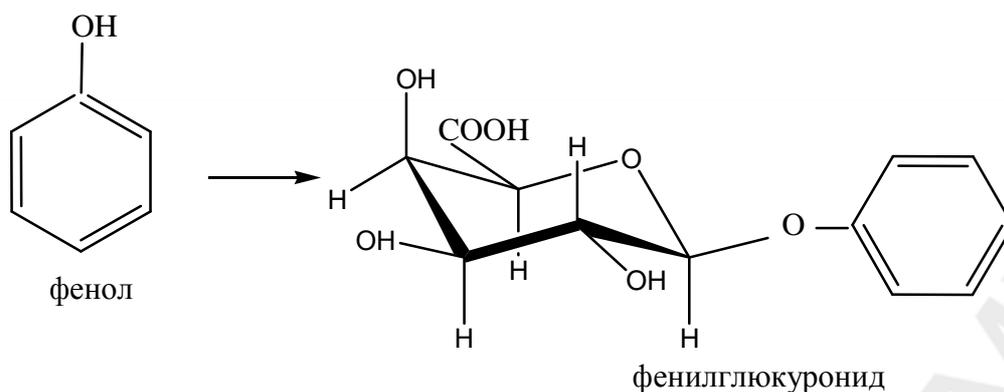


Кроме указанных типов превращений происходят и другие, механизм которых выяснен недостаточно (восстановление гидроксамовых кислот, разрыв кольца в циклических соединениях или образование кольца — циклизация).

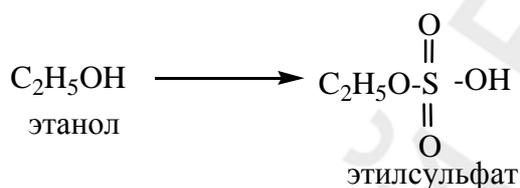
Во второй фазе метаболизма происходит конъюгация метаболитов или самих токсинов с некоторыми веществами в организме. Реакции конъюгации являются реакциями биосинтеза, они протекают под влиянием соответствующих ферментов за счет определенных функциональных групп в молекулах токсинов. Конъюгаты являются более полярными, лучше растворимыми в воде и менее токсичными, чем чужеродные соединения. Таким образом, реакции конъюгации являются реакциями детоксикации.

В организме метаболиты чужеродных соединений могут образовывать конъюгаты с глюкуроновой кислотой, аминокислотами глицином и цистеином, ацетатами, сульфатами и другими веществами.

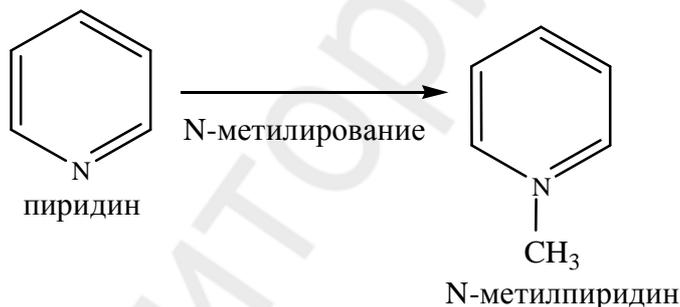
Глюкуроновая кислота со спиртами, фенолами, аминами в печени под действием фермента глюкуронилтрансферазы образует вещества, называемые глюкуронидами:



Фенолы и спирты в организме под действием фермента сульфотрансферазы образуют конъюгаты с серной кислотой, представляющие собой сложные эфиры этих веществ:



N-метилирование целого ряда лекарств и ядовитых веществ, являющихся аминами, происходит под влиянием фермента N-метилтрансферазы:



Некоторые чужеродные соединения и их метаболиты имеют две и более функциональные группы, с помощью которых они могут вступать в реакции конъюгации с глюкуроновой кислотой, сульфатами с образованием двойных конъюгатов. В ряде случаев токсины метаболизируют несколькими путями: сложные эфиры гидролизуют с образованием кислот и спиртов; спирты в свою очередь окисляются до кислот, которые вступают в реакции конъюгации с глицином. Таким образом, чаще чужеродные соединения выводятся из организма в виде смеси их самих, их метаболитов и их конъюгатов.

## ВОПРОСЫ

1. Наличие каких функциональных групп в структуре органического соединения обуславливает его токсичность?

2. Каким химическим путем идет метаболизм морфина? Каков основной продукт метаболизма?

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Крамаренко, В. Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. Киев : Выща шк., 1989. 447 с.
2. Элленхорн, М. Дж. Медицинская токсикология. Диагностика и лечение отравления у человека : в 2 т. / пер. с англ. М. : Медицина, 2003. Т. 1. 1036 с.
3. Clark, E. G. C. Isolation and identification of drugs in body fluids and postmortem material : in 2 v. / E. G. C. Clark. London : The Pharm. Press, 1986.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

#### ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. МИКРОКРИСТАЛЛОСКОПИЯ

##### Классификация ядов

Классификация ядов в клинической токсикологии проводится в соответствии с механизмами и степенью воздействия их на организм.

В химико-токсикологическом анализе рассматриваемые токсикологией химические вещества подразделяются на группы в зависимости от способа, которым они изолируются из различных биологических объектов. Несмотря на некоторую условность такой классификации, она является общепринятой.

Первая группа ядовитых веществ по этой классификации включает **«летучие» органические соединения**: углеводороды (пентан, гептан, гексан, октан, петролейный эфир, циклопропан, циклогексан, циклогептан, бензин, бензол, толуол), спирты (метанол, этанол, пропанол, бутанол, пентанол, изоамиловый спирт), кетоны (ацетон, метилэтилкетон, циклогексанон, метилциклогексанон), эфиры (диэтиловый эфир, метилцеллозольв, этилцеллозольв, этилацетат, бутилацетат, изоамилацетат), галогенпроизводные углеводородов (дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан, перхлорэтилен, фреоны, фторэтан), смесевые технические растворители красок, лаков, эмалей.

Вторая группа — **«нелетучие» соединения**. В этой группе выделяется подгруппа веществ, изолируемых из биожидкостей экстракций или сорбцией. Это могут быть **вещества кислого характера** (барбитураты, снотворные небарбитурового ряда, каннабиноиды); **вещества нейтрального характера** (хлоралгидрат, хлорбутанолгидрат, карбромал, бромизовал); **вещества амфотерного и слабоосновного характера** (производные бенздиазепина, триоксазин и др.); **вещества основного характера** (алкалоиды, синтетические лекарственные вещества).

Другой подгруппой в этой группе являются **соединения тяжелых металлов**, для изолирования которых необходимо разрушение (окисление, минерализация) органических веществ, составляющих биологический объект исследования.

### **ПОДХОДЫ В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

Химико-токсикологический анализ (ХТА) представляет собой совокупность научно обоснованных методов, применяемых для выделения, обнаружения и количественного определения токсических веществ. В ХТА широко применяются реакции и методы аналитической химии, фармацевтического и фармакогностического анализа.

Для выделения токсикантов из биологического материала применяются методы экстракции и реэкстракции, сорбции, тонкослойной хроматографии.

Для обнаружения ядовитых и сильнодействующих веществ, в том числе наркотических веществ, остаются актуальными классические реакции качественного макроанализа. От качественных реакций, применяемых в ХТА, требуется высокая чувствительность и специфичность. Для целей токсикологической химии применимы также микрохимические методы, в частности, одна из его разновидностей — чувствительный и быстрый микрокристаллоскопический анализ. Широкое применение в ХТА находят высокоспецифичные физико-химические методы анализа; наиболее перспективны из них различные виды хроматографии, в том числе экспрессная и доступная хроматография в тонком слое сорбента, а также инструментальные виды хроматографии. Актуальным в ХТА также является биологический метод анализа — иммуноферментный.

Предварительные испытания биообъектов — это пробы, позволяющие быстро определять токсические вещества непосредственно в биологических жидкостях. В качестве предварительных проб используют чувствительные и достаточно специфичные хромогенные реакции. Необходимо помнить, что ввиду высокой чувствительности они пригодны как для обнаружения токсических, так и терапевтических доз принятых лекарств.

Результаты предварительных проб важны для правильного составления плана дальнейшего проведения химико-токсикологического исследования. Так, при отрицательном результате предварительных проб на соответствующие вещества их не включают в план исследования.

### **ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. МИКРОКРИСТАЛЛОСКОПИЯ**

Качественный анализ лекарственных и токсических веществ органической природы осуществляется в основном определением их функциональных групп (галоген неионогенный, меркапто-, amino-, нитрогруппы,

гидроксил и др.) и некоторых элементов структуры, что не умаляет значения специфических реакций на конкретные соединения.

**Микрокристаллоскопические реакции** — это реакции, протекающие между исследуемым веществом и реактивом с образованием характерных кристаллов, по внешнему виду которых (форма, цвет, размер) открывают искомое вещество.

Кристаллом называют твердое тело, частицы которого (атомы, ионы) расположены в определенном, периодически повторяющемся порядке, образуя кристаллическую решетку. Процесс кристаллизации осуществляется в два этапа. Вначале образуются очень мелкие центры кристаллизации, способные к дальнейшему росту. Затем происходит рост мелких кристаллов до размера 20–50 мкм за счет ионов и молекул данного вещества, находящегося в растворе.

Форма кристаллов зависит от условий их роста (температура, наличие примесей, природа растворителя и др.), а также от природы и концентрации вещества.

**Аналитическая ценность** микрокристаллоскопических реакций состоит в простоте и быстроте их выполнения, наглядности микроскопической картины и высокой чувствительности, позволяющей идентифицировать минимальные количества исследуемого вещества.

Чувствительность реакций выражают открываемым минимумом и предельным разбавлением. **Открываемым минимумом**  $m$  по Ф. Файглю называется наименьшее количество вещества, которое может быть обнаружено данным реактивом. Открываемый минимум выражается в мкг (мкг =  $10^{-6}$  г). Под **предельным разбавлением**  $C$  понимают наименьшую концентрацию вещества в растворе, определенный объем которого  $V$  еще дает положительный результат реакции. Открываемый минимум и предельное разбавление взаимно связаны следующими формулами:

$$C = V \cdot 10^6 / m; \quad m = V \cdot 10^6 / C; \quad V = C \cdot m / 10^6.$$

При проведении микрокристаллоскопических реакций большое значение имеет продолжительность времени наблюдения за реакцией. На **скорость** образования продуктов реакции оказывает влияние **ряд факторов**:

- чувствительность реакции (чем чувствительнее реакция, тем выше скорость образования кристаллов);
- концентрация исследуемого раствора (скорость образования кристаллов уменьшается с уменьшением концентрации исследуемого раствора);
- наличие примесей в растворе (как правило, с увеличением концентрации примесей уменьшается скорость кристаллизации);
- техника проведения реакции (потирание предметного стекла стеклянной палочкой на месте соединения капель растворов исследуемого вещества и реактива приводит к ускорению выделения кристаллов).

Как правило, за реакцией необходимо наблюдать в течение 30–40 мин (до подсыхания капли), а при работе с извлечениями из биологического материала животного или растительного происхождения в ряде случаев наблюдение продлевают до 12–48 ч, поместив для этого объект во влажную камеру.

Контрольный опыт снижает возможность ошибки при выполнении микрокристаллоскопических реакций.

К недостаткам метода микрокристаллоскопии следует отнести низкую специфичность реакций из-за ограниченного числа форм кристаллов; сложность с воспроизведением ввиду влияния большого числа факторов на процесс кристаллизации; отсутствие научно обоснованной номенклатуры форм кристаллов.

### **ВОПРОСЫ**

1. Какие группы ядов выделяются в соответствии с их химической классификацией?
2. Какие достоинства и недостатки имеет метод микрокристаллоскопии в ХТА?

## **ХРОМАТОГРАФИЯ**

### **ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ**

В 1903 году в издании «Труды Варшавского общества естествоиспытателей» была опубликована работа ученого М. С. Цвета «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу». Это открытие дало начало развитию нового аналитического метода — хроматография.

Хроматографией называется процесс разделения смесей веществ, основанный на количественных различиях в поведении разделяемых компонентов при их непрерывном перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, другая имеет постоянное направление движения.

В настоящее время хроматография — это обширная область науки, охватывающая разнообразные хроматографические методы. Основными направлениями ее практического применения являются:

- разделение сложной смеси на ее компоненты;
- получение информации о качественном и количественном содержании разделяемой смеси;
- получение информации о физико-химических свойствах компонентов;
- препаративное выделение отдельных компонентов смеси;
- очистка веществ.

Особенностью хроматографии как аналитического метода является то, что сначала смесь разделяется на отдельные компоненты, а затем сигнал от каждого компонента регистрируется. Метод настолько надежен, что вещество можно считать однородным, если не удастся разделить его хроматографически.

По механизму, лежащему в основе разделения, различают адсорбционную (идущую за счет физической адсорбции), распределительную (идущую за счет растворения), ионообменную (идущую за счет ионного обмена) и другие виды хроматографии.

В основе адсорбционной хроматографии лежит непрерывный обмен хроматографируемым веществом между твердой неподвижной (сорбент) и подвижной (жидкость, газ) фазами, обусловленный существованием на поверхности раздела фаз динамического равновесия между процессами адсорбции и десорбции хроматографируемого вещества, растворенного в подвижной фазе (газо-адсорбционная, жидкостно-адсорбционная виды хроматографии).

В основе распределительной хроматографии лежит процесс непрерывного перераспределения хроматографируемых веществ между двумя фазами (подвижной и неподвижной), причем эти вещества растворимы в каждой из фаз (газо-жидкостная, жидкость-жидкостная, тонкослойная виды хроматографии).

Для эффективного разделения при любой хроматографии решающее значение имеет подбор комбинации подвижной и неподвижной фаз.

Наряду с физическим воздействием хроматографируемое вещество подвергается действию одной или нескольких химических сил со стороны сорбента или подвижной фазы:

1. Силы ионного взаимодействия — относятся к числу наиболее эффективных и проявляются при хроматографировании на сильнокислотных или сильноосновных сорбентах, например, при хроматографировании органических оснований на силикагеле, который имеет кислотный характер. Для уменьшения воздействия ионных сил следует применять полярные растворители, молекулы которых способны экранировать ионы и обеспечить их подвижность.

2. Силы координационного взаимодействия — действуют между сорбентом, имеющим атом с вакантной орбиталью (Al, Si, Ca), и функциональной группой, являющейся донором пары электронов, например,  $O^-$ ,  $N^-$ ,  $S^-$ ,  $C=C$ ,  $NaI$ . Хроматографируемое вещество за счет координационных сил способно вытеснить молекулу растворителя, связанную с поверхностью сорбента.

3. Образование хелатного комплекса — характерно для сорбентов, имеющих при атоме металла свободную гидроксильную группу ( $Mg(OH)_2$ ,  $Al_2O_3$ ). Хелат заметно увеличивает взаимодействие между сор-

бентом и веществом. Этим объясняется тот факт, что некоторые соединения при хроматографировании на окиси алюминия имеют меньшую величину  $R_f$ , чем при проведении анализа на бумаге.

4. Водородные связи — являются наиболее действенным фактором, определяющим хроматографическое поведение веществ. Водородные связи возникают между группой, в которой есть водород, способный отщепляться в виде протона (донор водорода), и заместителем, несущим свободную пару электронов (акцептор водорода). Доноры водорода — хлороформ, дихлорэтан; акцепторы водорода — амины, алкилгидразины, нитрилы.

5. Дисперсионные (ван-дер-ваальсовы) силы — относятся к наиболее слабому виду взаимодействия; они ответственны за гидрофобные взаимодействия углеводородных частей молекулы, т. е. проявляются, главным образом, при контакте хроматографируемого вещества с растворителем.

Отдельные функциональные группы в молекуле могут участвовать одновременно в нескольких типах связи.

По способности вступать в тот или иной тип взаимодействия с хроматографируемым веществом при помощи табличных данных можно оценивать сорбенты и растворители.

Преимуществами хроматографии в ряду других физико-химических методов анализа являются хорошая чувствительность, высокая специфичность, относительно низкая стоимость реагентов, а также возможность количественного определения. К недостаткам следует отнести относительную длительность анализа, низкую обеспеченность лабораторий приборами, необходимость в высококвалифицированном персонале.

Пределы использования различных вариантов хроматографического разделения зависят от молекулярной массы анализируемых веществ (рис. 4).

$10^0$ , нм	$10^1$ , нм	$10^2$ , нм	$10^3$ , нм	$10^4$ , нм	$10^5$ , нм	$10^6$ , нм	$10^7$ , нм
Газы	Жидкости	Твердые вещества	Полимеры	Белки	Вирусы	Частицы	
газовая хроматография							
жидкостная хроматография							
лигандообменная хроматография							
ионообменная хроматография							
гелевая хроматография							
электрофорез							

Рис. 4. Область оптимального применения различных вариантов хроматографии

Абсолютная чувствительность различных видов хроматографии в сравнении с другими методами исследования, применяемыми в ХТА, представлена в табл. 1.

Таблица 1

**Чувствительность различных видов хроматографии в сравнении с другими методами исследования**

Метод анализа	Детектор	Абсолютная чувствительность, г
Газовая хроматография	Катарометр	$10^{-8}$
	Пламенно-ионизационный	$10^{-8}-10^{-9}$
ВЭЖХ	УФ	$10^{-7}$
	Флюоресцентный	$10^{-8}-10^{-9}$
ТСХ		$10^{-6}-10^{-7}$
СФМ		$10^{-6}-10^{-7}$
ФЭК		$10^{-6}-10^{-7}$
Цветные тесты		$10^{-6}$

### ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКИХ СЛОЯХ СОРБЕНТА

Среди других хроматографических методов тонкослойная хроматография (ТСХ) занимает важное место благодаря своей экспрессности, воспроизводимости, простоте исполнения и низкой стоимости анализа. Тонкий слой сорбента устойчив к агрессивным средам и нагреванию.

ТСХ имеет три аспекта применения. Самым распространенным является качественный анализ (обнаружение) веществ и их смесей. Для этой цели пригодно самое простое хроматографическое оборудование. Количественный анализ смеси веществ и препаративное выделение индивидуальных компонентов составляют две другие области применения и связаны с использованием более сложного оборудования. Ряд фирм-производителей предлагает комплектное оборудование для ТСХ («Merck», Германия; ЗАО «Сорбполимер», Россия).

Проведение ТСХ складывается из нескольких операций:

- 1) приготовление слоя сорбента;
- 2) подготовка и нанесение образца;
- 3) проведение хроматографического разделения;
- 4) проявление хроматограммы;
- 5) интерпретация результатов разделения.

**Приготовление слоя сорбента.** При хроматографировании в тонком слое применяют два основных типа пластинок: с закрепленными на подложке и незакрепленными (насыпными) слоями сорбента. В качестве подложки используются разнообразные материалы: металлическая фольга, стекло, лавсан, полимерная (полиэтилентерефталат) пленка и др.

Пластинки с закрепленным слоем сорбента готовят, заливая их суспензией мелко размолотого хроматографического материала в воде (толщина образующегося слоя 200–300 мкм) или органическом растворителе (толщина слоя 20–30 мкм). К суспензии обычно добавляют 10–20 % связующего вещества для закрепления слоя (гипс, крахмал, гель кремниевой кислоты). Пластинки с незакрепленным слоем готовят из сухого сорбента, разравнивая его по стеклянной пластинке до получения слоя одинаковой толщины (2–4 мм).

Преимущество пластинок с незакрепленным слоем сорбента состоит в том, что их можно легко и быстро приготовить при помощи простого вспомогательного оборудования. При этом предъявляются не очень высокие требования к качеству хроматографируемого материала. Применение таких пластинок часто бывает достаточным для успешного решения простых задач, например, быстрого разделения несложных смесей.

Что же касается пластинок с закрепленным слоем сорбента, то они являются неотъемлемым элементом лабораторной техники. Механическая прочность позволяет готовить их впрок или закупать пластинки заводского производства. Они не требуют особой осторожности в обращении, а главное их преимущество заключается в большей разделительной способности по сравнению с незакрепленными слоями.

**Сорбенты.** Универсальными являются полярные гидрофильные сорбенты с высокоразвитой капиллярной структурой — силикагель ( $\text{SiO}_2$ ) и окись алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), они пригодны для разделения самых различных типов соединений. Эти сорбенты доступны, недороги, обладают хорошей разделительной способностью; они удобны также тем, что можно регулировать их активность, менять рН, зернение и т. д.

Для получения частиц сорбента определенных размеров применяют специальные сита. Размер частиц (зерен) определяют по их диаметру в мкм и числу отверстий в сите. Сита, применяемые для просеивания сорбентов, должны иметь соответствующее число **меш** (число отверстий в сите на 1 линейный дюйм, равный 2,54 см). В шкале сит в качестве стандарта принято сито 200 меш с отверстиями диаметром 0,074 мм и нитью диаметром 0,056 мм. В большинстве случаев для приготовления тонкого слоя используются сорбенты, просеянные через сита, имеющие 100, 150 и 200 меш.

Для приготовления закрепленных слоев требуется сорбент с величиной зерна в пределах 5–40 мкм, при других параметрах качество разделения ухудшается.

Кроме названных сорбентов, используют также целлюлозу, силикат магния, кизельгур, полиамид, активированный уголь, тефлон и др.

Для приготовления слоя тонко размолотый материал в смеси со связующим веществом суспендируют в жидкой фазе (очищенная вода или органический растворитель) до получения гомогенной суспензии. Подобранным опытным путем количество суспензии наносят равномерным слоем на стеклянную пластинку с помощью специального устройства — аппликатора — или вручную, наклоняя пластинку попеременно в разные стороны. Пластинки с гипсом наносят не позднее 4 мин после прибавления воды («схватывание» гипса). Залитые пластинки оставляют сохнуть на строго горизонтальной поверхности при комнатной температуре. Приготовленные пластинки сохраняют в эксикаторе без доступа влаги. В слу-

чае необходимости перед хроматографированием сорбент активируют нагреванием пластинки в сушильном шкафу.

Для приготовления пластинок с незакрепленным слоем используют сорбенты с более крупным зернением (20–120 мкм). Материал перед нанесением на пластинку должен быть предварительно очищен просеиванием от механических загрязнений, мешающих получению равномерного слоя. Наиболее распространенным сорбентом для работы в незакрепленных слоях является окись алюминия, ее основной недостаток заключается в неоднородности качества из-за различий в структуре. Для улучшения воспроизводимости результата анализа при работе с  $Al_2O_3$  ее активируют (например, нагреванием в течение 4 ч при температуре 450 °С), активный сорбент следует хранить в плотно закупоренной склянке. Силикагель соответствующего зернения также пригоден для приготовления незакрепленного слоя. Сорбент разравнивают на стекле шпателем или валиком с утолщениями на концах из нержавеющей стали или стекла. При использовании таких валиков края пластинки (5–6 мм) получают свободными от сорбента.

При необходимости определения активности сорбента на его насыпном слое проводят хроматографирование стандартного набора азокрасителей.

Готовые заводские пластинки («Силуфол», «Сорбфил» и др.) на алюминиевой фольге или полимерной подложке удобны в работе (равномерно нанесен слой сорбента), однако, имеют следующие недостатки: 1) не допускается их нагревание свыше 130–150 °С; 2) сложно снимать слой сорбента при необходимости элюирования; 3) различные добавки, содержащиеся в слое, могут давать окраску с проявляющими реактивами и искажать результаты спектрофотометрического определения анализируемых веществ в элюатах.

**Нанесение образца.** На пластинке отмечают линию старта (не менее 1 см от нижнего края пластинки) легким прочерком простого мягкого карандаша, чтобы не повредить слой сорбента. Пробу — раствор исследуемого вещества в низкокипящем полярном растворителе (5 мкл с 0,1–50 мкг вещества) — наносят микрошприцем, микропипеткой или обычным капилляром (в растворе не должно быть взвешенных частиц) легким касанием сорбента не ближе, чем на 1 см от бокового края пластинки во избежание краевого эффекта. Диаметр стартового пятна должен быть 3–4 мм (у насыпных слоев — 6–8 мм). Следующую каплю раствора наносят после высыхания предыдущей (можно воспользоваться феном). Расстояние между соседними пятнами на стартовой линии должно быть не менее 1 см.

При работе с хроматографическими пластинками нельзя касаться пальцами слоя сорбента.

После нанесения пробы и раствора стандартного образца (метчик) пластинку помещают в хроматографическую камеру таким образом, чтобы слой подвижной фазы не доходил до стартовой линии на 0,5 см.

**Хроматографирование.** Разрешающая способность системы растворителей максимальна в области  $R_f = 0,5$  и уменьшается как в сторону старта, так и в сторону фронта. Поэтому для проведения хроматографического разделения данной смеси веществ пользуются такой системой растворителей, в которой зоны отдельных компонентов располагались бы симметрично и вблизи линии  $R_f = 0,5$ .

Разные растворители обладают различной способностью к элюированию веществ. На основе этого свойства некоторые авторы систематизировали растворители, составляя из них так называемые «элюотропные ряды». Например, в порядке возрастания полярности: н-гексан < гептан < циклогексан < тетрахлорметан < бензол < трихлорметан < диэтиловый эфир < этилацетат < пиридин < ацетон < этанол < метанол < вода. Однако у разных авторов они полностью не совпадают. Последовательность растворителей в элюотропном ряду справедлива для ограниченного числа случаев разделения и зависит от природы веществ, на которых она устанавливалась.

Самый простой способ получения системы с универсальной элюирующей способностью состоит в смешивании двух растворителей с разной полярностью. Система растворителей подбирается автором методики анализа опытным путем и зависит от поставленной цели исследования. При этом должно выполняться три главных требования:

1) система должна дать хорошее распределение веществ смеси по всей пластинке для наиболее важных веществ;

2) значения  $R_f$  должны быть воспроизводимы в данной системе;

3) обязательной должна быть их низкая корреляция между различными системами.

По рекомендации Международного комитета по систематическому токсикологическому анализу перед использованием приготовленной хроматографической системы в ХТА необходимо провести ее апробацию с использованием образцов сравнения.

Подвижную фазу готовят смешиванием растворителей квалификации «ХЧ» или «ЧДА» путем сильного встряхивания. Чистоту растворителей проверяют спектрофотометрически. Порядок смешивания не имеет значения, если это не оговорено специально. Системы растворителей могут быть заготовлены впрок, если они не расслаиваются и хранятся в герметично закрытой посуде в темном месте. Используются однократно.

Процесс хроматографирования проводят в любом сосуде (стеклянный, пластмассовый или стальной) возможно меньшего объема, снабженном герметичной пришлифованной крышкой. Применяются специальные хроматографические камеры, а также кюветы, эксикаторы, чашки Петри.

Систему растворителей наливают на дно камеры или в лоток (высота слоя 0,5–1 см). Необходимо работать с камерами, насыщенными парами системы растворителей, т. е. начинать элюирование после того, как весь объем камеры насытится парами растворителей. В ненасыщенных или неплотно закрытых камерах существует опасность изменения состава многокомпонентных систем и появления так называемого «краевого эффекта». В ненасыщенной камере значения  $R_f$  выше. Время насыщения камеры — 30–60 мин.

В ХТА хроматограммы элюируют по восходящему варианту. При этом нижний край пластинки должен погружаться в систему растворителей на 0,5–0,7 см. Пластинку устанавливают в камере вертикально под углом 80–85°. Насыпные слои элюируют в плоских камерах. Во время хроматографирования растворитель поднимается по пластинке и перемещает нанесенные вещества. Каждое вещество поднимается до определенной, характерной для него высоты. После достижения системой растворителей линии фронта (пробег должен составлять не менее 10 см) пластинку извлекают, отмечают линию фронта и высушивают при комнатной температуре.

Учитывая свойства разделяемых веществ (наличие в их молекулах определенных функциональных групп), активность сорбентов и элюирующую способность растворителей, выбирают оптимальные условия разделения смесей. Для хроматографирования трудноразделяемых смесей и повышения эффективности разделения используют такие приемы, как многомерная, круговая и другие виды хроматографирования.

**Обнаружение хроматограмм.** Окрашенные вещества не требуют специального обнаружения. Однако большинство веществ необходимо проявить на пластинке при окончании разделения. С этой целью пластинку опрыскивают растворами реактивов-обнаружителей или погружают в растворы реактивов, для чего используют специальные камеры заводского производства или работают в приспособленных условиях. При необходимости проявления в жестких условиях, например, минеральными кислотами, используют метод прокапывания реактивом всего пути вещества от линии старта до линии фронта. Ряд веществ, которые обладают способностью флюоресцировать, обнаруживают без применения химических реагентов наблюдением в УФ-свете (обводят пятно карандашом).

При обнаружении незакрепленных слоев опрыскиванием необходимо соблюдать осторожность, чтобы не сдуть слой сорбента. Для этого опрыскивание производят с большего расстояния, чтобы обнаруживающий реагент оседал на хроматограмму под действием силы тяжести в виде тонкого тумана. Целесообразно опрыскивать незакрепленные слои еще влажными, т. е. сразу после хроматографирования.

**Обработка результатов.** Подвижность отдельных веществ в данной системе характеризуется величиной  $R_f$  (rate fraction — скорость фракции),

представляющей собой отношение длины пробега вещества к длине пробега растворителя. Таким образом, величина  $R_f$  изменяется в пределах от 0 до 1. Она не является константой (т. к. стандартные условия создать невозможно), а является величиной эффективности разделения данной хроматографической системы. Это важная качественная величина. Величину  $R_f$  измеряют с помощью линейки с последующими вычислениями. При наличии большого числа пятен удобнее пользоваться специальными шаблонами — резиновыми, металлическими или из плексиглаза.

На воспроизводимость величины  $R_f$  влияет целый ряд факторов. К ним относятся прежде всего система растворителей, форма и степень насыщения хроматографической камеры, активность хроматографических слоев, относительная влажность, длина пробега фронта растворителя, значение pH сорбента и системы растворителей, толщина слоя и зернение сорбента, количество нанесенного образца и т. д. В меньшей мере сказывается температура.

Значения  $R_f$  лишь ориентировочны. Более точную информацию дают относительные величины  $R_s$ , т. е. величины  $R_f$ , отнесенные к  $R_f$  стандартного соединения (чаще аминазина). Величина  $R_s$  при идентификации вещества имеет большее значение. В литературе часто применяют и величину  $hR_f$ , т. е.  $R_f \cdot 100$ .

При проведении количественного ТСХ-определения содержание вещества в пятне на хроматограмме определяют при помощи денситометра или спектрофотометрически после элюирования.

Хранить хроматограммы невозможно вследствие неустойчивости окраски пятен и малой механической прочности хроматографического слоя после обработки реагентами. При необходимости сохранения используют либо способ репродукции фотографированием или ксерокопированием хроматограмм, либо один из сложных способов консервации (снятие сорбционного слоя с помощью липкой ленты с последующим нагреванием, фиксированием раствором коллодия и др.).

**ТСХ-скрининг.** За ТСХ закрепилась репутация метода, идеального для скрининга лекарственных, наркотических и других психоактивных веществ в токсикологическом анализе. Скрининг используется при ненаправленном анализе, т. е. анализе на неизвестное вещество, что чаще всего используется в ХТА.

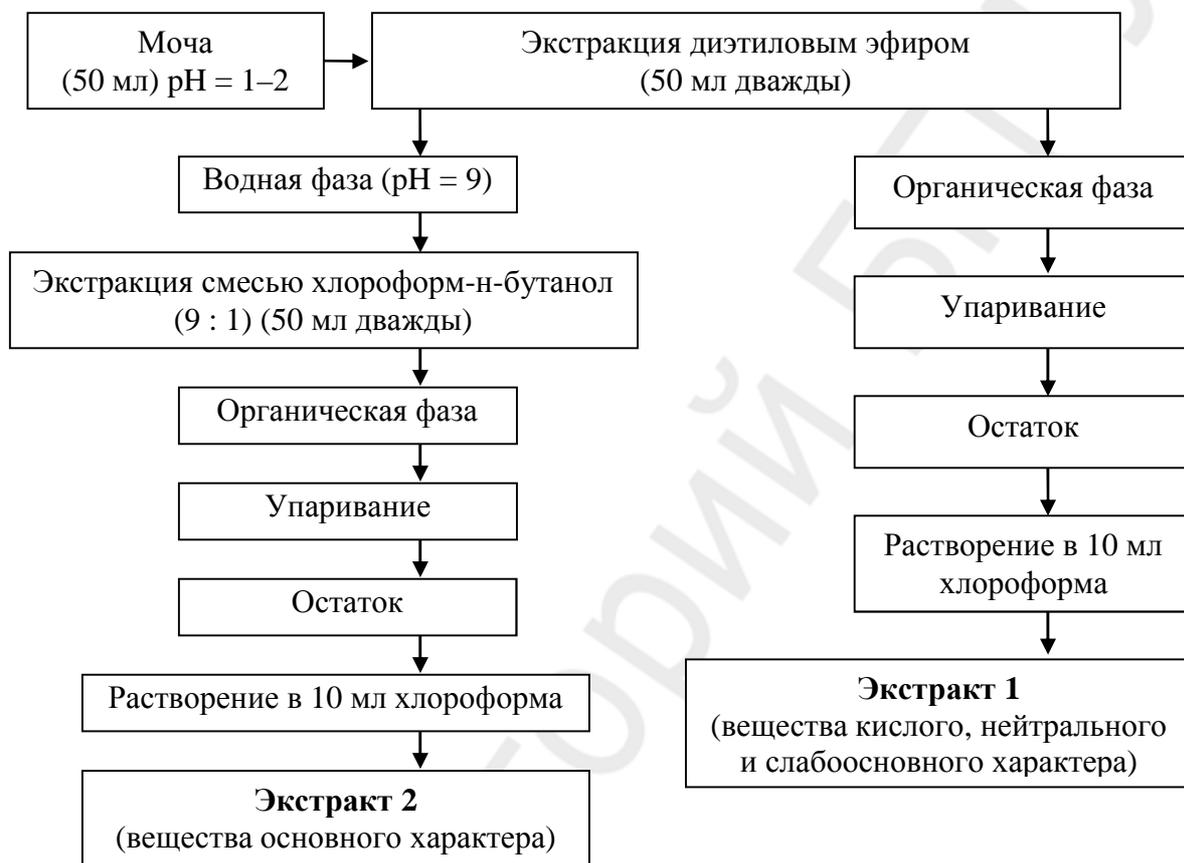
Схема ТСХ-скрининга полярных веществ:

1. Предварительное исследование биожидкостей на наличие отдельных препаратов или групп препаратов:

– FPN-тест на производные фенотиазина. Тест неспецифичен и имеет отрицательное токсикологическое значение: при отрицательном результате пробы дальнейшее исследование на производные фенотиазина не производится;

- тест на присутствие эфедрона и эфедрина (также имеет отрицательное токсикологическое значение);
- проба на метаболиты фенаcetина;
- проба на наличие салициловой кислоты и ее производных;
- проба на производные пиразолона-5.

2. Изолирование лекарственных и других соединений (жидкость-жидкостная экстракция)



**Вещества кислого, нейтрального и слабоосновного характера**



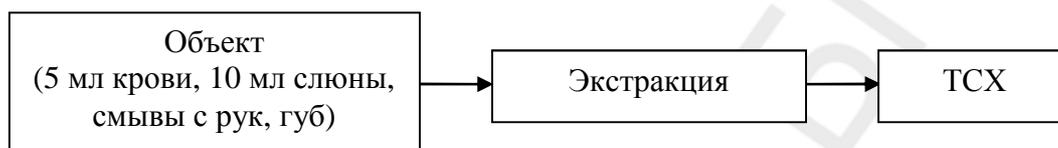
1а — производные 1,4-бензодиазепина (гидролиз и обнаружение по аминобензофенонам); 1б — производные барбитуровой кислоты; 1в — производные салициловой кислоты; 1г — используется по необходимости.

**Вещества основного характера**



Распределение аликвот (пример): 2а — производные 1,4-бензодиазепина (объединенное с 1а); 2б, 2в — вещества основного характера (Сорбфил-пластинки); 2г — вещества основного характера (ВЭТСХ-пластинки).

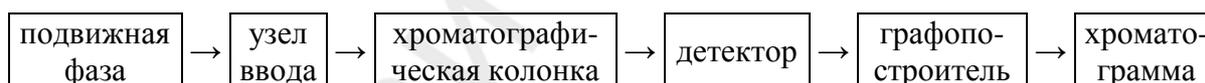
#### Обнаружение основных компонентов гашиша (каннабиноиды)



3. При необходимости подтверждения природы вещества, т. е. более точного установления его структуры, необходимо обратиться к частным методикам.

### ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматография — наука, изучающая поведение зоны вещества в потоке одной фазы, движущейся относительно другой. Если в эту схему включить узел ввода пробы, детектор и графопостроитель, получится принципиальная схема хроматографа — прибора, позволяющего получать качественные и количественные характеристики хроматографического разделения:



Для классификации хроматографических методов по применяемым фазам выбирают термин, характеризующий доминирующий эффект (газовая хроматография, жидкостная хроматография и др.). В газовой хроматографии различают газо-адсорбционную и газо-жидкостную хроматографию, в жидкостной — жидкостно-адсорбционную и жидкостно-жидкостную. При этом первое слово характеризует подвижную фазу, а второе — неподвижную. Жидкая неподвижная фаза закреплена на твердом носителе.

Область практического применения газовой хроматографии — соединения с молекулярной массой до 500 Да, которые составляют около 5 % от общего числа всех известных соединений. Область практического применения жидкостной хроматографии — соединения с большей молекулярной массой, составляющие оставшиеся 95 % известных веществ. Однако 5 % объектов газовой хроматографии составляют 70–80 % соеди-

нений, которые сегодня использует человек. Поэтому развитие жидкостной не теснит позиций газовой хроматографии, а только расширяет область применения хроматографии в целом, включая в качестве изучаемых объектов все более сложные системы.

Метод газовой хроматографии применяется для анализа летучих веществ или веществ, которые могут быть переведены в летучее состояние с помощью специальных приемов. Анализируемые вещества (например, смесь метилового, этилового и пропилового спиртов) вводятся в поток газа-носителя и в парообразном состоянии проходят через колонку с сорбентом, многократно перераспределяясь между подвижной и неподвижной фазами. Разделенные вещества элюируются из колонки, регистрируются детектором и фиксируются на хроматограмме в виде пиков (одному веществу соответствует один пик). Полученная хроматограмма — основа для качественного и количественного анализа смеси веществ (рис. 5).

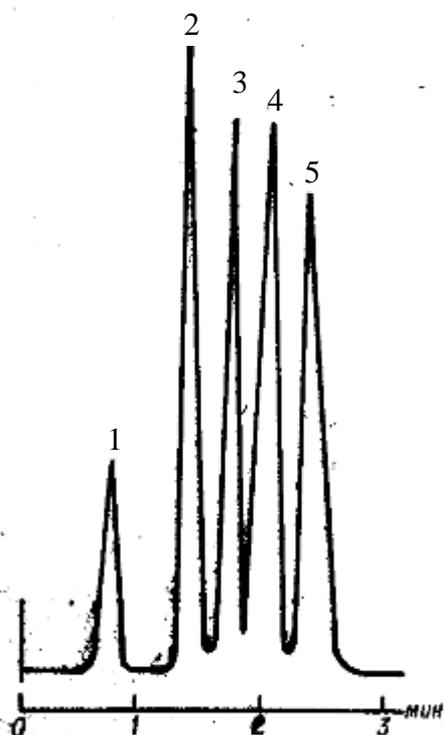


Рис. 5. Хроматограмма разделения смеси метилового, этилового и пропилового спиртов в виде алкилнитритов:

1 — окислы азота; 2 — метилнитрит; 3 — этилнитрит; 4 — изопропилнитрит (внутренний стандарт); 5 — пропилнитрит

Оптимизация экспериментальных параметров в хроматографии основывается на следующих главных требованиях лабораторного и производственного анализа:

- 1) все анализируемые вещества должны быть удовлетворительно разделены, чтобы был возможен их количественный анализ;
- 2) продолжительность анализа должна быть минимальной;

3) срок службы колонки должен быть относительно продолжительным, чтобы анализы можно было проводить без существенного изменения результатов в течение по крайней мере месяцев, предпочтительно лет.

**Функция хроматографической колонки.** Функция хроматографической колонки при реализации любого метода заключается в разделении сложной по составу анализируемой смеси на входе в колонку на последовательно выходящие из колонки бинарные смеси, состоящие из одного из разделяемых компонентов и используемой подвижной фазы.

Хроматографическая колонка представляет собой трубку определенной длины и диаметра, равномерно заполненную твердым пористым материалом с подходящим размером зерен, который и представляет собой неподвижную фазу или ее носитель. Такие колонки называют **насадочными**. В колонках иного типа неподвижная фаза равномерно нанесена на внутренние стенки капилляра — **капиллярные колонки**.

В газожидкостной хроматографии процесс разделения определяется в основном равновесием между процессами растворения и испарения разделяемых веществ, в газоадсорбционной же он связан с равновесием между адсорбцией и десорбцией.

Основные требования к адсорбентам и носителям в газовой хроматографии:

- инертность;
- удельная поверхность 0,5–2 м<sup>2</sup>/г;
- размер частиц от 0,1 до 0,5 мм, предпочтительна правильная сферическая форма;
- размеры пор от  $0,5 \cdot 10^{-3}$  до  $1,5 \cdot 10^{-3}$  мм;
- достаточная термическая стабильность и механическая прочность.

Немногие материалы удовлетворяют указанным требованиям. Наибольшее распространение получили различные сорта **диатомитов**. Диатомит — аморфное вещество, представляющее собой обломки панцирей микроскопических диатомовых водорослей. Диатомовая горная порода (обнаружена в Европе, Северной Америке, Африке) состоит в основном из кремнезема, содержащего 20–60 % физически связанной воды. Ее используют после обработки, включающей промывание, прокаливание, измельчение и просеивание. Диатомиты содержат неорганические загрязнения (Al, Fe, Mg) и обладают определенной кислотностью за счет групп -SiOH. Для снижения активности их модифицируют обработкой кислотой, щелочью, силанизирующими агентами (например, триметилхлорсилан), покрывающими поверхность алкилсилильными группами. Диатомиты рядом фирм выпускаются под названиями кизельгур, хромосорб, целит, газохром и др.

Другие материалы, которые используются в качестве адсорбентов и носителей, — это боросиликатное стекло и фторуглеродные полимеры.

Стеклянные микрошарики из *боросиликатного стекла* имеют правильную форму зерен и поры заданного размера, благодаря чему колонки с ними дают воспроизводимый результат. Однако широкому применению таких носителей (фирменные названия — зипакс, перисорб, ликвахром) препятствует низкая допустимая загрузка пробой (оптимальное соотношение —  $10^{-6}$  г пробы на 1 г насадки в колонке).

Фторуглеродный полимер *политетрафторэтилен* (коммерческие названия тефлон, флюоропак) — важнейший из числа органических носителей. Его можно использовать в газовой хроматографии при температуре до 200 °С. При более высокой температуре форма частиц меняется и материал разлагается. Основное преимущество политетрафторэтилена — чрезвычайно низкая химическая активность. На нем можно исследовать спирты, хлорфенолы, амины, жирные кислоты и некоторые другие вещества. Органическими носителями являются также полимеры на основе дивинилбензола (коммерческое название порапак) и 2,6-дифениленоксида (коммерческое название тенакс).

Хорошей эффективности разделения в ГЖХ можно достигнуть, если поверхность носителя покрыта равномерной пленкой неподвижной жидкой фазы, которая не вступает в необратимые реакции ни с газом-носителем, ни с компонентами хроматографируемой смеси, и которая работает в широком диапазоне температур (от 20 до 400 °С). Таким требованиям удовлетворяют полиэтиленгликоли, некоторые углеводороды, метилсиликоновые масла, фторорганические соединения.

В основе классификации неподвижных жидких фаз лежит их полярность. Чем больше полярность жидкой фазы, тем больше удерживание полярного растворенного вещества (это табличные величины). Среди **неполярных фаз** наиболее распространенными являются Апиезоны L, M, N; OV-1; OV-101; SE-30. Апиезон-L — углеводород, используемый в анализе барбитуратов, спиртов, углеводородов, алкалоидов и других азотсодержащих соединений. OV-1, OV-101 и SE-30 — полимеры диметилсилана, используемые преимущественно в капиллярных колонках. Распространенными **полярными фазами** являются Карбовакс-20М (полиэтиленгликоль с молекулярной массой 20 000), применяемый для разделения алкалоидов и других оснований, OV-17 (фенилметилсилан) и др.

Количество неподвижной жидкой фазы в колонке обычно определяют как массу растворителя на 100 г носителя (чаще 5–10 % от его массы). Толщина пленки может колебаться от сотен ангстрем до доли монослоя. В зависимости от ситуации можно модифицировать свойства адсорбента или свойства неподвижного растворителя. Чем толще пленка жидкой фазы, тем больше время удерживания, тем медленнее массопередача и тем больше степень разделения.

**Насадочные хроматографические колонки** представляют собой трубки из полностью инертных по отношению к компонентам анализируемой смеси материалов: нержавеющей стали, стекла, никеля, меди, латуни, кварца или политетрафторэтилена. Выбор материала зависит от характера разделяемых соединений.

Металлические колонки устойчивее, они имеют более высокую теплопроводность и легче обрабатываются механически, чем стекло и кварц. Колонки из боросиликатного стекла имеют максимально близкую к нейтральной поверхность. Недостатком стеклянных колонок является их хрупкость, причем, если трубка разбилась в термостате, а в качестве газаносителя применялся водород, то следует опасаться взрыва образующегося гремучего газа. Металлические колонки с внутренним стеклянным покрытием сочетают достоинства металлических и стеклянных колонок: они достаточно прочны, а поверхность их инертна. Никелевые колонки почти так же инертны, как стеклянные. Колонки из политетрафторэтилена считаются вполне инертными и в них можно проводить хроматографирование многих высокореакционноспособных соединений, правда, если не определяются микроколичества этих соединений.

В термостате колонки U- и O-образной формы устанавливаются вертикально. Для длинных колонок наиболее компактной является спиральная форма; для того, чтобы эффективность на такой колонке была достаточно высокой, необходимо, чтобы отношение диаметра спирали к диаметру трубки было больше, чем отношение диаметра трубки к размеру зерен носителя.

Для колонок с высокой эффективностью разделения достаточно длины 1–3 м. Для разделения «простых» смесей с сильно различающимися температурами кипения компонентов пользуются и более короткими колонками от 0,3 до 1 м. Разделение смесей с большим числом компонентов, имеющих близкие температуры кипения, следует проводить на более длинных колонках, т. к. при этом улучшается разрешение. Однако при большой длине такое разрешение не всегда пропорционально, т. к. одновременно уменьшаются скорость газаносителя и давление. Таким образом, применение колонок длиной более 10 м нецелесообразно: удлинение колонки увеличивает длительность анализа.

Внутренний диаметр насадочных колонок находится в пределах от 1 до 8 мм. Рекомендуется следующая длина колонки в зависимости от температуры кипения основного компонента анализируемой смеси при диаметре 4 мм: 0–50 °С — 4 м; 50–100 °С — 2 м; 100–200 °С — 1 м; > 200 °С — 0,5 м.

При хроматографировании соединений с сильно различающимися температурами кипения используют хроматографическую систему из двух и более независимых колонок, соединенных между собой опреде-

ленным образом. Эти колонки содержат различные неподвижные жидкие фазы или имеют различную температуру.

**Капиллярные колонки** используют для обеспечения высокой эффективности разделения. Их изготавливают из кварцевой капиллярной трубки с обычным диаметром от 0,2 до 0,5 мм и средней длиной 50 м (могут варьировать по длине от 30 см до 1 мили). Внутренние стенки колонок покрыты жидкой фазой (WCOT-колонки) или пористым слоем сорбента, пропитанного жидкой фазой (PLOT- и SCOT-колонки). Толщина пленки иммобилизированной жидкой фазы обычно составляет 1 мкм. Список неподвижных фаз включает полиэтиленгликоль, полиметилсилоксан, полифенилметилсилоксан, полицианопропилметилсилоксан, политрифторпропилметилсилоксан. Объем вводимой пробы обычно соответствует массе от 30 до 300 нг (реже до 1 мг) на компонент.

Полые капиллярные кварцевые колонки дают при больших объемных скоростях газа-носителя более высокую степень разделения, сокращение времени анализа и большую чувствительность определения, чем при работе с насадочными колонками, одновременно сохраняя преимущество приемлемых условий ввода проб.

**Процесс ввода пробы и ее количество.** Система ввода пробы анализируемого образца состоит из испарителя и мембраны из термостойкой резины, которая прокалывается при вводе пробы.

Ввод пробы занимает небольшое время в процессе хроматографического анализа, но его влияние на результат анализа велико: избыток или недостаток вещества в пробе, слишком быстрая или слишком медленная подача пробы могут свести на нет все затраты времени и сил, потраченные на подготовку газохроматографической системы.

К процессу ввода пробы независимо от того, в каком состоянии находятся исследуемые вещества — газообразном, жидком или твердом, простые это вещества или сложные смеси, — предъявляется ряд требований:

- а) проба в виде газа или испаренной жидкости должна занимать на входе колонки по возможности минимальный объем в потоке газа-носителя;
- б) количество вносимого вещества и процесс его ввода в колонку должны быть воспроизводимыми с большой степенью точности;
- в) при вводе в колонку вещество должно испаряться без разложения;
- г) смеси должны вводиться и испаряться таким образом, чтобы их компоненты проходили в колонку в том же количественном соотношении, в каком они находились в смеси;
- д) количество вещества в пробе должно быть ниже максимальной нагрузки данной колонки.

Допустимая масса пробы зависит от многих факторов. Важнейшие из них — количество неподвижной фазы на 1 м длины колонки, коэффициенты распределения основных компонентов и их концентрация в пробе.

Ориентировочно принимается за допустимое количество для основного компонента 1–2 мг для насадочной колонки и 0,1–1 мг для капиллярной колонки. Для газов хорошая воспроизводимость обеспечивается до объема 10 мл (обычно 0,5–5 мл), а для жидкостей — до 1 мл (обычно 0,1–1 мл).

Ввод жидких проб шприцем требует применения испарителя (инжектор), который представляет собой трубку, нагреваемую независимо от температуры колонки и продуваемую потоком нагретого газа-носителя.

Для **неавтоматического ввода пробы** в инжектор применяются поршневые хроматографические шприцы; для дозирования больших объемов газа применяются медицинские инъекционные шприцы. Проба газа отбирается через иглу из сосуда для хранения с резиновой крышкой, находящегося под небольшим избыточным давлением. Следует иметь в виду, что втягивание газа через тонкую иглу требует некоторого времени — примерно 5 с.

Дозирующий шприц должен быть газонепроницаемым, что регулярно проверяется перед использованием. Поршни не смазываются из-за опасности загрязнения, а уплотняются кольцами из силиконовой резины или фторопласта. Для дозирования малых объемов используют микрошприцы, поршень которых представляет собой стальную проволоку, подогнанную к толстостенной стеклянной трубке. Во многих шприцах сменные иглы не применяются, а газонепроницаемость и отсутствие «мертвых объемов» (остаются в местах присоединения иглы к цилиндру) обеспечиваются склеиванием цилиндра с иглой. Микрошприцы поставляются фирмами «Hamilton» (США), «SGEP» (Великобритания) и др.

Твердые вещества вводят после растворения. Имеются и специальные шприцы для введения непосредственно твердого вещества со стальным поршнем, имеющим желобок для вещества в игле. Диаметр поршня 0,8 мм. Фирма-изготовитель — «Hamilton» (США).

Для **автоматических лабораторных установок** используют микрошприцы, входящие в состав сложных автоматизированных систем и проводящие заполнение, дозирование и очистку. Последовательность ввода пробы задается роторной или кассетной конструкцией на 48 проб (фирма «Hamilton»), 200 проб (фирма «Siemens») и т. д. Современные приборы фирм «Hewlett-Packard», «Shimadzu», «Varian» имеют до 20 способов дозирования (для каждой пробы своя программа ввода), управляются микропроцессором.

**Выбор газа-носителя.** Газ-носитель поступает в хроматограф из баллона через редуктор. Лучшим газом-носителем для газовой хроматографии является **водород**, т. к. этот газ имеет самую низкую вязкость и самый большой коэффициент диффузии. Для него оптимальная скорость потока больше, чем для любого другого газа. Например, было показано,

что для поллой капиллярной колонки ( $d = 0,53$  мм) оптимальные объемные скорости для азота, гелия и водорода соответственно равны 1,5; 3,2 и 4,2 мл/мин, что отражается на продолжительности анализа (в случае гелия время анализа увеличивается на 30 %, азота — в 2 раза). Однако по причинам безопасности часто предпочитают гелий.

При рутинных анализах обычно в качестве газа-носителя применяют **азот** с пламенно-ионизационным детектором и **гелий** с детектором по теплопроводности, т. к. он обеспечивает максимальную чувствительность детектора благодаря высокой теплопроводности. Гелий относительно дорог. Применяется также **аргон**.

Оптимальной объемной скоростью газа-носителя для насадочной колонки с диаметром 4 мм является 50 мл/мин.

Баллон с газом-носителем требует осторожного обращения, в рабочем состоянии он должен быть закреплен.

**Выбор температуры колонки, испарителя и детектора.** Температура колонки должна обеспечивать оптимальное разделение компонентов смеси при минимальном времени анализа.

Исследователи в области газовой хроматографии считают **золотым правилом** выбора температуры: температура должна быть на 50 °С выше, чем температура кипения основного компонента смеси или, если в пробе несколько основных компонентов, на 50 °С выше температуры кипения самого высококипящего компонента. Например, если основной компонент имеет температуру кипения 130 °С, то используется колонка при температуре 180 °С. Температура испарителя и детектора, как правило, равны температуре колонки.

Для анализа смесей с широким диапазоном температур кипения компонентов применяют газовую хроматографию с программированием температуры.

**Детекторы.** Вместе с хроматографической колонкой детектор составляет центральную часть хроматографа: на колонке осуществляется разделение компонентов смеси, детектор предоставляет аналитику информацию о результатах этого разделения.

Наиболее важными характеристиками детекторов являются:

- 1) чувствительность, которая связывает показания детектора с количеством соответствующего введенного вещества;
- 2) собственные шумы сигнала детектора, которые в сочетании с чувствительностью устанавливают предел обнаружения соответствующего вещества;
- 3) селективность детектора — выражает его относительную чувствительность для двух веществ или, возможно, для двух классов веществ;
- 4) легкость эксплуатации и надежность работы детектора, его стоимость.

Многочисленными фирмами-изготовителями в продажу поставляется ряд детекторов, в основу действия которых положены разные принципы. Имеются детекторы, отклик которых пропорционален концентрации (мг/мл) анализируемого вещества в газе-носителе (детектор по теплопроводности, детектор по плотности и ультразвуковой детектор), и детекторы, показания которых пропорциональны массовой скорости потока (г/с) анализируемого вещества через ячейку детектора (пламенно-ионизационный детектор, термоионный детектор, масс-спектрометр). Есть более сложные, нелинейные детекторы (такие как пламенно-фотометрический и УФ-абсорбционный фотометр), и детекторы, показания которых зависят от объемной скорости газа-носителя (электронзахватный детектор).

**Детектор по теплопроводности** (ДТП, или катарометр) — самый первый детектор по времени появления и применяемый в газовой хроматографии сегодня для анализа газов и органических соединений. При использовании в качестве газа-носителя водорода или гелия ДТП имеет практически одинаковую чувствительность ко всем соединениям, т. е. является универсальным. Он отличается простотой в обслуживании и несложным устройством.

Принцип действия основан на изменении теплопроводности газа-носителя в присутствии других веществ. Если резистор (чувствительный элемент — металл Fe, Vi, Pt или сплав металлов Pt-Ir, Au-Ag или керамика) нагревается током и охлаждается проходящим газовым потоком, равновесная температура зависит от состава газа. Сопротивление резистора в свою очередь зависит от его температуры. Изменения сопротивления регистрируются гальванометром.

Обслуживание заключается в периодической замене чувствительных элементов, что является не сложной операцией. Используются ДТП преимущественно с насадочными колонками.

**Пламенно-ионизационный детектор** (ПИД) — самый популярный детектор для газовой хроматографии в течение последнего времени. Он предпочтителен благодаря высокой чувствительности, линейности и надежности при детектировании органических паров; значение детектора возрастает по мере развития капиллярной газовой хроматографии.

**Принцип действия детектора.** Сжигание водорода или других газов ( $\text{NH}_3$ , CO) практически не дает ионов. Если же в микропламя, горящее между двумя электродами, внести органическое вещество, первоначальный ток резко возрастает, что объясняется появлением некоторого числа ионов. Горелка, называемая соплом, питается смесью водорода и газа-носителя (она помещена в специальный корпус). Ток, пропорциональный массовому потоку анализируемого вещества, измеряется гальванометром.

ПИД — селективный и чувствительный (до  $10^{-13}$  г/с) детектор. Шумы зависят в большей степени от чистоты используемых газов. Техническое

обслуживание является простым и ограничивается периодической очисткой сопла с помощью ультразвука и удалением пыли диоксида кремния, образуемой окислением кремнийорганических полимеров, используемых в качестве неподвижных фаз. Стоимость электроники, действующей совместно с детектором, высока. Однако ПИД нашел широкое применение, в том числе в токсикологическом анализе и для контроля технологических процессов.

**Масс-спектрометрический метод детектирования** (ГХ/МС) осуществляется с помощью спектрографов. Метод, как правило, используется для обнаружения неизвестных компонентов, присутствующих в анализируемых смесях.

В методе используется способность потока ионов в газообразном состоянии разделяться под действием магнитного поля в зависимости от их масс. Последовательно фильтруя ионы по величине массы, анализатор осуществляет сканирование всех ионов в заданном интервале масс. Ионы определенной массы, выделенные из общего ионного потока, достигают детектора (фотоумножитель, электрометр или др.) и регистрируются.

Каждое вещество дает на масс-спектрограмме ряд полос, среди которых находят наиболее интенсивные, соответствующие массовым числам, характерным для данного вещества. Таким образом, масс-спектр отражает структуру молекулы и позволяет определить формулу анализируемого соединения. В хромато-масспектрометрии данные представляются в виде масс-спектра любой точки хроматограммы и далее подвергаются обработке. Идентификация значительно облегчается использованием компьютерного поиска на основе библиотек программного обеспечения, являющихся непременной частью ГХ/МС-систем. Например, библиотека ГХ/МС-системы Hewlett-Packard включает 1600 лекарственных и токсических веществ и их метаболитов и 43 000 соединений более широкого профиля.

Метод газовой хроматографии с масс-спектральным детектированием (МСД) является высокоспецифичным, чувствительным (определение нанogramмовых количеств компонентов) и достаточно быстрым. По сравнению с другими методами надежность идентификации существенно повышается из-за использования специфической характеристики вещества, каковой является масс-спектр, в дополнение к параметрам удерживания, получаемым в хроматографическом процессе. Метод широко используется в фармацевтическом, токсикологическом и судебном анализе, в том числе для анализа наркотических и сильнодействующих веществ.

Особенностью устройства ГХ/МС-систем является наличие интерфейса, соединяющего газовый хроматограф с масс-селективным детектором. Его основная функция состоит в создании градиента давления от почти атмосферного на выходе из капиллярной колонки до высокого вакуу-

ма в МСД. Работа всей хромато-масспектральной системы обеспечивается компьютером, основные функции которого:

- настройка МСД по собственному стандарту (чаще перфтортрибутиламину);
- установка и поддержание заданного режима работы всей системы;
- первичная обработка сигналов от МСД и представление их в виде, удобном для исследователя (хроматограмма, масс-спектр);
- осуществление операций с первичной информацией: вычитание фона, сравнение масс-спектров с библиотечными, построение калибровочного графика и др.

*Ограничения метода ГХ/МС в химико-токсикологическом анализе:*

1. Задачи ХТА диктуют необходимость определения нанограммовых количеств компонентов на фоне эндогенных веществ биосубстратов, это выдвигает строгие требования к проведению стадии пробоподготовки:

- как можно более полное извлечение компонента и его метаболитов из биосубстрата. Осуществляется методами жидкость-жидкостной или твердофазной экстракции. Самым существенным недостатком жидкость-жидкостной экстракции является соэкстракция различных частиц и молекул;
- минимальное извлечение эндогенных веществ (белки, липиды);
- минимизация потери анализируемых компонентов;
- предупреждение загрязнений пробы примесями растворителя, материала посуды, пробок и др.

В связи с этим необходимы соблюдение высокого уровня техники ручных операций и особая тщательность при выполнении всех процедур.

2. Для анализа растворов концентрацией менее 10 нг/мл даже при минимальном объеме экстрагента экстракт нуждается в концентрировании, которое проводится методом упаривания досуха или приблизительно до 10 мкл под слабым током азота или очищенного воздуха. Однако даже при этих условиях многие вещества теряются. Для предупреждения потерь летучих соединений (например, амфетамины) их переводят в соли добавлением нескольких капель кислоты или используют другие методы предупреждения. Затем сухой экстракт реконструируют с помощью подходящего органического растворителя (метанол, этанол, хлороформ).

3. При анализе малолетучих и полярных соединений необходима дериватизация, при этом исключаются потери и повышается чувствительность. Функционально это процесс преобразования полярных групп (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>) в неполярные без затрагивания основной структуры молекулы (применяют следующие типы реакций: получение метиловых эфиров органических кислот, получение ацетилпроизводных по реакции с уксусным ангидридом, получение трифторацетилпроизводных и др.).

4. От качества проведения всех операций пробоподготовки в значительной мере зависят результаты ГХ/МС-анализа. Для контроля всех ста-

дий в состав серии анализируемых проб обязательно включают холостые образцы биожидкости, не содержащие исследуемые вещества, которые подвергают всем операциям аналогично исследуемой пробе. Холостая проба показывает собственный фон биожидкости, а также возможные загрязнения из растворителя и реактивов. Эти эндогенные и экзогенные соединения могут давать на хроматограмме интенсивные пики, сравнимые с анализируемыми.

5. При проведении ГХ/МС-определения с анализируемыми веществами могут происходить некоторые нежелательные процессы:

- термическое разложение в инжекторе или в колонке (декарбонирование кислот, деацетилирование героина, разложение хлордиазепоксиды и его метаболита и др.);
- адсорбция полярных соединений в инжекторе и колонке (морфина, барбитуратов и др.);
- потери вещества из-за неправильно подобранных условий.

6. Для обеспечения точности и воспроизводимости результата в аликвоту биожидкости, отобранную для анализа, вводится внутренний стандарт, позволяющий контролировать весь процесс пробоподготовки и анализа. Он подвергается всем операциям вместе с анализируемым веществом и отличается только по виду масс-спектра. В наибольшей степени этим требованиям удовлетворяют структурные аналоги, меченые стабильными изотопами, в частности, дейтерированные соединения.

Таким образом, метод ГХ/МС требует многопроцедурности и особой тщательности пробоподготовки, наличия высококвалифицированных специалистов. Сложность и дороговизна приборов ограничивает проведение метода как рутинного лабораторного анализа.

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**Качественные характеристики.** В газовой хроматографии важнейший измеряемый параметр — время, в течение которого соединение удерживается в разделительной системе, т. е. время между вводом пробы и появлением на выходе из колонки максимальной концентрации зоны соответствующего вещества, так называемое чистое **время удерживания** ( $t_R$ ). Оно зависит от многих факторов: состава стационарной фазы и газоносителя, длины колонки, ее температуры и др.

В токсикологическом анализе для получения воспроизводимых данных определяют относительное время удерживания, приведенное ко времени удерживания некоторого стандартного вещества (вещество сравнения), т. е. это отношение  $t_R$  образца к таковому вещества сравнения. Образец и вещество сравнения хроматографируются в одинаковых условиях (прибор, колонка).

Наиболее широко распространенным приемом, обеспечивающим сравнимость и воспроизводимость внутри- и межлабораторных данных по удерживанию, является использование индексов удерживания, разработанных Ковачем (1958 г.) и основанных на использовании нормальных углеводородов (н-алканов) как веществ сравнения. Система сравнивает чистое время удерживания анализируемого соединения и чистое время удерживания н-алканов, элюируемых до и после вещества, и основана на линейном отношении между логарифмом чистого времени удерживания н-алканов и количеством атомов углерода в его молекуле. Индекс удерживания ( $RI$ ) может быть получен из графика или рассчитан по формуле:

$$RI = 100 (\lg t_R - \lg t_{Rn} / \lg t_{R(n+1)} - \lg t_{Rn}) + 100n,$$

где  $n$  — число атомов углерода в нормальном парафине, выходящем из колонки до анализируемого компонента;  $n + 1$  — число атомов углерода в н-парафине, выходящем из колонки после анализируемого компонента.

Наибольшая ценность индексов удерживания состоит в их применении для идентификации неизвестных веществ путем сравнения с коллекцией банка данных  $RI$  известных веществ и их метаболитов.

Метод ГЖХ может быть использован в скрининге токсических, в том числе наркотических средств. Пробоподготовка осуществляется жидкость-жидкостной экстракцией или сорбцией. Идентификация хроматографических пиков проводится по индексам удерживания.

**Количественные характеристики.** Количественный анализ проводят с учетом измерения параметров пиков на хроматограммах. Практически используют два параметра пиков — высоту или площадь.

Основными способами количественного анализа в газовой хроматографии являются:

- метод абсолютной калибровки;
- метод внутреннего стандарта.

Метод абсолютной калибровки предполагает предварительное определение зависимости между количеством введенного вещества и высотой (или площадью) пика на хроматограмме и построение калибровочного графика. Соответственно по высоте (или площади) пика анализируемого вещества определяют его количество по графику.

Метод внутреннего стандарта основан на сравнении параметра пика анализируемого вещества с тем же параметром вещества сравнения, введенного в пробу в известном количестве и пик которого хорошо разделяется с исследуемыми компонентами. Рассчитывают количество определяемого вещества по формуле:

$$C = f \cdot h_{\text{иссл.}} / h_{\text{станд.}},$$

где  $f$  — поправочный коэффициент, характеризующий чувствительность детектора.

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является вариантом колоночной жидкостной хроматографии, в котором подвижная фаза (элюент) проходит через заполняющий колонку сорбент с большей скоростью за счет значительного давления на входе в хроматографическую колонку.

ВЭЖХ является удобным способом разделения, препаративного выделения и проведения количественного и качественного анализа **нелетучих термолабильных соединений** как с малой, так и с большой молекулярной массой.

Основными узлами жидкостного хроматографа являются: насос высокого давления, дозатор, высокоэффективная колонка, детектор с регистрирующим устройством. Современные жидкостные хроматографы снабжены микропроцессором и устройствами для автоматического ввода пробы, программирования хроматографического процесса, оптимизации условий разделения и расчета количественного состава анализируемой смеси, а также проведения качественного анализа.

**Насос высокого давления** (до 200–500 атм) обеспечивает подачу элюента в колонку с постоянной заданной скоростью.

**Хроматографические колонки** из нержавеющей стали строго определенной марки (во избежание коррозии) или стекла длиной 10–25 см с внутренним диаметром 0,3–0,8 см (чаще 0,4–0,5 см) заполняются адсорбентом с диаметром частиц 5–10 мкм сферической или неправильной формы с помощью суспензионного метода, что дает возможность получить более равномерную и плотную упаковку частиц сорбента в колонке. Заполнение колонки производится при больших давлениях, чем рабочее давление в хроматографе. Плотная упаковка частиц адсорбента в колонке позволяет получить высокоэффективное хроматографическое разделение компонентов анализируемой смеси.

**Температура** хроматографических колонок поддерживается с точностью до 0,1 °С в интервале, ограниченном температурами замерзания и кипения элюента. Чаще всего разделение проводят в интервале температуры от 20 до 50 °С.

В качестве **детекторов** в ВЭЖХ используют:

- спектрофотометрический с переменной (190–900 нм) или фиксированной (чаще 254 нм) длиной волны;
- рефрактометрический;
- флуориметрический;
- пламенно-ионизационный;
- электрохимические (диодно-матричный и др.);
- масс-спектральный.

В качестве **адсорбентов** чаще всего применяют силикагель с гидроксильной поверхностью и силикагель с привитыми к поверхности различными функциональными группами. В ВЭЖХ используются силикагели с удельной поверхностью 300 м<sup>2</sup>/г, средним диаметром пор 10 нм и удельным объемом пор 1 мл/г. Реже используются окись алюминия и полимерные адсорбенты. На практике обычно применяют готовые заводские колонки.

При работе с колонками, заполненными силикагелем (неподвижная полярная фаза), в качестве неполярных элюентов используют алифатические углеводороды или дихлорметан с добавлением растворителей (спирты, диоксан, тетрагидрофуран и др.). Соединения, не поддающиеся разделению в таких системах, разделяют при помощи **обращенно-фазовой** хроматографии, когда неподвижная фаза неполярна, например, силикагель с привитыми гидрофобными группами (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>), а подвижная – сильнополярна (водные растворы, содержащие метанол или ацетонитрил для увеличения элюирующей способности элюента).

Степень разделения веществ в колонке определяется расстоянием между максимумами двух соседних пиков (зависит от селективности сорбента) и шириной хроматографической полосы (зависит от эффективности колонки, т. е. характера упаковки частиц сорбента, вязкости элюента и др.).

Время выхода компонента из колонки (время удерживания) в постоянных условиях разделения постоянно и является качественной характеристикой данного компонента, а высота (или площадь) пика пропорциональна количеству данного компонента в пробе и используется в количественном анализе. Количественную оценку хроматограммы проводят с использованием метода абсолютной калибровки или метода внутреннего стандарта.

### **ВОПРОСЫ**

1. Какова абсолютная чувствительность различных видов хроматографии?
2. Из каких операций складывается проведение ТСХ-анализа?
3. Какие ксенобиотики можно определять методом ГЖХ, а какие методом ВЭЖХ?

## **ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

### **ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.**

#### **РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Иммунология развивается как комплексная медико-биологическая дисциплина. Одновременно ряд направлений исследований получил выраженный прикладной характер и сформировался в самостоятельные

направления. Одной из таких ветвей иммунологии является иммунохимический анализ, использующий иммунологические принципы для обнаружения и количественного определения различных веществ.

Генетически чужеродные вещества, попадая в организм высшего животного и человека, способны вызывать в них ряд специфических процессов, направленных на их удаление из организма. К важнейшим из них следует отнести образование специфических белков крови — антител (иммуноглобулинов).

Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, в том числе биосинтез антител, получили название антигенов (от лат. *anti* — против и *genos* — род). К антигенам относятся белки, полисахариды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты как в чистом виде, так и в виде компонентов различных биологических структур (вирусы, клетки, ткани).

На поверхности молекулы сложного антигена можно выявить функциональные группы или фрагменты молекулы, обуславливающие антигенную специфичность и называемые антигенными детерминантами или эпитопами. Низкомолекулярные вещества, не способные вызывать образование антител, но после конъюгирования с высокомолекулярными носителями приобретающие иммуногенные свойства, называются гаптенами. К гаптенам относится широкий круг природных и синтетических соединений: пептидные и стероидные гормоны, олигосахариды, лекарственные и наркотические вещества, пестициды и т. д.

Биологическая функция антител заключается в защите организма от чужеродных веществ путем образования прочных специфичных иммунных комплексов с соответствующими антигенами и последующего удаления их из организма. Способность антител обратимо и количественно образовывать такие комплексы (состав 1 : 1), а также возможность получения антител в необходимых количествах являются основой иммунохимических методов анализа.

Индикация образовавшегося комплекса антиген–антитело может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку, которая детектируется высокочувствительным физико-химическим методом. Удобными для этой цели оказались изотопные, ферментные, флюоресцентные метки. Так как процесс комплексообразования пары анализируемое соединение (антиген) – специфическое антитело происходит в строго количественном соотношении, то экспериментально устанавливаемая концентрация метки, входящей в состав образующегося иммунохимического комплекса, однозначно связана с исходной концентрацией антигена.

Для осуществления такого анализа необходимо провести эффективное разделение комплексов от свободных компонентов реакционной смеси.

Эту задачу удалось решить путем иммобилизации на твердом носителе одного из компонентов пары антиген–антитело с сохранением их способности к специфическому образованию иммунных комплексов. Разработка на этом принципе твердофазных методов дала мощный импульс для развития новых подходов в иммунохимическом анализе, что позволило широко применять меченые реагенты для определения биологически активных соединений самой разнообразной структуры — от низкомолекулярных гормонов до высокомолекулярных вирусов и целых клеток.

В конце 50-х гг. XX в. наибольшее развитие среди иммунохимических методов получил **радиоиммунологический анализ (РИА)**, когда Р. Йалоу и С. Берсон разработали метод определения инсулина в плазме человека с использованием инсулина, меченого радиоактивным изотопом йода. Предложенный метод основан на конкуренции между немеченым инсулином плазмы и  $I^{131}$ -инсулином за постоянное и ограниченное число специфических мест связывания на антителах к инсулину. Количество меченого инсулина, связавшегося с антителами, обратно пропорционально количеству инсулина в образце плазмы. Благодаря возможности легко измерять метку (изотоп I) в очень малых концентрациях, удалось достигнуть высокой чувствительности анализа (на уровне пкг/мл;  $1 \text{ пкг} = 10^{-12} \text{ г}$ ).

Метод значительно ускорил важные открытия в области биомедицинских наук и превратился в стандартный инструмент лабораторных исследований в медицине. За разработку метода его авторы в 1977 году были удостоены Нобелевской премии. Быстрое и широкое признание РИА в качестве рутинного клинического метода объясняется:

- 1) его универсальностью: РИА позволяет определять любое соединение, против которого получены специфические антитела;
- 2) специфичностью;
- 3) чувствительностью определения радиоактивных изотопов-меток;
- 4) простотой проведения анализа и интерпретации результатов.

Наряду с достоинствами РИА имеет определенные недостатки: 1) ограниченный срок жизни радиоактивной метки, что вызывает необходимость постоянной замены реактивов; 2) относительно дорогое и громоздкое специальное оборудование для регистрации радиоактивности; 3) возможность радиоактивного заражения окружающей среды и обслуживающего персонала при осуществлении большого количества анализов. Именно эти трудности послужили исходным моментом для поиска методов, альтернативных РИА, но сохраняющих его высокую чувствительность, специфичность и экспрессность.

### **ГОМОГЕННЫЙ И ГЕТЕРОГЕННЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ**

Двенадцать лет спустя в 1971 году Энгвал и Пэлман ввели в употребление другой тип чувствительных и еще более универсальных меток для

иммуноанализа — ферменты. Принцип **иммуноферментного анализа** базируется на иммунной реакции антитела (Ат) с антигеном (Аг), когда, присоединяя к антигену ферментную метку, определяют результаты реакции Аг–Ат, фиксируя появление или изменение уровня ферментативной активности. Являясь по своей природе мощными химическими катализаторами, ферменты способны эффективно осуществлять наработку легко детектируемого продукта, что делает возможным определение ферментной метки в весьма малых концентрациях (до  $10^{-12}$  М). Иммуноферментный анализ, предложенный Энгвалом и Пэлманом, его авторы сокращенно назвали **ELISA** (от англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), что означает фермент зависимый иммуносорбционный анализ.

Как и в случае РИА, в ELISA сначала отделяют меченые и немеченые антигены, связавшиеся с антителами, от свободных антигенов (так называемая промывка) и только потом измеряют активность метки в одной из двух фракций. Такие методы относят к иммуноанализу с разделением компонентов или **гетерогенному иммуноферментному анализу**. Эти методы используют для определения широкого круга низко- и высокомолекулярных соединений, в том числе лекарств, наркотиков, пестицидов.

Особую значимость для широкого внедрения твердофазного гетерогенного ИФА в практику имела разработка в качестве носителей для сорбционной иммобилизации антител или антигенов специальных полистирольных плат с 96 лунками. Это позволило значительно увеличить число проводимых анализов и упростить методическую процедуру их выполнения. Позднее были сконструированы специальные приборы, позволяющие автоматизировать стадии добавления реагентов, промывки и регистрации каталитической активности фермента-метки.

В 1972 году К. Рубенштейн с сотрудниками в исследованиях с морфином разработали новый подход, заключающийся в проведении всего анализа без разделения и без использования твердой фазы. Метод получил название **гомогенного ИФА** и основан на учете различий каталитических свойств ферментной метки в свободном виде и в иммунохимическом комплексе. При этом специфическая реакция взаимодействия антигена с антителом и определение глубины ее протекания осуществляются в гомогенном растворе. Метод получил название **ЕМІТ-анализа** (от англ. Enzyme Multiplied Immunoassay Technique).

Отсутствие стадии разделения привело к сокращению времени проведения анализа до нескольких минут. Это исключительно важное обстоятельство позволило разработать диагностические иммуноферментные тест-системы экспресс определения биологически активных соединений, нашедшие широкое применение в токсикологической химии, фармакологии, эндокринологии. Большим преимуществом метода ЕМІТ-анализа является возможность использования малых объемов анализируемого об-

разца (5–50 мкл) и отсутствие стадии его предварительной обработки (пробоподготовки).

Одна из важных задач, решаемых в настоящее время в ИФА, — это поиск подходов, позволяющих значительно сократить время проведения исследования при сохранении высокой чувствительности гетерогенного анализа.

Метод ИФА находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой — углубляются и совершенствуются методы самого анализа. Упрощается схема анализа, сокращается время его проведения и расход реагентов. Идет постоянный поиск новых ферментов-маркеров. Все большее влияние на ИФА оказывают химия высокомолекулярных соединений, клеточная и генная инженерия, под влиянием которых меняются технологии получения реагентов для ИФА. В частности, широкие возможности открывает использование моноклональных антител, что позволяет идентифицировать соединения самого широкого круга.

**Биосинтез антител.** Иммунная система, ответственная за биосинтез антител, состоит из ряда органов, основными из которых являются тимус (вилочковая железа), селезенка и периферические лимфоидные структуры, в которых формируются три основных типа клеток: Т- и В-лимфоциты и макрофаги.

Антитела вырабатываются В-лимфоцитами, на поверхности которых имеются рецепторы, специфически связывающие антиген. В этот комплекс включаются Т-лимфоциты и макрофаги. В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, и большая их часть синтезирует антитела, аналогичные по специфичности рецепторам на поверхности В-лимфоцита, и секретирует их в кровь. Другая часть превращается в клетки «иммунологической памяти», способные выделять антитела при повторном введении антигена.

Каждый В-лимфоцит содержит на поверхности около 100 тыс. рецепторов одинаковой специфичности. Антиген, встречаясь в кровотоке с комплементарным рецептором, проводит отбор соответствующего В-лимфоцита, который затем, трансформируясь в плазматическую клетку и многократно делясь, образует клон клеток. Каждый клон плазматических клеток секретирует гомогенные по своей структуре антитела. Однако так как антиген активирует в крови сразу несколько типов В-лимфоцитов, которые содержат рецепторы различной степени специфичности к антигену, такой иммунный ответ называют поликлональным, а антитела — **поликлональными**. Сыворотку животного, содержащую специфические к данному антигену антитела, называют антисывороткой. При этом указывают, против какого антигена она выработана. Например, когда говорят об антисыворотке кроликов против эритроцитов человека, подразумевают, что

в ответ на введение в кровь кролика эритроцитов человека образуются специфические к ним антитела. Важным является то, что поликлональные антитела даже против одной антигенной детерминанты могут быть гетерогенны как по структуре активного центра, так и по физико-химическим свойствам. В том случае, если антиген поливалентен, например, белок, то в сыворотке крови образуются антитела, направленные против каждой индивидуальной детерминанты, что еще больше усложняет состав антител. Состав антител зависит также от вида животного, а также стадии иммунного процесса. Все перечисленные факторы обуславливают определенные трудности в изучении структуры антител и получении воспроизводимых стандартных препаратов антисывороток.

Получение препаратов антисывороток — процесс сложный, длительный и дорогостоящий. Сначала проводят иммунизацию животных (морские свинки, кролики, мыши, быки и др.), для чего иммуноген вводят в организм животного разными способами: внутривенно, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, прямо в лимфатические узлы, реже в подушечки лап или конъюнктиву глаза. В состав вводимого раствора входят адьюванты — соединения, которые при введении в организм вызывают неспецифическое усиление иммунного ответа и таким образом повышают способность организма реагировать на иммуноген. Адьювантными свойствами обладают масла, липосомы, клетки бактерий, некоторые полимеры и др.

Для получения антисывороток с титром, удовлетворительным для проведения ИФА, часто требуется 4–5-кратное повторение циклов иммунизации. Отбор крови каждый раз проводится на 7–9-й день после последней инъекции. Кровь у животных отбирают из вены уха (кролик) в объеме 50–70 мл или непосредственно из сердца (морская свинка) в объеме 5–10 мл.

Кровь, лишенная клеточных элементов, называется плазмой, а плазма, лишенная сгустка фибрина, сывороткой. Сыворотка крови иммунизированных животных называется антисывороткой. Нативную иммунную сыворотку можно хранить 3–6 месяцев при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  или в лиофилизированном (сухом) состоянии в ампулах под вакуумом 1–2 года.

Далее проводят выделение антител из определенной фракции иммунной сыворотки и их очистку (осаждение, иммуносорбция, аффинная хроматография и другими методами). И на последней стадии — тестирование антисыворотки путем установления титра — эффективной величины, характеризующей связывающую способность антител. Таким образом, высокая стоимость антисывороток обуславливает высокую стоимость всего комплекта реактивов для ИФА.

Принципиально новый путь получения антител открыли работы Г. Келера и Ц. Мильштейна, начатые в 1975 году по гибридизации живот-

ных клеток. При этом из организма иммунизированного животного выделяются лимфоциты, которые «сливаются» (гибридизируются) с миеломными клетками с образованием клеток-гибридом. Их особенностью является способность размножаться и продуцировать антитела в искусственных условиях вне организма. В настоящее время ведутся работы по выделению с помощью методов клонирования одной гибридной клетки, которая, размножаясь, будет секретировать в неограниченных количествах антитела только одного вида — **моноклональные антитела**, гомогенные (идентичные) как по специфичности, так и по физико-химическим свойствам. Большинство гибридом достаточно стабильно, если их реклонировать 1–2 раза в год. Процесс получения гибридом трудоемок и дорог, но после получения крупномасштабное их производство стоит дешево и затраты быстро окупаются. Это путь значительного удешевления реактивов и еще большего внедрения ИФА в практику лабораторий.

Выше сказано, что антитела в организме выполняют две основные функции. Первая — распознавание и специфическое связывание антигенов; вторая — эффекторная, заключающаяся в индукции важнейших физиологических процессов, направленных на уничтожение антигена.

Имуноглобулины по своей химической структуре — это гликопротеины, относящиеся к сложным белкам, содержащим углеводный компонент.

Белковая часть всех иммуноглобулинов представляет собой четыре полипептидные цепи: две легкие с молекулярной массой 2300 каждая (L-цепи, light — легкий) и две тяжелые с молекулярной массой по 5300 (H-цепи, heavy — тяжелый). Структура иммуноглобулинов различных классов обусловлена количеством таких четырехцепочечных элементов, а также числом и расположением S-S-связей в молекулах. Установлено, что все легкие и тяжелые цепи имеют одну принципиальную структурную особенность: они состоят из двух частей — вариабельной и константной. Вариабельные участки L-цепей в положениях 30, 50 и 95, называемые гипервариабельными, принимают непосредственное участие в связывании антигена (антигенсвязывающие центры антител).

Выше сказано, что понятие антигенная детерминанта включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. В молекулах белков антигенная детерминанта образуется совокупностью аминокислотных остатков количеством от 5 до 20. Термин «специфичность антигена» используется в двух смыслах: во-первых, как способность избирательно реагировать со специфическими антителами, во-вторых, поскольку белковые антигены поливалентны, как набор определенных антигенных детерминант. Если два антигена имеют только часть одинаковых антигенных детерминант, их называют перекрестно реагирующими антигенами (например, белок аль-

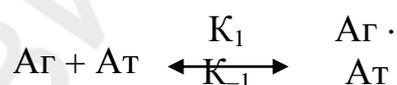
бумин близкородственных видов животных). Наличие перекрестных реакций определяемого вещества с другими характеризуется значением относительной реактивности. Относительная реактивность — это отношение чувствительности определения данного соединения к чувствительности определения другого соединения в тех же условиях.

Антигенные детерминанты могут быть представлены полисахаридами (антигены, входящие в структуру стенок микроорганизмов или, например, эритроцитов). Структура полисахаридных антигенных детерминант представляет собой олигосахаридные цепи длиной 4–6 остатков, специфичность которых определяется химическим составом, типом гликозидных связей и остатками в ближайшем окружении.

Как сказано выше, гаптены сами не вызывают иммунного ответа, но, будучи конъюгированы с носителями (молекулы белков), стимулируют синтез против них антител. Это самые разнообразные органические вещества с молекулярной массой  $>100$ : низкомолекулярные (лекарственные и наркотические вещества, пестициды, различные аллергены) и высокомолекулярные (нуклеиновые кислоты, полипептиды). На антигенную специфичность сильное влияние оказывают аминокислотный остаток белка-носителя, к которому «пришит» гаптен, а также структура и молекулярные размеры гаптена.

Знание структуры и специфичности гаптенов важно для дальнейшей разработки методов ИФА различных физиологически активных соединений, т. к. многие из них претерпевают в организме биохимические превращения с образованием близкородственных метаболитов.

Бимолекулярная реакция образования комплекса антиген–антитело является обратимой и описывается теми же кинетическими и термодинамическими параметрами, что и любой процесс комплексообразования. В простейшем случае реакция может быть представлена схемой:



Равновесная константа связывания образовавшегося комплекса определяется отношением константы скорости ассоциации к константе скорости диссоциации:  $K = K_1/K_{-1}$ , т. е. знание кинетических констант скоростей ассоциации и диссоциации позволяет рассчитать время, необходимое для достижения системой равновесия.

В иммуноферментном анализе введение ферментной метки осуществляется путем ковалентного связывания молекулы фермента с молекулой антигена или антитела. В активном центре фермента, образованном сближенными и определенным образом ориентированными в пространстве участками полипептидной цепи белка, происходит связывание субстрата и его химическое превращение. Реакция должна проводиться та-

ким образом, чтобы модификация фермента не вызывала его инактивации.

На скорость ферментативной реакции оказывают влияние различные факторы, основные из них: температура, рН и природа буфера, субстраты, ингибиторы.

**Методы определения ферментативной активности.** В ИФА наибольшее распространение получил фотометрический метод регистрации активности ферментов. В качестве субстратов ферментов используют такие вещества, продукты превращения которых являются окрашенными соединениями, или, наоборот, окраска самих субстратов изменяется в процессе реакции. Окрашенные соединения поглощают видимый свет, т. е. электромагнитное излучение с  $\lambda = 400\text{--}700$  нм. Если поглощение света подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера, то оптическая плотность раствора в определенном диапазоне прямо пропорциональна концентрации вещества:

$$D = \varepsilon \cdot l \cdot c = \lg \frac{I_0}{I}$$

В последнее время в иммуноферментном анализе получили распространение субстраты, которые образуют продукты, регистрируемые флуориметрическим методом. Молекула такого соединения при поглощении фотона переходит из основного электронного состояния в возбужденное.

Возвращение электрона на основной уровень сопровождается выделением кванта света, который носит название флуоресценции. Интенсивность флуоресценции ( $F$ ) пропорциональна количеству света, адсорбированного образцом, что описывается уравнением:

$$F = 2,3 \cdot \varepsilon \cdot I_0 \varphi \cdot l \cdot c.$$

Таким образом, интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества  $c$  и абсолютному значению начальной интенсивности света, адсорбированного образцом  $I_0$ , в то время как в фотометрии сравниваются относительные интенсивности  $I$  и  $I_0$ . Этот факт позволяет на 1–2 порядка повысить чувствительность определения вещества в растворе флуориметрическим методом по сравнению с фотометрическим.

В качестве детектирующих систем в ИФА нашли также применение ферментативные реакции, энергия которых реализуется в виде светового излучения — реакции био- и хемилюминесценции. Такие реакции катализируются люциферазами светляков и бактерий. Интенсивность свечения реакционной системы регистрируется при этом люцинометром.

В последние годы распространение получают электрохимические способы определения активности ферментов-меток. Такие датчики позволяют проводить определение в мутных средах.

К выбору ферментных меток в ИФА предъявляется ряд общих требований:

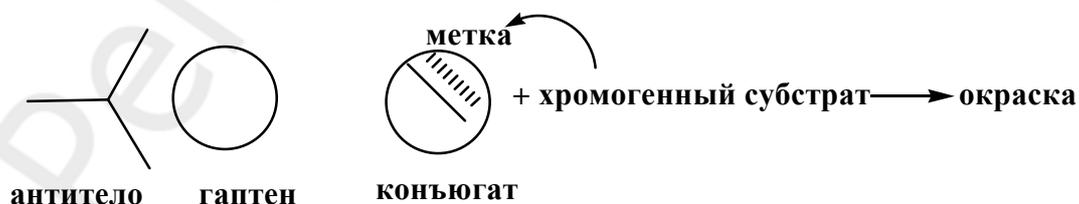
- высокая специфичность и каталитическая активность, позволяющая обнаруживать метку в низких концентрациях;
- доступность и возможность несложной очистки;
- стабильность в оптимальных условиях взаимодействия антигена с антителом;
- простота и чувствительность метода детекции.

Все методы ИФА можно отнести к двум различным категориям — гетерогенным и гомогенным. В гетерогенных методах фермент играет роль обычного маркера антигенов и антител, в то время как в гомогенных методах фермент выступает как составная часть иммунохимической реакгентной системы и должен обладать рядом специфических свойств.

В гетерогенном методе в качестве метки используются следующие ферменты: пероксидаза,  $\beta$ -галактозидаза, алколин-фосфатаза, реже ацетилхолинэстераза, глюкоамилаза и глюкозооксидаза; в гомогенном — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа.

**Гомогенный ИФА.** В гомогенном ИФА все компоненты реакции — антисыворотки (антитела), определяемое вещество (гаптен), меченое определяемое вещество (конъюгат), хромогенный субстрат — находятся в растворе. На первой стадии анализа в реакционной среде присутствуют одновременно аликвота анализируемой пробы, конъюгат и антитело. Вследствие обратимости реакции антитело–антиген гаптен и конъюгат (меченый гаптен) конкурируют между собой за ограниченное число мест связывания антитела. При этом меченый антиген, связанный с антителом, теряет способность давать окраску вследствие потери активности фермента за счет пространственных затруднений.

На второй стадии анализа к реакционной среде добавляется хромогенный субстрат, который под действием фермента-метки превращается в окрашенное соединение. Окраска регистрируется одним из методов, описанных выше. В этом случае окраска анализируемого раствора будет прямо пропорциональна концентрации не вступившего в связь с антителом меченого гаптена, т. е. прямо пропорциональна концентрации конкурента, например, наркотика, находящегося в биопробе:



Гомогенный ИФА экспрессен, время проведения анализа занимает 1–30 мин. Предел обнаружения составляет  $10^{-4}$ – $10^{-6}$  г/мл. Метод исполь-

зуются при скрининге большого количества образцов для предварительного полуколичественного установления их состава (например, факта употребления психотропных веществ).

В Беларуси для проведения гомогенного ИФА используются диагностикумы и оборудование американских фирм «Siva» (ФЭК) и «Abbott» (поляризационная флуориметрия) и российского НИИ биологического приборостроения АФП-2 (анализатор флуоресцентный поляризационный).

**Гетерогенный ИФА.** В гетерогенном ИФА антитело иммобилизуется на твердом носителе (полистирольные планшеты, пробирки, бусы). После проведения инкубации реакционной смеси и связывания гаптен (меченого и немеченого) с антителом непрореагировавшие реагенты удаляются из реакционной смеси (отмывка). Добавленный после этого хромогенный субстрат взаимодействует с ферментом-меткой, связанным с антигеном, и образует соответствующую окраску. Если концентрация определяемого вещества значительно превышает концентрацию меченого гаптана, то после удаления последнего из реакционной смеси хромогенный субстрат не будет образовывать окраски (положительный ответ):



Гетерогенные методы характеризуются высокой чувствительностью ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  г/мл), но более длительным временем проведения анализа (от 2 до 4 часов). На рынке Республики Беларусь для проведения гетерогенного ИФА можно приобрести российские диагностикумы (Институт физиологически активных веществ РАН) в виде планшетов.

Преимуществами метода ИФА являются объективность результатов, хорошая чувствительность, полуколичественная или количественная оценка результатов (в зависимости от прибора), простота и быстрота выполнения, возможность определения в биосредах (отсутствие стадии пробоподготовки). К недостаткам метода можно отнести возможность получения ложноположительного результата из-за перекрестно реагирующих веществ, то, что метод является групповым, т. е. не различает индивидуальных соединений внутри группы, а также высокую стоимость реактивов.

Для уменьшения вероятности получения ложноположительных результатов ИФА используют в комбинации с соответствующими масс-спектральными и хроматографическими подтверждающими методами. Для методов ИФА разработаны варианты количественного определения со спектрофотометрическим прочтением.

Разработка методов ИФА интенсивно идет и в направлении использования ферментов, включенных в липосомы, для целенаправленной доставки метки.

### **ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Перспективным вариантом иммуноанализа является иммунохроматографический анализ (ИХА). В ИХА совмещены высокая специфичность и точность иммуноанализа с экспрессностью и простотой выполнения исследования с помощью индикаторных полосок (тест-полоски, стрип-тесты), что дает возможность осуществлять экспресс-диагностику в «полевых» условиях (вне лаборатории: в приемных покоях, отделениях милиции, на дому). Выполнение анализа чрезвычайно просто: исследователю необходимо погрузить индикаторную бумажную полоску в анализируемый раствор (биожидкость) на заданное время и затем оценить результат реакции визуально.

В тест-зоне полоски нанесены искусственные антигены (аналогичные анализируемым веществам). Антитела к ним, связанные с красителем, также нанесены на полоску у линии ее погружения в исследуемый образец биожидкости. При погружении тест-полоски в биожидкость происходит ее миграция по принципу ТСХ. Вместе с биожидкостью движутся антитела. Если в биожидкости отсутствует исследуемый антиген, то антитела доходят до искусственных антигенов, связываются с ними, и в тест-зоне появляется окрашивание. Если исследуемый антиген присутствует в биожидкости, он связывает антитела и окрашивания в тест-зоне не наблюдается. Отсутствие или появление окрашивания в тест-зоне говорит о положительном или отрицательном результате анализа соответственно.

В настоящее время выпускаются как стрип-тесты на отдельные группы лекарственных и наркотических веществ, так и мульти-тесты на несколько групп одновременно. Предел обнаружения для опиатов, метадона, кокаина, бензодиазепинов, барбитуратов составляет 300 нг/мл, каннабиноидов — 50 нг/мл, метамфетамина — 500 нг/мл, амфетамина — 1 мкг/мл. Недостатком этого метода, как и других иммунохимических методов, является кросс-реактивность.

ИХА находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, а с другой — углубляются и совершенствуются методики самого анализа, упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов, идет постоянный поиск веществ, используемых в качестве маркёров.

### **ВОПРОСЫ**

1. Каковы достоинства и недостатки радиоиммунологического и иммуноферментного методов при их использовании в ХТА?

2. В чем суть иммунохроматографического метода анализа? Позволяет ли этот метод проводить исследования биожидкостей на наличие токсинов вне лабораторий?

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Беликов, В. Г.* Фармацевтическая химия : учеб. / В. Г. Беликов. М. : Медпресс-информ, 2007. 624 с.
2. *Борисевич, С. Н.* Методы лабораторной диагностики острых отравлений : учеб.-метод. пособие / С. Н. Борисевич. Минск : БГМУ, 2010. 64 с.
3. *ТСХ-скрининг* токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией : учеб. пособие / Г. В. Раменская [и др.] ; под ред. А. П. Арзамасцева. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 240 с.
4. *Токсикологическая химия* : учеб. для вузов / под ред. Т. В. Плетеновой. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. 512 с.
5. *Государственная Фармакопея СССР*. 11-е изд. М. : Медицина, 1987. Т. 1. 334 с.
6. *Теория и практика иммуноферментного анализа* / А. М. Егоров [и др.]. М. : Высш. шк., 1991. 398 с.
7. *Еремин, С. К.* Анализ наркотических средств / С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. М. : Мысль, 1993. 272 с.
8. *Шаршунова, М.* Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии : в 2 ч. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. М. : Мир, 1980. 621 с.
9. *Clark, E. G. C.* Isolation and identification of drugs in body fluids and postmortem material : in 2 v. / E. G. C. Clark. London : The Pharm. Press, 1986.

## ТЕСТЫ

**1. Соединение, имеющее наименьший период полувыведения ( $T_{1/2}$ ):**

- 1) аминазин;
- 2) фенобарбитал;
- 3) кодеин;
- 4) новокаинамид;
- 5) героин.

**2. Наиболее токсичным для человека из перечисленных веществ является:**

- 1) этанол;
- 2) пропанол-2;
- 3) пропанол-1;
- 4) бутанол-1;
- 5) 2-метилбутанол-1.

**3. Алкалоиды кофеин, пахикараин, папаверин:**

- 1) содержат нитрогруппу;
- 2) содержат третичную аминогруппу;
- 3) содержат галоген;
- 4) могут быть обнаружены пробой Бельштейна;
- 5) обнаруживаются с помощью реактива Бушарда–Вагнера.

**4. Фенольный гидроксил в морфине, норадреналине, резорцине можно обнаружить:**

- 1) пробой Бельштейна;
- 2) с помощью общеалкалоидных реактивов;
- 3) после проведения минерализации;
- 4) по реакции комплексообразования с  $FeCl_3$ ;
- 5) реакцией Фудживара.

**5. Универсальным методом анализа органических препаратов (хлорофос, хлорамин, индометацин) по галогену является:**

- 1) облучение УФ-светом;
- 2) проба Бельштейна;
- 3) реакция с реактивом Драгендорфа;
- 4) метод Кьельдаля;
- 5) все вышеперечисленное.

**6. Формальдегид и глюкоза:**

- 1) содержат третичную аминогруппу;
- 2) содержат альдегидную группу;
- 3) обнаруживаются с помощью реактива Троммера;
- 4) могут быть обнаружены пробой Бельштейна;
- 5) могут быть обнаружены с помощью реактива Бушарда–Вагнера.

**7. Кодеин метаболизируется:**

- 1) до морфина;
- 2) морфинглюкуронида;
- 3) дионина;
- 4) меконовой кислоты;
- 5) глюкуронида кодеина.

**8. Морфин метаболизирует:**

- 1) до морфинглюкуронида;
- 2) норморфина;
- 3) дионина;
- 4) фенантролина;
- 5) никотина.

**9. Амфетамин метаболизирует:**

- 1) до норэфедрина;
- 2) кодеина;
- 3) фенилацетона;
- 4) меконовой кислоты;
- 5) эфедрона.

**10. Главные пути метаболизма каннабиноидов:**

- 1) гидроксирование алифатической группы;
- 2) окисление до кислот;
- 3) конъюгирование с глюкуроновой кислотой;
- 4) дезаминирование;
- 5) образование сульфоксидов.

**11. Количественное определение этилового спирта при химико-токсикологическом исследовании проводят методом:**

- 1) ГЖХ;
- 2) комплексонометрии;
- 3) гравиметрии;
- 4) ВЭЖХ;
- 5) УФ-спектрофотометрии.

**12. Фенобарбитал:**

- 1) экстрагируется хлороформом из растворов при pH = 9;
- 2) не может быть обнаружен методом микрокристаллоскопии;
- 3) может быть обнаружен методом микрокристаллоскопии;
- 4) обнаруживается реакцией Фудживара;
- 5) обнаруживается облучением УФ-светом.

**13. Реактив Драгендрофа — это:**

- 1) раствор йода в иодиде калия;
- 2) раствор  $K_4[Fe(CN)_6]$ ;
- 3) раствор  $KBiI_4$ ;
- 4) раствор  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;
- 5) раствор  $NH_4[Cr(CNS)_4(NH_3)]$ .

**14. ЛД<sub>50</sub> выражается:**

- 1) в мг/г;      2) г/мл;      3) мг/кг;      4) мг/см;      5) мкг/л.

**15. Ксенобиотиками являются:**

- 1) амидопирин;  
2) карбофос;  
3) ацетилхолин;  
4) фенилаланин;  
5) цистеин.

**16. Предварительные пробы на наличие аминазина в биожидкостях проводят:**

- 1) с реактивом FPN;  
2) конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  
3) раствором хлорида натрия;  
4) резорцином;  
5) пиридином свежеперегнанным.

**17. Реакция Фудживара характерна:**

- 1) для хлороформа;  
2) хлоралгидрата;  
3) карбофоса;  
4) дихлорэтана;  
5) ацетона.

**18. Формула K<sub>2</sub>[HgI<sub>4</sub>] соответствует реактиву:**

- 1) Майера;  
2) Марме;  
3) Драгендорфа;  
4) Зонненштейна;  
5) Марки.

**19. Раствор хлорида железа (III) является реактивом:**

- 1) на кодеин;  
2) анальгин;  
3) амидопирин;  
4) антипирин;  
5) героин.

**20. Правильно следующее утверждение:**

- 1) экгонин — метаболит морфина;  
2) экгонин экстрагируется хлороформом из кислой среды;  
3) экгонин не образует соль в кислой среде;  
4) экгонин — метаболит кокаина;  
5) экгонин экстрагируется из щелочной среды.

**21. Правильны следующие утверждения:**

- 1) метадон — алкалоид опия;
- 2) метадон выделяется из организма в виде метаболитов;
- 3) метадон выделяется из организма в свободном виде;
- 4) эфедрон — метаболит метадона;
- 5) ЭДДП (этилендиметилдифенилпирролидин) — метаболит метадона.

**22. Правильны следующие утверждения:**

- 1) новокаин содержит фенольный гидроксил и дает реакцию с  $\text{FeCl}_3$ ;
- 2) для новокаина характерна реакция diazotирования;
- 3) новокаин экстрагируется хлороформом из кислой среды;
- 4) новокаин экстрагируется хлороформом из щелочной среды;
- 5) новокаин обнаруживается реакцией с FPN.

**23. Метод газовой хроматографии применяется:**

- 1) для анализа летучих веществ;
- 2) анализа веществ, которые могут быть переведены в летучее состояние;
- 3) количественного определения этанола;
- 4) анализа полярных нелетучих веществ;
- 5) нет верного ответа.

**24. С реактивом FPN проводят предварительное исследование:**

- 1) на алкалоиды группы тропана;
- 2) барбитураты;
- 3) производные фенотиазина;
- 4) кофеин;
- 5) хлороформ.

**25. Морфин по системе ТСХ-скрининга:**

- 1) находится в зоне веществ основного характера;
- 2) находится в зоне вещества кислотного характера;
- 3) элюируют хлороформом;
- 4) обнаруживается реактивом Марки;
- 5) не проявляется дифенилкарбазидом.

**26. При газохроматографическом определении спиртов пики алкилнитритов располагаются в следующей последовательности:**

- 1) этилнитрит – метилнитрит – пропилнитрит;
- 2) метилнитрит – пропилнитрит – этилнитрит;
- 3) метилнитрит – этилнитрит – пропилнитрит;
- 4) этилнитрит – пропилнитрит – метилнитрит;
- 5) этилнитрит – пропилнитрит – бутилнитрит.

**27. К методам концентрирования определяемых органических компонентов в сточных водах относятся:**

- 1) минерализация;
- 2) экстракция;
- 3) сорбция;
- 4) хроматографирование;
- 5) возгонка.

**28. Метаболитами формальдегида являются:**

- 1) метановая кислота;
- 2) метаналь;
- 3) метанол;
- 4) оксид углерода (II);
- 5) норморфин.

**29. Из кислой среды хлороформом экстрагируются:**

- 1) атропин;
- 2) этаминал-натрий;
- 3) барбитал;
- 4) ацетилсалициловая кислота;
- 5) кодеин.

**30. Преимуществами иммуноферментных методов являются:**

- 1) высокая чувствительность;
- 2) экспрессность;
- 3) возможность выполнения в «полевых условиях»;
- 4) доступность реактивов;
- 5) высокая специфичность.

**Ответы:**

**1 — 5; 2 — 5; 3 — 2, 5; 4 — 4; 5 — 2; 6 — 2, 3; 7 — 1, 2, 5; 8 — 1, 2;  
9 — 1, 3; 10 — 1, 2, 3; 11 — 1; 12 — 3; 13 — 3; 14 — 3; 15 — 1, 2; 16 — 1;  
17 — 1, 2, 4; 18 — 1; 19 — 2, 3, 4; 20 — 4; 21 — 2, 3, 5; 22 — 2, 4;  
23 — 1, 2, 3; 24 — 3; 25 — 1, 4, 5; 26 — 3, 5; 27 — 2, 3, 4; 28 — 1, 3;  
29 — 2, 3, 4; 30 — 1, 2, 3.**

УТВЕРЖДЕНО  
Постановлением  
Министерства здравоохранения  
Республики Беларусь  
09.08.2011 № 81

## ИНСТРУКЦИЯ

о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

### ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция определяет порядок отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ (далее — наркотических средств и иных веществ) у физического лица, в отношении которого ведется административный процесс, подозреваемого, обвиняемого, потерпевшего (далее — физическое лицо), а также у пациента, которому оказывается медицинская помощь.

2. Для целей настоящей Инструкции под термином «биологические образцы» понимаются образцы жидкостей и (или) тканей организма, отобранные у физического лица или пациента, которому оказывается медицинская помощь, для проведения лабораторного исследования для определения в них концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств и иных веществ.

### ГЛАВА 2 ОТБОР БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

3. Отбор биологических образцов осуществляется в государственных организациях здравоохранения медицинским работником при проведении освидетельствования физического лица, при оказании медицинской помощи пациенту.

4. Отбор биологического образца (кровь, слюна, моча) для лабораторного исследования производится медицинской сестрой (фельдшером, помощником врача) при необходимости в присутствии врача-специалиста или иного медицинского работника, проводящего освидетельствование, или врача-специалиста, осуществляющего оказание медицинской помощи.

5. При проведении освидетельствования физического лица в организации здравоохранения не допускается вмешательство иных лиц.

6. При оказании медицинской помощи в государственных организациях здравоохранения лабораторное исследование биологических образцов производится в случаях:

- дорожно-транспортных происшествий, аварий и несчастных случаев на производстве;

- травм, отравлений, заболеваний и других состояний, сопровождающихся бессознательным или тяжелым состоянием пациента;

- совершения преступлений против жизни и здоровья, а также преступлений против половой неприкосновенности и половой свободы.

7. Решение о виде отбираемых биологических образцов в каждом конкретном случае принимает врач-специалист.

8. При подозрении в употреблении алкоголя отбираются кровь или слюна, а при необходимости — моча, при подозрении в употреблении наркотических средств и иных веществ — моча и кровь.

9. Сведения об отбираемых биологических образцах фиксируются в журнале регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов по форме согласно приложению 1.

Указанный журнал должен быть пронумерован, прошнурован, скреплен печатью и подписью руководителя государственной организации здравоохранения. Заполненный журнал хранится в течение 5 лет.

10. Перед отбором у физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь) крови для определения концентрации абсолютного этилового спирта кожа в месте проведения пункции предварительно обрабатывается одним из следующих растворов: риванолом 1 : 500, фурациллином 1 : 5000, 1%-ным рокалом, 1%-ным аятином. Дезинфекция кожи спиртом, эфиром, настойкой йода и другими жидкостями, содержащими этиловый спирт, не допускается.

В чистый сухой стеклянный флакон помещают 2–3 капли гепарина и встряхиванием флакона смачивают его стенки. Кровь в количестве не менее 10 мл с соблюдением асептических условий отбирают пункцией кубитальной или другой доступной вены и помещают в подготовленный флакон. Содержимое флакона тщательно встряхивают, затем флакон опечатывается и оформляется в порядке, предусмотренном пунктом 13 настоящей Инструкции.

Перед отбором у физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь) крови для определения наличия наркотических средств и иных веществ кожа в месте проведения пункции обрабатывается в соответствии с частью первой настоящего пункта. В чистый сухой стеклянный флакон помещают 4–5 капель гепарина и встряхиванием флакона смачивают его стенки. Кровь в количестве не менее 20 мл с соблюдением асептических условий отбирают пункцией кубитальной или другой доступной вены и помещают в подготовленный флакон. Содержимое флакона тщательно встряхивают, затем флакон опечатывается и оформляется в порядке, предусмотренном пунктом 13 настоящей Инструкции.

11. Для проведения лабораторного исследования мочи (слюны) с целью определения концентрации абсолютного этилового спирта у физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь) отбирается моча в количестве не менее 10 мл, слюна в количестве не менее 5 мл и помещается в чистый сухой стеклянный флакон, который опечатывается и оформляется в порядке, предусмотренном пунктом 13 настоящей Инструкции.

12. Для определения наличия наркотических средств и иных веществ у физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь) отбирается моча в количестве не менее 100 мл, которая разделяется на 2 порции. Первая из этих порций в количестве до 5 мл используется для установления наличия наркотических средств и иных веществ (при помощи экспресс-тестов), оставшаяся часть мочи — для подтверждения наличия наркотических средств и иных веществ при лабораторном исследовании.

Для проведения лабораторных исследований с целью определения наличия наркотических средств и иных веществ, моча, отобранная у физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь), помещается в чистый сухой стеклянный флакон без консервантов, который опечатывается и оформляется в порядке, предусмотренном пунктом 13 настоящей Инструкции. При отборе мочи медицинский работник обязан принять меры для предотвращения возможности замены физическим лицом (пациентом, которому оказывается медицинская помощь) ее проб.

13. После отбора биологического образца флакон плотно закупоривается пробкой. На пробку накладывается листок полиэтиленовой пленки размером 6×6 см, а затем листок белой бумаги таких же размеров, снаружи которых вокруг горловины флакона туго на узел завязывается нить.

Концы нити спускаются вдоль флакона на 1 см ниже его дна. Поверх нитей на боковую поверхность флакона прочно наклеивается листок белой бумаги с оттиском личной печати врача-специалиста или подписью иного медицинского работника, проводящего освидетельствование или врача-специалиста, осуществляющего оказание медицинской помощи, и

штампом государственной организации здравоохранения (далее — этикетка) прочно приклеивается, в этикетке указываются:

- вид биологического образца;
- фамилия и инициалы физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь), у которого отобран биологический образец;
- порядковый номер биологического образца, зарегистрированного в журнале регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов по форме согласно приложению 1;
- дата забора биологического образца;
- фамилия и инициалы, подпись врача-специалиста или иного медицинского работника, проводящего освидетельствование, или врача-специалиста, осуществляющего оказание медицинской помощи.

### ГЛАВА 3

#### ХРАНЕНИЕ И ДОСТАВКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ НА ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

14. Биологические образцы, если иное не предусмотрено частью второй настоящего пункта, до передачи их на лабораторное исследование должны храниться в холодильнике не более пяти календарных суток с соблюдением условий, гарантирующих их сохранность (при температуре не выше +4 °С), доступ к которому разрешен только ответственному медицинскому работнику, назначенному руководителем государственной организации здравоохранения (далее — ответственный медицинский работник).

15. Передача биологического образца по смене ответственным медицинским работником должна фиксироваться в журнале хранения и передачи биологических образцов по форме согласно приложению 2 настоящей Инструкции. Журнал хранения и передачи биологических образцов должен быть пронумерован, прошнурован, скреплен печатью и заверен подписью руководителя государственной организации здравоохранения.

16. Для лабораторного исследования биологические образцы доставляются с письменным направлением государственной организации здравоохранения, в котором указываются:

- название государственной организации здравоохранения, направившей биологический образец;
- фамилия, собственное имя, отчество и год рождения физического лица (пациента, которому оказывается медицинская помощь), у которого произведен отбор биологического образца;
- порядковый номер биологического образца (в соответствии с журналом регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов);
- вид биологического образца;

- объем биологического образца (в миллилитрах — кровь, моча, слюна);
- время и дата отбора биологического образца;
- цель лабораторного исследования;
- фамилия и инициалы медицинского работника, проводившего отбор биологического образца;
- фамилия, собственное имя, отчество врача-специалиста или иного медицинского работника, проводящего освидетельствование, или врача-специалиста, осуществляющего оказание медицинской помощи, его подпись и личная печать (при наличии);
- штамп государственной организации здравоохранения.

17. Доставка биологических образцов из государственных организаций здравоохранения на лабораторное исследование осуществляется в опечатанном контейнере с соблюдением температурных условий биологических образцов (при температуре не выше +4 °С) исключающем возможность механических повреждений флаконов с биологическими образцами, только нарочным работником государственной организации здравоохранения.

18. Доставка биологических образцов из государственной организации здравоохранения на лабораторное исследование должна осуществляться не позднее пяти календарных суток с момента их отбора, если иное не предусмотрено настоящей Инструкцией.

19. Биологические образцы, доставленные в лабораторию, принимаются медицинским работником лаборатории. В присутствии нарочного отмечается целостность опечатывания контейнера и доставленных на лабораторное исследование биологических образцов.

## ГЛАВА 4

### ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

20. Лабораторные исследования биологических образцов проводятся в лаборатории государственной организации здравоохранения или судебно-химической лаборатории (отделении судебно-химической лаборатории) Государственной службы медицинских судебных экспертиз (далее, если не указано иное, — лаборатория) с использованием лабораторных методов, утвержденных в установленном порядке, и направленных в установленном порядке для использования в государственные организации здравоохранения.

21. Для целей настоящей Инструкции выделяются следующие виды лабораторий государственных организаций здравоохранения:

- общеклиническая лаборатория, которая проводит лабораторное исследование для определения концентрации абсолютного этилового спирта в биологических образцах;

– лаборатория, организованная при больницах скорой медицинской помощи, которая проводит лабораторные исследования биологических образцов для определения концентрации абсолютного этилового спирта, наличия суррогатов алкоголя, наличия наркотических средств и иных веществ, являющихся источниками отравлений;

– химико-токсикологическая лаборатория, которая проводит лабораторные исследования биологических образцов для определения в них концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств и иных веществ.

23. Лаборатории располагаются в изолированных помещениях капитальных строений (зданий, сооружений), в которых обеспечивается соблюдение требований техники безопасности, санитарных норм, правил и гигиенических нормативов, а также исключается возможность доступа в лабораторию посторонних лиц.

24. Лабораторные исследования биологических образцов производятся не позднее трех календарных суток с момента их доставки в лабораторию.

25. Биологические образцы после их лабораторного исследования сохраняются в лаборатории в холодильнике (при температуре не выше +4 °С) с соблюдением условий, гарантирующих их сохранность не менее 35 суток.

## ГЛАВА 5

### ОФОРМЛЕНИЕ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

26. Результат лабораторных исследований биологических образцов для определения концентрации абсолютного этилового спирта оформляется по форме согласно приложению 3 настоящей Инструкции.

Результаты исследований биологических образцов для определения наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ оформляются по форме согласно приложению 4 настоящей Инструкции.

27. Регистрация лабораторных исследований и их результатов осуществляется в журнале регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов по форме согласно приложению 1 настоящей Инструкции. Результаты лабораторного исследования биологических образцов передаются в государственную организацию здравоохранения, направившую биологические образцы, в течение не более десяти календарных суток с момента их отбора. Журнал должен быть пронумерован, прошнурован, скреплен печатью и заверен подписью руководителя государственной организации здравоохранения.

28. В случае несогласия физического лица (пациента, которому оказывалась медицинская помощь), у которого отбирались биологические образцы, или его законного представителя с результатами лабораторного исследования, руководителем государственной организации здравоохранения, при которой организована лаборатория, принимается решение о назначении повторного лабораторного исследования биологических образцов, которое оформляется в письменном виде. Повторное лабораторное исследование по требованию физического лица (пациента, которому оказывалась медицинская помощь) проводится на возмездной основе.

В случае несогласия с результатами лабораторного исследования должностного лица может быть назначено повторное лабораторное исследование биологических образцов в других организациях здравоохранения или Государственной службе медицинских судебных экспертиз.

Регистрация результатов повторных исследований биологических образцов проводится в журнале регистрации результатов повторных исследований по форме согласно приложению 6 настоящей Инструкции.

29. В случае несогласия физического лица (пациента, которому оказывалась медицинская помощь), у которого отбирались биологические образцы, или его законного представителя с результатами повторного лабораторного исследования данные результаты могут быть обжалованы в судебном порядке.

30. Врач-специалист или иной медицинский работник, проводящий освидетельствование, несет персональную ответственность за его проведение.

Приложение 1 к Инструкции о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

Штамп государственной  
организации здравоохранения

Форма

**ЖУРНАЛ**

регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов

№ п/п	Дата и вре- мя от- бора биоло- гиче- ских образ- цов	Фамилия и ини- циалы физиче- ского лица, в от- ношении которо- го ведется адми- нистративный процесс, подозре- ваемого, обвиня- емого, потерпев- шего, пациента, которому оказы- вается медицин- ская помощь, год рождения	Фамилия и ини- циалы врача- специалиста или иного медицин- ского работника, проводящего освидетельство- вание, или врача- специалиста, осуществляющего оказание меди- цинской помощи	Наименование биологического образца, коли- чество, свой- ства, оформле- ние	Цель лабора- торного иссле- дования	Дата проведе- ния ла- боратор- ного ис- следова- ния	Фамилия и инициалы медицин- ских ра- ботников, проводив- ших лабо- раторное исследова- ние	Результаты лабора- торного исследова- ния	Дата, фами- лия и иници- алы, подпись работника государ- ственной ор- ганизации здравоохра- нения, полу- чившего ре- зультат

Приложение 2 к Инструкции о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

Штамп государственной  
организации здравоохранения

Форма

ЖУРНАЛ  
хранения и передачи биологических образцов

№ п/п	Дата и время отбора	Номер биологического образца согласно журналу регистрации результатов лабораторного исследования биологических образцов	Фамилия и инициалы медицинского работника, передавшего биологиче- ский образец	Наименование биологического образца, количество	Дата, фамилия и инициалы, подпись лица, принявшего биологический образец

Приложение 3 к Инструкции о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

Штамп государственной  
организации здравоохранения

Форма

### РЕЗУЛЬТАТЫ

лабораторного исследования биологических образцов для определения  
концентрации абсолютного этилового спирта

\_\_\_\_\_ (наименование государственной организации здравоохранения)

№ \_\_\_\_\_ результата

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ Г.  
(дата оформления результатов)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ Г.  
(дата оформления направления)

На основании результатов лабораторного исследования \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (наименование биологического образца (биологических образцов))

гражданина(ки) \_\_\_\_\_ года рождения следует, что  
(фамилия, инициалы)

абсолютный этиловый спирт обнаружен (не обнаружен)

(ненужное зачеркнуть)

в количестве: в крови \_\_\_\_\_ ‰, в моче \_\_\_\_\_ ‰, в слюне \_\_\_\_\_ ‰.

Примечание: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (дата, время лабораторного исследования)

Врач лабораторной диагностики

\_\_\_\_\_ (подпись, фамилия и инициалы)

Фельдшер-лаборант

\_\_\_\_\_ (подпись, фамилия и инициалы)

Приложение 4 к Инструкции о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

Штамп государственной  
организации здравоохранения

Форма

### РЕЗУЛЬТАТЫ

лабораторного исследования биологических образцов для определения наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

\_\_\_\_\_ (наименование государственной организации здравоохранения)

№ \_\_\_\_\_ результата

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ Г.  
(дата оформления результатов)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ Г.  
(дата оформления направления)

На основании результатов лабораторного исследования \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (наименование биологического образца (биологических образцов))

гражданина(ки) \_\_\_\_\_ года рождения следует, что  
(фамилия, инициалы)

обнаружены \_\_\_\_\_

не обнаружены \_\_\_\_\_

Примечание: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (дата, время лабораторного исследования)

Врач лабораторной диагностики

\_\_\_\_\_ (подпись, фамилия и инициалы)

Фельдшер-лаборант

\_\_\_\_\_ (подпись, фамилия и инициалы)

Приложение 5 к Инструкции о порядке отбора, хранения и доставки на лабораторное исследование биологических образцов, а также определения в них при лабораторном исследовании концентрации абсолютного этилового спирта, наличия наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ

Штамп государственной  
организации здравоохранения

Форма

### ЖУРНАЛ

регистрации результатов повторных лабораторных исследований биологических образцов

16

<b>№ п/п</b>	<b>Дата и время отбора</b>	<b>Наименование биологического образца, количество</b>	<b>Цель повторного лабораторного исследования</b>	<b>Дата проведения повторного лабораторного исследования</b>	<b>Фамилия и инициалы медицинских работников, проводивших повторное лабораторное исследование</b>	<b>Результаты повторного лабораторного исследования</b>	<b>Дата, фамилия и инициалы, подпись работника государственной организации здравоохранения, получившего результат</b>

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Аналитическая диагностика острых отравлений и наркоманий .....	3
Введение .....	3
Отравления и их классификация .....	7
Организация и функционирование химико-токсикологической лаборатории.....	9
Этапы химико-токсикологического анализа.....	12
Литература .....	21
Биотрансформация чужеродных соединений в организме .....	22
Токсикодинамика и токсикокинетика ядов в организме .....	22
Факторы, влияющие на токсичность химических соединений .....	27
Литература .....	35
Аналитическая токсикология .....	35
Подходы и методы химико-токсикологического анализа. Химические методы исследования. Микрорентгенофлуоресценция .....	35
Хроматография.....	38
Иммунохимические методы анализа .....	62
Литература .....	74
Тесты .....	75
Приложение.....	80