

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ  
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
УЗ «ГОРОДСКОЙ КЛИНИЧЕСКИЙ НАРКОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСПАНСЕР»  
Кафедра клинической лабораторной диагностики БелМАПО  
Кафедра психиатрии и наркологии БелМАПО  
Централизованная химико-токсикологическая лаборатория УЗ ГКНД

**Технологии химико-токсикологического анализа  
и их использование в практике диагностики состояний,  
вызванных употреблением наркотических средств**

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО

2015

УДК 616.89-008.441.33-074(075.9)

ББК 56.14:53.4я73

Т 38

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия  
НМС Белорусской медицинской академии последипломного образования  
протокол № 7 от 22.09. 2015

**Авторы:**

**Камышников В.С.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелМАПО

**Шилейко И.Д.** – к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО

**Кузьменко А.Т.** – к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО

**Статкевич Д.А.** – ассистент кафедры психиатрии и наркологии БелМАПО

**Чубуков А.М.** – заведующий централизованной химико-токсикологической лабораторией УЗ ГКНД

**Рецензенты:**

**Объедков В.Г.** – к.м.н., доцент кафедры психиатрии и медицинской психологии БГМУ

**Боровикова Л.Н.** – к.б.н., клиническая химико-токсикологическая лаборатория УЗ ГКБСМП г. Минска

Т 38

**Технологии** химико-токсикологического анализа и их использование в практике диагностики состояний, вызванных употреблением наркотических средств.: учеб.-метод. пособие /В.С. Камышников [и др.]. – Минск.: БелМАПО, 2015 – 139 с.

ISBN 978-985-499-947-0

В учебно-методическом пособии изложены характеристики основных наркотических средств и психотропных веществ, распространенных на нелегальном рынке в Беларуси. Приведены классификация наркотических средств, особенности их фармакокинетики, воздействия на организм человека, клинические признаки их употребления. Отражены принципы и методы химико-токсикологического анализа, положенные в основу лабораторной диагностики употребления наркотических средств.

Учебно-методическое пособие предназначено для практических врачей терапевтического профиля (наркологов, токсикологов, реаниматологов, психиатров), врачей лабораторной диагностики, студентов медицинских ВУЗов, клинических ординаторов.

ISBN 978-985-499-947-0

© Камышников В.С., [и др.], 2015

© Оформление БелМАПО, 2015

## Содержание:

Перечень сокращений.....	4
Современное состояние проблемы в Республике Беларусь .....	6
Основные законодательные и нормативно-правовые документы, регламентирующие мероприятия по противодействию употребления наркотических средств и психотропных веществ в Республике Беларусь.....	7
Понятие о наркотических средствах.....	9
Классификация наркотических средств.....	10
Вещества, действующие на опиоидные рецепторы.....	11
Каннабиноиды.....	20
Психостимуляторы – производные группы фенилалкиламина.....	31
Введение в химико-токсикологический анализ.....	42
Характеристика биологических объектов.....	48
Способы подготовки проб биологических жидкостей.....	50
Методы определения наркотических средств и психотропных веществ.....	64
Иммунохимические методы.....	65
Хроматографические методы.....	69
Алгоритмы лабораторной диагностики употребления наркотических средств.....	130
Список литературы.....	136

## Перечень сокращений

- Альфа-PVP – альфа-пирролидинопентиофенон
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭТТ – высота эквивалентная теоретической тарелке
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГАХ – газоадсорбционная хроматография
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- ГХ – газовая хроматография
- ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектральным детектированием
- ДАМ – диацетилморфин
- ДС – диагностическая специфичность
- ДТП – детектор по теплопроводности
- ДЧ – диагностическая чувствительность
- ДЭЗ (ЭЗД) – детектор электронного захвата
- ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ИХ – иммунохроматография
- МАО – моноаминоксидаза
- МС – масс-спектральный детектор
- ПАВ – психоактивные вещества
- ПВЭТТ – приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке
- ПВД (ДИП) – пламенно-ионизационный детектор
- ПФД – пламенно-фотометрический детектор
- ПФИА – поляризационный флюороиммунный анализ
- ПЦ+ – предсказательная ценность положительного результата теста
- ПЦ- – предсказательная ценность отрицательного результата теста
- РИА – радиоиммунный анализ

СК – синтетические каннабиноиды

ТГК – дельта-9-тетрагидроканнабинол

ТГК-СООН – 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновая кислота

ТИД (ТДИ) – термоионный детектор

ТСХ – хроматография в тонком слое сорбента

ТФЭ – твердофазная экстракция

ХТА – химико-токсикологический анализ

ХТИ – химико-токсикологическое исследование

ЧТТ – число теоретических тарелок

ЭДДП – 2-этилиден-1,5-диметил-3,3-дифенилпирролидин (основной метаболит метадона)

СУР – цитохром Р-450

MDMA – метилендиоксиметамфетамин

MDPV – метилендиоксипировалерон

SBSE – Stir Bar Sorptive Extraction (микротвердофазная экстракция)

SPME – Solid Phase Microextraction (автоматизированная твердофазная микроэкстракция)

6-МAM – 6-моноацетилморфин

11-ОН-ТГК – 11-гидрокси-дельта-9-каннабинол

## Современное состояние проблемы в Республике Беларусь

Различные формы нелегального употребления наркотических средств являются источником значительного экономического ущерба, связанного со снижением трудоспособности потребителей, затратами медицинского и юридического характера, что делает эту проблему важной не только с медицинской точки зрения. По данным Всемирного доклада о наркотиках, изданного в 2013 г., наиболее часто потребляемыми наркотиками являются вещества, относящиеся к группе каннабиноидов – их в 2011 г. во всем мире употребляли более 180 млн. человек (3,9% мирового населения). Далее следует группа стимуляторов амфетаминового ряда и экстази – 33,75 млн. и 19,36 млн. человек соответственно. И замыкают тройку «лидеров» опиоиды – 31,9 млн. человек (или 0,7 % населения земного шара) и опиаты – более 16 млн. человек.

Мировой тенденцией последних десяти лет является высокий темп роста уровня распространенности потребления новых психоактивных веществ, созданных на основе известных наркотических средств путем изменения структуры, дизайна их молекулы. По отношению к таким веществам применяется выражение «дизайнерские» наркотики.

Под «дизайнерскими» наркотиками чаще всего подразумеваются синтетические каннабиноиды, а также некоторые психотропные вещества, по своему химическому происхождению относящиеся к группе психостимуляторов, но по механизму действия и вызываемым эффектам занимающие промежуточное положение между психостимуляторами и психотомиметическими средствами.

По состоянию на 11.02.2015 г. в Республиканском перечне наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь, в списке особо опасных психотропных веществ, не используемых в медицинских целях, насчитывается более 230 таких соединений. Одна из опасных особенностей новых

синтетических наркотиков состоит в том, что они способны в весьма небольших, минимальных дозах (от 0,1 миллиграмма) оказать выраженное влияние на ЦНС, что сопряжено с высоким риском проявления токсических эффектов, сопровождающихся серьезными осложнениями.

Еще одна проблема обусловлена трудностью обнаружения отдельных видов «дизайнерских» наркотиков в биологических жидкостях, даже в условиях специализированной лаборатории, а также отсутствием систем для их экспресс-диагностики.

### **Основные законодательные и нормативно-правовые документы, регламентирующие мероприятия по противодействию употреблению наркотических средств и психотропных веществ в Республике Беларусь**

Законодательство о наркотических средствах и психотропных веществах основывается на Конституции Республики Беларусь и состоит из *Закона Республики Беларусь № 408-З от 13 июля 2012 г. «О наркотических средствах, психотропных веществах, их прекурсорах и аналогах»*, нормативных правовых актов Президента Республики Беларусь, а также иных актов законодательства, в том числе международных договоров Республики Беларусь.

Согласно Закону Республики Беларусь, к наркотическим средствам, психотропным веществам отнесены вещества природного или синтетического происхождения, включенные в Республиканский перечень. Республиканский перечень установлен на основании *постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 19 от 11.02.2015 г. «Об установлении республиканского перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих государственному контролю в Республике Беларусь»*. На основании опасности психоактивных веществ и жесткости мер контроля за их оборотом в перечне выделено 5 списков:

Список 1 особо опасных наркотических средств и психотропных веществ, не используемых в медицинских целях.

Список 2 особо опасных наркотических средств и психотропных веществ, разрешенных к контролируемому обороту.

Список 3 опасных психотропных веществ.

Список 4 прекурсоров наркотических средств и психотропных веществ.

Список 5 опасных наркотических средств, не используемых в медицинских целях.

Нормативным документом, определяющим порядок освидетельствования на предмет употребления психоактивных веществ, является *Постановление Совета Министров Республики Беларусь № 497 от 14 апреля 2011 г. «Об утверждении Положения о порядке проведения освидетельствования физических лиц на предмет выявления состояния алкогольного опьянения и (или) состояния, вызванного потреблением наркотических средств, психотропных, токсических или других одурманивающих веществ»*.

Порядок проведения химико-токсикологического исследования и правила осуществления преаналитического этапа установлены *Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 81 от 9 августа 2011 г. «Об утверждении 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»*.

Порядок организации химико-токсикологических лабораторий определяется на основании *приказа Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 874 от 8 сентября 2011 г. «Об утверждении Положения о порядке организации и деятельности химико-токсикологических лабораторий государственных организаций здравоохранения»*.

Химико-токсикологические лаборатории, функционирующие в системе Министерства здравоохранения Республики Беларусь, в своей работе руководствуются утвержденными унифицированными методиками

исследований.

Перечень утвержденных в Республике Беларусь методик химико-токсикологического исследования:

1. Методика газохроматографического определения этилового спирта в жидких биологических средах организма: МВИ.МН 1329-2001.

2. Экспресс-тесты на основе моноклональных антител для идентификации наркотических средств и психотропных веществ в биологических пробах (опийных алкалоидов, героина; амфетамина, метафетамина и их дериватов; каннабиноидов (марихуаны)): инструкция по применению № 048-0509.

3. Методика обнаружения и количественного определения опиатов в биологических жидкостях: инструкция по применению № 061-0610.

4. Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях: инструкция по применению № 104-0910.

5. Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных немедицинским употреблением трамадола: инструкция по применению № 049-0511.

6. Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных каннабиноидами: инструкция по применению № 065-0512.

7. Метод лабораторной диагностики состояний интоксикации, вызванных потреблением фенobarбитала: инструкция по применению № 077-0713.

### **Понятие о наркотических средствах**

*Психоактивные вещества (ПАВ)* – вещества различной химической структуры, которые при введении в организм человека оказывают влияние на ряд важных психических процессов: восприятие, настроение, внимание, мышление, способность к познанию, поведение. По определению ВОЗ психоактивное вещество может быть отнесено к наркотическим «в связи со своей значительной общественной опасностью и вредом, причиняемым

здоровью индивидуума».

В правовом аспекте наркотическое средство характеризуется совокупностью трех критериев:

- медицинского – оказывает специфическое действие на ЦНС, что является причиной его немедицинского употребления;
- социального – широко применяется в немедицинских целях, и наносимый вред приобретает социальную значимость;
- юридического – вещество официально признано наркотическим и включено в список наркотических средств.

### **Классификация наркотических средств**

В настоящее время предложено множество вариантов классификации наркотических средств, чаще всего сформированных с учетом:

- а) их происхождения;
- б) характера влияния на функцию ЦНС;
- в) клинической картины вызываемой ими интоксикации;
- г) вида нейромедиаторных систем, преимущественно через которые они оказывают свое действие;
- д) особенностей химической структуры вещества.

1. В зависимости от происхождения все наркотические средства делятся на три большие группы:

- растительные – опийные алкалоиды, кокаин, марихуана, гашиш, мескалин, псилоцибин и др.;
- полусинтетические – героин, ЛСД и др.;
- синтетические – метадон, трамадол, синтетические каннабиноиды, производные катинона и др.

2. В зависимости от природы нейромедиаторных систем, через которые они преимущественно оказывают свое основное действие, выделяют:

- модуляторы опиоидергических нейромедиаторных систем – опиаты и опиоиды;
- модуляторы катехоламинергических и серотонинергических систем – амфетамин, метамфетамин и их производные, производные лизергиновой кислоты, псилоцин, псилоцибин, мескалин;
- модуляторы эндоканнабиноидных систем – каннабиноиды;
- модуляторы ГАМК-ергических систем – барбитураты, 1,4-бензодиазепины, оксибутират натрия;
- модуляторы глутаматергических систем – фенциклидин, кетамин;
- модуляторы холинергических нейромедиаторных систем – атропин.

### **Вещества, действующие на опиоидные рецепторы**

К этой группе относятся опиаты, представленные:

- природными алкалоидами, получаемыми из сока растения опийного мака (морфин, кодеин, тебаин, носкапин, неопин, орипавин),
- полусинтетическими, произведенными на основе естественных алкалоидов опия (героин, ацетилкодеин),
- синтетическими, искусственно полученными опиоидами, реализующими свой эффект путем воздействия на опиоидергические нейромедиаторные системы, (метадон, трамадол, фентанил и др.).

В соответствии с современной систематикой психоактивных веществ (ПАВ) термин «опиоиды» принято применять ко всем лигандам опиоидных рецепторов, независимо от происхождения ПАВ.

Употребление опиоидов (как и других наркотических средств) осуществляется путем внутривенного, внутримышечного введения, вдыханием порошка (интраназально) а также способом курения.

Механизм действия веществ этой группы состоит в связывании с опиоидными рецепторами:  $\mu$ -,  $\kappa$ - или  $\delta$ -. Каждый тип рецепторов имеет субтипы, различающиеся по функции ( $\mu 1$ -,  $\mu 2$ -,  $\kappa 1$ -,  $\kappa 2$ -,  $\kappa 3$ -,  $\delta 1$ -,  $\delta 2$ -). Наиболее

значимым для физиологии типом опиоидных рецепторов являются  $\mu$ -рецепторы, поскольку при их возбуждении проявляются типичные фармакологические эффекты опиоидов; при этом с воздействием на  $\mu$ 1-рецепторы связывают развитие анальгезии, а с действием опиоидов на  $\mu$ 2-рецепторы – угнетение внешнего дыхания и развитие физической зависимости.

Клиническая картина интоксикации, вызванная приемом опиоидов, весьма типична, но может отличаться скоростью и продолжительностью ее развития, что зависит как от химической природы используемого наркотика, так и от способа его введения в организм. Краткий период эйфории, длящийся от 10 до 30 мин, сменяется состоянием расслабленности, малоподвижности. Отмечаются сухость и бледность кожных покровов. Респираторное действие опиоидов проявляется дозозависимым подавлением реакции дыхательных центров ствола мозга, моста и продолговатого мозга, урежением дыхательных циклов, замедлением вдоха и уменьшением минутного объема дыхания. Подавление функции дыхания нарастает с увеличением дозы наркотика; выраженное превышение индивидуального порога дозы приводит к остановке дыхания как наиболее типичной причине смерти от передозировки.

Офтальмологический эффект влияния опиоидов – миоз также представляет собой дозозависимую реакцию. Патогномичным симптомом острого отравления опиоидами является «точечный зрачок». Центральное и периферическое действие опиоидов проявляется в подавлении продольной перистальтики тонкого и толстого кишечника, увеличении тонуса гладкой мускулатуры отдельных сегментов желудочно-кишечного тракта, в первую очередь, – антрального отдела желудка; при этом угнетается базальная секреция желез. Влияние на состояние сердечно-сосудистой системы, и прежде всего – миокард состоит в развитии брадикардии, снижении системного артериального давления (за счет воздействия опиоидов на гладкие мышцы сосудов) и уменьшении периферического сосудистого сопротивления. Происходит нарушение функции органов мочевыделительной системы,

вызываемое нарушением почечной перфузии и проявляемое снижением диуреза в результате массивного высвобождения гистамина.

Состояние отмены возникает через 6 – 10 ч после прекращения приема наркотика и достигает максимальной выраженности к 3 – 4-м суткам. Протекает весьма тяжело и характеризуется выраженным влечением («тягой») к наркотику, потливостью, слезотечением, насморком, тремором, «гусиной кожей», тахикардией с повышением артериального давления, тупыми болями в мышцах (так называемой «ломкой»), тошнотой, диареей, расширением зрачков, в тяжелых случаях – повышением температуры тела, рвотой, потерей веса. Продолжительность состояния отмены составляет в среднем 10 суток, однако некоторые симптомы могут сохраняться более длительное время.

Опиоиды обладают высокой аддиктивностью, т.е. способностью вызывать психо-физическую зависимость, притом весьма быстро. Для опиоидов также характерен быстрый рост толерантности.

В результате передозировки наркотиков развиваются ступор, сопор или кома. Отмечаются резкое сужение зрачков, падение артериального давления, выраженная брадикардия, угнетение дыхания, признаки отека легких. При неоказании экстренной медицинской помощи высоко вероятен летальный исход.

Острая интоксикация, развивающаяся при употреблении **природных опиийных алкалоидов**, возникает через 10 – 15 мин после внутривенного введения наркотика и может длиться до 6 ч.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* Биодоступность **морфина** и **кодеина** при парентеральном введении составляет 100%, при оральном употреблении: 20-30% для морфина и 50% – для кодеина. Максимальная концентрация морфина в плазме крови достигается через 2 – 5 мин при его парентеральном введении и через 30 – 120 мин – при употреблении «per os», а при употреблении внутрь кодеина – через 60 мин. Опиийные алкалоиды частично связываются с белками плазмы крови: в такой, связанной с

белками форме находится 20 – 30% морфина и 7 – 25% кодеина. Период полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) из плазмы крови составляет для морфина 2 – 3 ч, для кодеина – 2 – 4 ч.

После приема внутрь морфин в значительной степени подвергается биотрансформации: при первом прохождении – в печени и, в меньшей степени, – в стенке кишечника. Он быстро покидает кровеносное русло, перераспределяясь в паренхиматозные органы (печень, почки, легкие, селезенка, мозг), в скелетные мышцы и миокард. При этом скелетные мышцы и миокард являются основным резервуаром морфина, так как их масса значительно превосходит массу паренхиматозных органов, хотя концентрация препарата в мышечной ткани оказывается меньше, чем в них. Процесс протекает довольно быстро: через 6 мин после внутривенного введения в системе циркуляции остается лишь 7% введенной дозы морфина. Объем распределения морфина составляет 3,3 л/кг; клиренс – 15 – 20 мл/мин/кг. За 8 часов выводится 80% принятой дозы морфина, за 24 ч – 90%.

**Героин** (диацетилморфин, ДАМ) действует в 4–5 раз сильнее морфина. Вследствие меньшей полярности молекулы, высокой растворимости в липидах мембран клеток всасывание диацетилморфина происходит быстрее, чем морфина. Период полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) героина из плазмы крови составляет от 3 – 9 мин. После внутривенного введения максимальная концентрация ДАМ в плазме крови достигается уже через 1 – 2 мин и в последующие 10 мин быстро уменьшается вследствие метаболических превращений и депонирования в тканях. ДАМ, обладая большей липофильностью, чем морфин, легко преодолевает гематоэнцефалический барьер. Достигая мозга, героин превращается в морфин.

Диацетилморфин быстро превращается в крови в 6-моноацетилморфин (6-МММ): в течение 10 мин его биотрансформация происходит полностью. Далее 6-МММ покидает кровяное русло, деацетируется в печени и, частично, в мозге до морфина, который в дальнейшем, подвергается

глюкуронидированию: превращению в морфин-3-глюкуронид и морфин-6-глюкуронид. Соотношение свободного и конъюгированного морфина в организме составляет примерно 1:9.

В течение первых 8 ч с мочой выделяется 48% введенной дозы героина, из которых 7% составляет свободный морфин. В течение 24 ч экскретируется около 80% дозы героина.

При систематическом употреблении героина в ткани мозга накапливаются его метаболиты. Некоторые из них (например, 6-МAM, морфин) также проявляют наркотическое действие. Поскольку 6-МAM представляет собой метаболит, образующийся только в ходе биотрансформации героина, его выявление может служить маркером употребления героина.

У погибших от передозировки героина было выявлено значительное количество свободного морфина в печени, легких и почках, а также в полости перикарда. Доля свободного морфина особенно высока в крови, ткани мозга, сердечной мышцы, селезенки, почек, где она может составлять 68 – 99%. В ткани органов с высокой метаболической активностью (печени, легких) отмечено значительное содержание конъюгированного морфина (50 – 66%). В моче на долю конъюгатов приходится до 70% от его общего содержания. Концентрация свободного морфина в цереброспинальной жидкости оказывается близкой к таковой в мозговой ткани, вместе с тем, не обнаружено накопление конъюгатов морфина в мозге.

*Метадон* является синтетическим опиоидом. Он был получен в процессе поиска анальгетиков, не обладающих наркогенными свойствами, который, однако, не завершился желаемым намерением. В 1964 г. препарат был предложен американскими исследователями V. Dole и M. Nyswander для осуществления заместительной терапии героиновой наркомании, которая впервые была проведена в Рокфеллеровском институте медицинских исследований.

В настоящее время метадон используется в медицине в качестве опиоидного анальгетика для лечения хронической боли, а также как препарат выбора для проведения заместительной терапии опиоидной зависимости.

Метадон проявляет относительную селективность по отношению к  $\mu$ -рецепторам и является их типичным агонистом, поэтому в терапевтических дозах оказывает анальгезирующее и седативное действие. Болеутоляющий эффект реализуется благодаря прямому угнетающему влиянию на спинальные нейроны, подавлению межнейронной передачи в задних рогах спинного мозга, а также изменению функционального состояния клеток супраспинальных ядер, оказывающих нисходящее влияние на нейроны нижележащих отделов центральной нервной системы.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* Метадон, являясь жирорастворимым препаратом, обладает способностью быстро всасываться. В плазме детектируется спустя 10 мин после подкожного введения и через 30 мин – после орального приема. Пик концентрации метадона в крови после однократного орального приема достигается спустя 2 – 4 ч. Период полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) метадона из плазмы крови при приеме однократной дозы составляет 14 – 15 ч, при систематическом употреблении  $t_{1/2}$  может увеличиваться до 72 ч. Метадон обладает высокой степенью связывания с белками плазмы – до 87%, что приводит к его частичной биологической инактивации.

Обладая липофильными свойствами, метадон быстро распределяется в тканях, включая мозг, кишечник, почки, печень, мышцы, и легкие. При постоянном использовании его тканевой уровень может превышать уровень содержания в плазме крови. Объем распределения метадона составляет 5 л/кг. Высокая степень связывания с белками и интенсивный захват препарата тканями обуславливают длительный период полураспада метадона в плазме, что дает возможность назначать его в клинической практике 1 раз в сутки для

лечения хронических болей, а также применять при заместительной терапии опиатной зависимости.

Биотрансформация метадона осуществляется главным образом в печени при участии изоферментов цитохрома Р-450: СYP 3A4 и частично – СYP 2D6. Основными направлениями метаболизма являются окисление с образованием N-оксида с последующим деметилированием диметиламинной группы и циклизацией по кетогруппе с образованием основного метаболита – 2-этилиден-1,5-диметил-3,3-дифенилпирролидина (ЭДДП). Биотрансформация препарата приводит к инаktivации метадона, поскольку все образующиеся метаболиты фармакологически неактивны.

Выделение метадона и его метаболитов происходит в основном через почки. Спустя 24 часа от момента приема препарата с мочой выводится от 20% до 60% дозы, причем в виде нативного вещества – до 33%, а в виде ЭДДП – 43%. При этом экскреция метадона через почки увеличивается при выделении мочи кислой реакции. С каловыми массами выводится до 30% дозы, но с возрастанием дозы это количество несколько уменьшается.

**Трамадол** представляет собой синтетический опиоид со свойствами агониста-антагониста. Это анальгетик центрального действия средней силы, близок по обезболивающему эффекту и другим нейротропным свойствам к кодеину и пентазоцину. Достаточно широко применяется в терапии, хирургии, ортопедии и онкологии для купирования болевого синдрома. Относительная доступность трамадола и его способность вызывать эйфорию (хоть и в превышающих терапевтические дозах) привели к быстрому и широкому распространению злоупотребления этим веществом.

Анальгетическое действие трамадола осуществляется посредством двух механизмов, одновременно протекающих в организме: опиоидного – путем воздействия на опиоидные рецепторы и неопиоидного – за счет воздействия через моноаминергическую систему.

В немедицинских целях трамадол употребляют как перорально, так и внутривенным способом. Особенностью трамадола является более медленное формирование наркологической симптоматики в сравнении с другими опиоидами. При передозировке трамадола отмечаются потеря сознания, судороги, сердечно-сосудистые нарушения. Эта симптоматика существенно отличается от картины передозировок другими опиоидами, сопровождающимися параличом дыхательного центра, комой и, при не оказании своевременной помощи, – летальным исходом.

Синдром психической зависимости от трамадола формируется обычно в течение 3 – 6 месяцев от начала злоупотребления. Скорость его формирования существенно зависит от личности больного, особенностей нервной системы и микросоциальных факторов.

При систематическом злоупотреблении трамадолом в течение 3 – 4-х месяцев формируется типичный синдром отмены. Основными его признаками являются вегетативные проявления: потливость, озноб, ощущение «мурашек, бегающих по коже», умеренная тахикардия (частота сердечных сокращений – до 90 в мин), тремор пальцев рук, общее недомогание, «мышечный дискомфорт», неспособность найти удобную позу. Отмечаются расстройства сна. Продолжительность периода сомато-вегетативных расстройств в состоянии отмены составляет от 5 до 7 суток. Наиболее длительно сохраняются эмоциональные нарушения в виде чувства внутреннего напряжения, беспокойства, раздражительности, конфликтности.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* Трамадол после приема быстро и почти полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта. Величина биологической доступности составляет около 70%, не зависит от приема пищи и увеличивается при многократном применении препарата. Максимальная концентрация в плазме крови определяется примерно через 2 ч после употребления.

Анальгезирующее действие при оральном приеме терапевтической дозы трамадола (50 – 150 мг) наступает через 30 – 60 мин, при внутривенном введении – через 15 – 30 мин и сохраняется в течение 5 – 6 ч. Период полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) трамадола из плазмы крови составляет 5,1 ч. При повторных приемах наблюдается аккумулярование трамадола и его метаболитов в плазме крови. Трамадол связывается с белками плазмы на 20%, проникает через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры. Примерно 0,1% вещества выделяется с грудным молоком.

В организме трамадол подвергается интенсивной биотрансформации с образованием по меньшей мере шести метаболитов. Его метаболиты, содержащие гидроксильную группу, далее подвергаются конъюгации и другим превращениям. Наиболее важным является продукт O-деметилирования трамадола – 1-(3-гидроксифенил)-2-(диметиламинометил)-циклогексан-1-он, который является фармакологически активным и отличается бóльшим сродством к опиоидным рецепторам в сравнении с трамадолом, в результате чего метаболит превышает анальгетическую активность трамадола в 2 – 4 раза. Более 90% введенной дозы трамадола экскретируется почками, при этом 30% – в неизмененном виде.

В Республике Беларусь наибольшее распространение получили ***экстракционный и ацетилированный опий кустарного изготовления*** (жаргонное название «ширка»), получаемые из маковой соломки (измельченные и высушенные части стеблей и коробочек опийного мака) либо из семян опийного мака, к которым примешивается тщательно измельченная «маковая соломка». Данный вид наркотического средства содержит в своем составе смесь алкалоидов опия, ацетилкодеина, моноацетилморфина, диацетилморфина, а также токсические примеси, обусловленные особенностями производства наркотика. Большую токсичность проявляют щелочи и кислоты, которые могут содержаться в готовом растворе в непрореагировавшем виде.

Токсическое действие непрореагировавших компонентов можно разделить на краткосрочное и долгосрочное. К краткосрочным последствиям относятся непосредственное действие щелочных или кислотных продуктов на кровеносную систему, что проявляется в виде флебитов, тромбозов, кровоизлияний (из-за уксусной кислоты, используемой в процессе изготовления наркотика) и риска развития токсической кардиомиопатии. К долгосрочным последствиям относят риск развития токсических гепатита и нефрита, активизацию хронических вирусных гепатитов В и С, утяжеления проявлений ВИЧ-инфекции и риск развития взаимодействий с антиретровирусными препаратами.

Химически активными компонентами «ширки» являются и экстрагированные из зерен мака различные органические соединения, оказывающие повреждающее действие на сосудистую стенку, печень и почки.

Дополнительные риски создает комбинация опиоидов с антигистаминными препаратами (напр., димедролом), добавляемыми в «ширку» для уменьшения сильного зуда, возникающего после введения наркотика. В данной ситуации потенцируется угнетающее действие опиоидов на центральную нервную систему, что значительно повышает риск передозировок и усложняет оказание медицинской помощи при их наступлении.

### **Каннабиноиды**

**Каннабиноиды** – группа биологически активных веществ, молекулы которых характеризуются структурой, близкой к стероидной. Их объединяет способность воздействовать на рецепторы определенного типа. Выделяют природные и синтетические каннабиноиды. Благодаря исследованию механизмов воздействия природных каннабиноидов на центральную нервную систему была открыта новая нейромедиаторная система, названная эндоканнабиноидной. Данная система включает в себя каннабиноидные

рецепторы двух типов (CB<sub>1</sub> CB<sub>2</sub>) и их эндогенные лиганды: анандамид (от санскритского слова «ананда» – блаженство) и 2-арахидоноил-глицерол (2-АГ).

CB<sub>1</sub> каннабиноидные рецепторы широко представлены в структурах ЦНС: коре больших полушарий, гиппокампе, гипоталамусе, мозжечке, базальных ганглиях, мозговом стволе, спинном мозге и миндалях, и это обуславливает их участие в регуляции процессов движения, памяти, формировании эмоций и болевой чувствительности, а также в регуляции рвотного рефлекса и вегетативных функций организма. CB<sub>1</sub> рецепторы сосредоточены на нейронах, высвобождающих гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) – главный тормозной нейротрансмиттер головного мозга. Влияние на ГАМК-эргическую передачу рассматривается как основной механизм психотропного действия каннабиноидов.

CB<sub>2</sub> рецепторы являются рецепторами периферического типа и ассоциированы с клетками иммунной системы. Согласно современным данным, эндоканнабиноидная система играет значительную роль в развитии многих заболеваний: болезни Альцгеймера, хореи Гентингтона, рассеянного склероза, ожирения, шизофрении, последствий закрытой травмы головного мозга, алкоголизма и других видов патологии. В связи с этим с целью разработки новых средств лечения перечисленных заболеваний идет активный поиск веществ, обладающих свойством воздействовать на каннабиноидные рецепторы.

***Природные каннабиноиды (фитоканнабиноиды)*** содержатся в наркотических средствах, производимых на основе индийской конопли (*Cannabis Sativa*). Связанный с их употреблением психоактивный эффект обусловлен, главным образом, различными изомерами действующего вещества – дельта-9-тетрагидроканнабинола (ТГК). Наиболее распространенными формами природных каннабиноидов являются: марихуана – высушенная и измельченная верхняя часть растения с листьями и цветками, содержащая до 10 – 15% ТГК; гашиш – высушенная смола, выделяющаяся из цветущих верхушек,

содержание ТГК в которой колеблется в пределах 2 – 10%; гашишное масло – концентрированный экстракт растительного материала или смолы с уровнем содержания ТГК от 10 до 60%.

Наиболее частый способ употребления наркотических средств, получаемых из *Cannabis Sativa*, – курение. Для курения используют сигареты (папиросы) с марихуаной, где она заменяет часть табака, а также обычные табачные сигареты с добавкой гашиша или гашишного масла. Распространено также пероральное потребление гашиша – жевание, добавление в пищу или потребление в виде отвара на молоке.

Проявления опьянения, вызванного каннабиноидами, весьма разнообразны и зависят от дозы поступившего в организм ТГК, индивидуальных особенностей организма, способа введения наркотика и других факторов. Тем не менее, имеется ряд клинических признаков, наиболее характерных для картины употребления продуктов *Cannabis* (при курении).

*Первая стадия* реакции организма на каннабиноиды начинается через 5 – 10 мин после употребления наркотика и длится такое же время. Характеризуется тревогой разной степени выраженности, повышенной пугливостью; расширением зрачков, покраснением лица, дрожью в руках. Возникает чувство сухости во рту, ощущаются тепло по всему телу, тяжесть в ногах.

При переходе во *вторую фазу* возникает эйфория, нарастают расстройства восприятия: цвета воспринимаются необычно яркими, контуры предметов видятся четкими, контрастными или, наоборот, расплывчатыми. Имеют место расстройства мышления: не только по форме, но и по содержанию. Воспринимаются и перерабатываются лишь случайные внешние события, что свидетельствует о сужении сознания. В этой фазе отмечаются особый блеск глаз, учащение пульса, подъем артериального давления, оживление сухожильных рефлексов, шаткость походки, горизонтальный установочный нистагм.

*Третья стадия* представляет собой, по сути, уже психотическое состояние со спутанностью, бессвязностью мышления и отрывочным бредом. Пациенты, пребывающие в этой стадии интоксикации, внешне малоподвижны, отрешены от происходящего. Отмечаются разнообразные иллюзии, расстройства восприятия времени и собственного тела, насыщенность эмоций и их широкая гамма. Курильщик выглядит бледным, у него усиливается потливость, нарастают голод, жажда, снижается температура тела, продолжает повышаться артериальное давление.

Для *четвертой фазы* – выхода из гашишного опьянения – характерны вялость, слабость, бледность, заторможенность, апатичность. При этом у человека появляются повышенный аппетит и постоянная жажда. Выход из гашишного опьянения сопровождается длительным (10 – 15 ч) беспокойным и поверхностным сном. После пробуждения сохраняются жажда, повышенный аппетит. Выраженность и последовательность развития отдельных симптомов имеют существенные индивидуальные отличия, но довольно постоянны у одного и того же лица при повторном употреблении гашиша.

При *передозировке* наркотика наблюдается резкое расширение зрачков, они перестают реагировать на свет; отмечаются гиперемия лица, сухость слизистых оболочек, хриплый голос, учащение пульса до 100 – 120 уд/мин, повышение артериального давления. Возникает оглушенность, возможно развитие сопора, комы и коллапса. Может развиваться острый психоз, протекающий в форме делирия, сумеречного помрачения сознания [9].

Последствия длительного употребления продуктов *Cannabis* для различных систем организма достаточно серьезные. Каннабиноиды значительно ухудшают мыслительные способности, способность к пониманию, абстрактному мышлению, обучению. При этом снижается интеллект, происходит нарушение краткосрочной памяти. Длительное потребление каннабиноидов сопряжено с риском возникновения структурных и функциональных изменений головного мозга, что может вызывать нарушение

координации и увеличивать время реакции. Изменяется ответная реакция организма человека на световые и звуковые сигналы, нарушается способность к выполнению последовательных операций. Хроническое потребление высоких доз гашиша обуславливает возникновение «амотивационного синдрома». Его симптомы включают апатию, отсутствие интересов, усталость и снижение целенаправленной деятельности. Довольно часто при систематическом употреблении продуктов *Cannabis* встречаются гашишные психозы.

Соматические изменения выражаются в появлении миокардиодистрофии, экстрасистолии, гепатитов, атрофии печени, почечной недостаточности. Последствия курения продуктов *Cannabis* подобны эффектам табакокурения и проявляются бронхитами, фарингитами, синуситами, раком легких, поскольку канцерогены присутствуют в марихуане в большем количестве, чем в табаке.

В настоящее время нет сомнений в том, что употребление каннабиноидов вызывает зависимость, хотя скорость ее развития оказывается ниже таковой, наблюдаемой при употреблении опиоидов, алкоголя или никотина. Нередко марихуану называют «вводным» наркотиком, последствием приема которого часто является переход к наркотическим средствам с более выраженной аддиктивностью.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* В процессе курения значительная доля ТГК подвергается термической деструкции. При глубоком вдыхании и длительной задержке в легких (в течение 20 – 30 сек) до 50% ТГК попадает в систему кровообращения. Биодоступность при курении определяется интервалом 10 – 23%. ТГК поступает в систему кровообращения в течение нескольких минут, достигая максимума концентрации в плазме через 5 – 30 мин. В крови около 97% ТГК связывается с белками плазмы.

Обладая липофильными свойствами, ТГК после поступления в организм быстро покидает кровяное русло, распределяясь в тканях, богатыми липидами: жировых отложениях, мозге, легких, половых органах, клеточных мембранах. Объем распределения составляет 10 л/кг.

Аккумулятивный ТГК медленно возвращается в систему кровообращения и может быть определен высокочувствительными методами анализа в крови в течение нескольких часов, а в моче – более 7 – 10 суток после выкуривания одной сигареты.

Биотрансформация ТГК осуществляется в печени под действием цитохрома Р 450 до первичного короткоживущего метаболита, обладающего психоактивным действием, – 11-гидрокси-дельта-9-каннабинола (11-ОН-ТГК), который под действием алкогольдегидрогеназы трансформируется в конечный биологически неактивный метаболит – 11-нор-дельта-9-тетрагидроканнабинол-9-карбоновую кислоту (ТГК-СООН). Всего установлено более 75 соединений – продуктов биотрансформации каннабиноидов, два из которых (11-ОН-ТГК и 8β-ОН-ТГК) обладают биологической активностью. Для эффективного выведения почками 75 – 80% гидроксилированных и карбоксилированных метаболитов конъюгируются с глюкуроновой и серной кислотами, превращаясь в более полярные, растворимые в воде соединения.

Продукты мочевой экскреции ТГК практически полностью конъюгированы. Содержание неизмененного ТГК в моче составляет менее 1% употребленной дозы. Через 72 часа после введения каннабиноидов около 50% дозы наркотиков выводится в виде метаболитов каннабиноидов, остальная часть распределяется в организме и в течение нескольких суток выделяется с мочой (25%) и с калом (65%).

**Синтетические каннабиноиды (СК).** Продукты, содержащие СК, впервые появились на нелегальном рынке примерно в 2004 г. Синтетические каннабиноиды добавлялись к растительному материалу, например измельченным или нарезанным на полоски листьям, путем пропитки или распыления раствора одного или нескольких синтетических каннабиноидов в органическом растворителе, который затем испарялся. В некоторых случаях использовались вещества в твердом виде (кристаллический порошок), что

приводило к неоднородному распределению активного соединения в растительном материале.

*Синтетические каннабиноиды (синтетические каннабимиметики)* – группа веществ различной химической структуры, проявляющих способность воздействовать на каннабиноидные рецепторы – СВ<sub>1</sub> и СВ<sub>2</sub>.

Как уже упоминалось ранее, предпринимались попытки синтеза и использования СК для лечения больных, страдающих болезнью Альцгеймера, ожирением, шизофренией, мигренью, судорожными приступами, рвотой, болями разного происхождения и др. Так, например, синтетический каннабимиметик JWH-018 был синтезирован в лаборатории университета в Клемсоне (США) в 1995 г. химиком John W. Huffman (откуда и пошло название JWH) с целью возможного использования в медицине. Впоследствии выяснилось, что действие нового синтезированного препарата на СВ<sub>1</sub> рецепторы в пять раз превосходит эффект основного компонента конопли – тетрагидроканнабинола. Поиск каннабиноидов с определенной терапевтической активностью предполагает синтез новых соединений, которые могут обладать более высоким сродством к СВ<sub>1</sub>-рецепторам.

Синтетические каннабиноиды в чистом виде представляют собой мелкокристаллический порошок белого, серого, коричневатого или желтоватого цвета. Они используются для приготовления смесей для курения, которые производятся из нейтральной растительной массы, обработанной раствором одного или нескольких синтетических каннабимиметиков и натуральных либо искусственных ароматизаторов. Смешивание растительного материала с синтетическими каннабиноидами осуществляется путем помещения растительной массы в специальные мешалки и добавления раствора синтетических каннабимиметиков в органическом растворителе (например, ацетоне) для пропитывания этой массы. Основным способом употребления – ингаляция паров вещества или его курение в виде смесей; иногда практикуется

потребление травяных продуктов, содержащих синтетические каннабиноиды, с пищей или в виде чая.

В зависимости от особенностей химической структуры агонисты каннабиноидных рецепторов можно разделить на следующие основные группы:

1. Классические каннабиноиды – тетрагидроканнабинол, другие химические соединения, присутствующие в каннабисе, а также структурно связанные с ними синтетические аналоги, например AM-411, AM-906, HU-210, O-1184.

2. Неклассические каннабиноиды – циклогексилфенолы или 3-арилциклогексанолы, например CP-55,244, CP-55,940, CP-47,497 и гомологи C6-9.

3. Гибридные каннабиноиды – комбинации структурных особенностей классических и неклассических каннабиноидов, например AM-4030.

4. Аминоалкилиндолы, которые можно дополнительно разделить на следующие группы:

- нафтоиндолы (AM-1220, AM-2201, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-200, JWH-210 и др.),

- фенилацетилиндолы (JWH-250, JWH-251 и др.),

- бензоиндолы (AM-694, AM-2233, RSC-4, RSC-4-орто и др.),

- нафтилметилиндолы (например, JWH-184),

- циклопропоиндолы (например, UR-144, XLR-11),

- адамантоиндолы (например, AB-001, AM-1248),

- индолкарбоксамиды (например, AB-PINACA, AB-FUBINACA, STS-135).

5. Эйкозаноиды – такие эндоканнабиноиды, как анандамид (AEA) и их синтетические аналоги, например метанандамид (AM-356).

6. Прочие – охватывают такие другие структурные виды, как диарилпиразолы (например, Rimonabant, нафтоилпирролы (JWH-307), нафтилметиленды (JWH-176) и индазолкарбоксамиды (APINACA).

Практически все перечисленные соединения обладают липофильными свойствами. Они содержат 20 – 26 атомов углерода, в результате чего легко возгоняются при курении. Многие из них по фармакологическому действию превосходят ТГК, вследствие чего «типичная» разовая доза может составлять менее 1 мг.

Биологические свойства СК определяются эффектами двух уровней:

- молекулярно-клеточного (способностью связываться с СВ<sub>1</sub>-рецепторами; проявлять свойства агонистов СВ<sub>1</sub>-рецепторов, модифицировать системы трансдукции, сопряженные с СВ<sub>1</sub>-нейропередачей; наличием нейрохимических и нейрофизиологических паттернов, сопровождающих воздействие психоактивным веществом и пр.);
- организменного, заключающегося в способности вызывать синдромы химической зависимости (синдромы психической зависимости и измененной толерантности, абстинентный), а также изменять ряд поведенческих, других физиологических реакций организма: проявлять гипотермическое, каталептогенное, антиноцицептивное действия, способность угнетать спонтанную двигательную активность.

Анализ биологических эффектов организменного уровня указывает на сходство между синтетическими каннабиноидами и ТГК. Однако СК представляются веществами с бóльшим токсическим и аддиктивным потенциалами. Выраженная биологическая активность СК в определенной степени может объясняться как их высоким сродством к СВ<sub>1</sub>-рецепторам, так и особенностями токсикокинетики. В частности, особенностью превращений СК в I фазе биотрансформации является образование нескольких (а не одного, как в случае с ТГК) активных метаболитов. Так, при метаболизме JWH-018 таковыми являются девять моногидроксилированных интермедиатов.

Основным фармакологическим эффектом агонистов каннабиноидных рецепторов является эйфория. Параллельно возникают расстройства

восприятия, мышления и сознания, насыщенность эмоций, неуправляемость психической деятельности.

Употребление СК может приводить к развитию острой интоксикации, передозировок, а также вызывать психотические нарушения. Длительность острых интоксикационных психозов может составлять от 1 до 3-х суток, реже – до 5 – 7-ми суток. Психозы чаще всего протекают с галлюцинаторной, бредовой или полиморфной симптоматикой. При этом характерны психомоторное возбуждение, страх, наличие слуховых и зрительных обманов восприятия, выраженная тревожность. Отмечается быстрая смена эмоциональных реакций, что отражается в мимике: страх может смениться выражением растерянности, а затем беспричинным весельем. Бредовый синдром характеризуется бредом преследования, развивающимся вскоре после потребления вещества. Иногда такое состояние может напоминать острый приступ шизофрении.

В результате употребления СК могут развиваться не только преходящие психотические эпизоды. Ряд авторов предполагает возможность иницирующей роли употребления синтетических агонистов каннабиноидных рецепторов в развитии параноидной формы шизофрении. В медицинской литературе описаны также случаи развития эпилептического статуса, ишемических инсультов и острой почечной недостаточности под влиянием синтетических каннабиноидов.

За последние годы опубликованы наблюдения множества случаев передозировок при употреблении травяных смесей, содержащих СК, а также формирования психотических состояний. Даже кратковременное употребление СК нередко сопровождается возникновением психозов.

Существует несколько гипотез более высокой токсичности синтетических каннабиноидов по сравнению с природными, согласно которым:

1. СК обладают более высокой аффинностью по отношению к центральным каннабиноидным рецепторам по сравнению с природным

тетрагидроканнабинолом (ТГК), что обуславливает более высокую частоту развития психозов.

2. Соматическая токсичность СК связана с действием на периферические СВ<sub>2</sub> – каннабиноидные рецепторы, на которые ТГК действует очень слабо.

3. Присутствие каннабидиола в природных каннабиноидах (в отличие от синтетических) обуславливает седативный, антипсихотический и нейропротекторный эффекты и уравнивает психотомиметические эффекты ТГК.

4. Токсическое действие каннабиноидов обуславливается наличием растворителей, используемых для приготовления курительных смесей.

Клинические наблюдения не оставляют сомнений в том, что результатом употребления СК становятся: прогрессирующее снижение энергетических ресурсов, физическое и психическое истощение, нарастание вялости, потеря социальных связей, появление затяжных психозов, приводящих к глубокой инвалидизации. При длительном употреблении агонистов каннабиноидных рецепторов происходит снижение когнитивных функций – памяти, внимания, способности к абстрактному мышлению. Развиваются нарушения сна, которые трудно поддаются коррекции.

Возникают нарушения со стороны нервной системы: нарушается координация движений, увеличивается время реакции, падает острота зрения и нарушается цветовосприятие, возможна дегенерация сетчатки и зрительных нервов. Установлен кардиотоксический эффект каннабиноидов, который проявляется нарушениями сердечного ритма и развитием стенокардии. Нередко отмечаются патологические процессы в слизистой оболочке носа, горла, бронхов и легких, так как основным способом поступления наркотика в организм является его курение.

Хроническая интоксикация достаточно быстро приводит к нарушению функции печени с формированием хронических гепатитов. В значительной степени снижается функциональная активность иммунной системы,

происходит угнетение клеточного иммунитета, снижение количества Т-лимфоцитов, что сопровождается частыми и более тяжело протекающими инфекционными заболеваниями.

При приеме синтетических каннабиноидов формируются «традиционные» синдромы толерантности, психической зависимости, а также абстинентный синдром, что позволяет отнести данную патологию к F12 «Психические расстройства и расстройства поведения, связанные с употреблением каннабиноидов». В отличие от природных каннабиноидов, при употреблении синтетических агонистов каннабиноидных рецепторов достаточно быстро развивается психофизическая зависимость, которая крайне сложно поддается лечению.

### **Психостимуляторы – производные группы фенилалкиламина**

Психостимуляторы по происхождению разделяют на природные и синтетические. К природным относятся эфедрин, псевдоэфедрин, норэфедрин, катин, катинон. К синтетическим – простые амфетамины (амфетамин, метамфетамин, меткатинон), 3,4-замещенные производные амфетамина (MDA, MDMA, MDEA, MDOH, метилон, BDB, MBDB, MMDA), 4-замещенные производные амфетамина (PMA, PMMA, мефедрон, метедрон, 4-MTA, PCA, 4-фторамфетамин, флефедрон), 4-замещенные 2,5-диметоксиамфетамины (DOM, DOET, DOB, DOI, DOC), 2-амино-5-арилоксазолины (аминорекс, 4-метиламинорекс, пемолин) и др.

*Амфетамин* (фенамин), синтезированный в 1887 г. как аналог эфедрина, сразу же получил широкое распространение в качестве лекарственного средства для лечения бронхиальной астмы. Его психоактивные свойства стали известны лишь через 40 лет, что дало толчок к еще более широкому использованию вещества. Амфетамин и его производные использовались в различных армиях во время военных конфликтов для поддержания высокой

степени боеспособности. Лишь в 1971 г. данный препарат был отнесен к наркотическим, и его оборот был строго ограничен.

На нелегальном рынке амфетамин распространяется в виде твердых солей (амфетамина сульфат или фосфат), которые представляют собой кристаллический порошок желтовато-белого или светло-коричневого цвета. Употребляется амфетамин чаще всего внутривенно, его также используют в виде водных растворов для питья, вдыхают или курят в смеси с табаком.

Основу химической структуры амфетамина составляет фенилэтиламин. Множество его производных (дериватов) имеют схожую химическую формулу и производят аналогичное действие. К настоящему времени описано более 100 различных производных амфетамина, обладающих психотропной активностью; характеристики некоторых из них представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффективная доза и время действия производных амфетамина

<i>Вещество</i>	<i>Химическое название</i>	<i>Эффективная доза (мг)</i>	<i>Время действия (ч)</i>
MDA	3,4-метилендиоксиамфетамин	200 – 230	8 – 12
MDMA	3,4-метилендиоксиметамфетамин	80 – 150	4 – 6
MDEA/ N-этил MDA	3,4-метилендиоксиэтил-амфетамин	100 – 200	3 – 5
DOM/STP	2,5-диметокси-4-метил-амфетамин	3 – 10	14 – 20
PMA	4-метоксиамфетамин	50 – 80	короткое
DMA	2,5-диметоксиамфетамин	80 – 160	6 – 8
TMA	3,4,5-триметоксиамфетамин	100 – 250	6 – 8
DOB	2,5-диметокси-4-бромамфетамин	1 – 3	18 – 30
DOX	2,5-диметокси-4-хлорамфетамин	1,5 – 3	12 – 24
MBDB	N-метил-1-(3,4-метилендиокси-фенил)-2-бутанамин	180 – 210	4 – 6
BDB	1-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин	150 – 230	4 – 8
DOET	2,5-диметокси-4-этиламфетамин	2 – 6	14 – 20

Амфетамин увеличивает высвобождение и блокирует обратный захват катехоламинов в нервных окончаниях и, кроме того, напрямую стимулирует катехоламиновые рецепторы. В больших дозах способствует высвобождению серотонина и действуют на центральные серотониновые рецепторы.

Клинически употребление амфетамина проявляется приподнятым настроением, ощущением физической бодрости и ясности мышления, иногда болтливостью и излишней суетливостью. Описаны две фазы наркотического опьянения при внутривенном введении амфетамина: кратковременный «приход» и «кайф» (или эйфория), во время которого повышенный психический тонус может сочетаться с тревожностью, настороженностью и подозрительностью. По существу, это гипоманиакальное или смешанное состояние, похожее на клинику шизоаффективного психоза.

При отравлении амфетамином развиваются сердечно-сосудистые нарушения, проявляющиеся тахикардией и гипертензией. Со стороны нервной системы характерна изменчивость настроения, тревожность, агитация, агрессивность, зрительные и тактильные галлюцинации, клонико-тонические судороги. Наблюдаются также мидриаз, потливость, гипертермия.

**Метамфетамин.** Используется в виде твердой соли – метамфетамина гидрохлорида, который выпускался в СССР вплоть до начала 70-х гг. XX столетия в виде таблеток под названием первитин, содержащих 3 мг самого препарата. Первитин применялся в психиатрической практике как психостимулятор для лечения нарколепсии и депрессий различного происхождения. Приказом Министерства здравоохранения СССР от 11 февраля 1954 г. он был отнесен к наркотикам, а в 1975 г. его производство было прекращено, и он был исключен из фармакопеи.

В чистом виде метамфетамина гидрохлорид представляет собой белый (или желтоватый) горький на вкус порошок без запаха. Используется в виде таблеток, капсул, мелких или больших кристаллов, а также в виде кустарным образом изготовленного раствора под названием «винт». Чаще всего вещество принимают внутрь или вводят внутривенно, гораздо реже – курят.

Метамфетамин по своей структуре схож с адреналином, поэтому оказывает сильное адреномиметическое действие на периферическую нервную систему: сужает периферические сосуды, повышает артериальное давление,

учащает пульс, вызывает расширение зрачков, повышает функциональную активность скелетных мышц, особенно при утомлении. Это воздействие связано с активацией функции симпатической нервной системы. На центральную нервную систему метамфетамин оказывает выраженное и длительное психостимулирующее действие.

Молекула метамфетамин отличается от таковой адреналина отсутствием гидроксильных групп, вследствие чего он липофилен и легко проникает через гематоэнцефалический барьер. По той же причине он, в отличие от адреналина, не подвергается быстрому разрушению ферментом катехол-оксиметилтрансферазой (катехол-О-метилтрансферазой), а от разрушения моноаминоксидазой (МАО) его «защищает» дополнительная метильная группа, поэтому он действует на организм достаточно продолжительное время.

Основной нейрхимический механизм действия метамфетамина связан с его способностью вызывать высвобождение из нейронов естественных нейромедиаторов (норадреналина и дофамина), что приводит к повышенному возбуждению соответствующих систем, особенно дофаминергической. Кроме того, он блокирует обратный захват высвобожденных медиаторов (включая серотонин).

Действие метамфетамина на организм выражается в приливе сил, возникновении эйфории, потере или полном отсутствии аппетита, учащении сердцебиения и дыхания, повышении температуры тела. Одним из характерных признаков употребления метамфетамина является расширение зрачка.

Длительное применение наркотика приводит к быстрой потере массы тела, снижению иммунитета, поражению легких, печени и почек, ухудшению зрения, потере координации и коллапсу. При длительном злоупотреблении метамфетамин вызывает ощущение не проходящей усталости, депрессию, иногда с элементами паранойи и может вызывать «амфетаминовый психоз» – психическое отклонение, похожее на параноидальную шизофрению.

Метамфетамин вызывает развитие сильной психической зависимости.

Синдром отмены характеризуется потерей интереса к происходящему, утратой работоспособности, усталостью, периодами продолжительного беспокойного сна, раздражительностью, сильной депрессией, навязчивым желанием вновь употребить препарат.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* Метамфетамин активнее амфетамина и более токсичен. Тем не менее, эти вещества обладают сходными фармакокинетическими параметрами. Быстро и полно всасываются в желудочно-кишечном тракте: начало их действия отмечается через 30 сек при внутривенном введении и через 5 – 15 мин – при интраназальном приеме. Длительность действия составляет от 4 до 12 ч. После внутривенного введения максимум концентрации амфетамина в плазме отмечается через 1 ч. При оральном приеме амфетамина его концентрация в плазме крови достигает максимального значения через 2 ч, а при курении метамфетамина – через 7 мин. Период полуэлиминации амфетамина ( $t_{1/2}$ ) из плазмы крови составляет 8–12 ч. В зависимости от характера питания эта величина колеблется от 8 ч (7 – 14 ч) при кислой диете и до 22 ч (18 – 34 ч) – при щелочной.  $T_{1/2}$  метамфетамина составляет 4 – 9 ч. Степень связывания амфетамина и метамфетамина с белками плазмы крови составляет 15 – 40%, объем распределения – 3 – 4 л/кг.

Амфетамин и метамфетамин распределяются по всему организму, легко проникают через гематоэнцефалический барьер и после внутривенного введения достигают головного мозга за несколько секунд. При курении метамфетамин сначала конденсируется в ткани легких, откуда проникает в кровяное русло.

Основной путь биотрансформации амфетамина – дезаминирование, метамфетамина – N-деметилирование. Гидроксилированные метаболиты образуют конъюгаты с глюкуроновой и серной кислотами. Основная масса метаболитов биологически неактивны, за исключением пара-гидрокси-метамфетамина, пара-гидрокси-амфетамина и пара-гидрокси-норэфедрина, обладающих биологической активностью.

Выведение амфетамина и метамфетамина осуществляется преимущественно через почки с мочой. Через 24 ч от момента употребления в неизменном виде выводится: амфетамина – 20 – 30% от введенной дозы, метамфетамина – 22 – 44%. Элиминация веществ существенно зависит от pH мочи. При условиях метаболизма, обуславливающих формирование мочи щелочной реакции, за 24 часа выводится около 40 – 45% всей дозы амфетамина, при этом неизмененный амфетамин составляет 2% дозы; с кислой мочой выводится до 78% дозы, неизмененный амфетамин при этом составляет 67 – 73% дозы. После употребления метамфетамина его метаболически неизменная фракция в щелочной моче составляет 2% дозы, тогда как доля метаболита амфетамина – менее 0,1% дозы. В кислой моче за 24 часа метамфетамин выводится в неизменном виде в объеме 76% дозы, а в виде метаболита амфетамина – 7% дозы.

**MDMA** (3,4-метилendioксиметамфетамин) – вещество, являющееся метилendioксипроизводным метамфетамина. Одно из его распространенных названий – «экстази». На нелегальном рынке реализуется в виде таблеток, имеющих различную маркировку и окраску, или в виде белого порошка.

MDMA является мощным психостимулятором и вызывает амфетаминоподобные эффекты. Однако, модификация структуры вещества (введение в бензольное кольцо циклического 3,4-метилendioкси-заместителя) привела к некоторому отличию MDMA от родоначальника – амфетамина. Отличительной особенностью MDMA является способность влиять на серотониновую систему мозга, что сказывается на характере вызываемого опьянения. По сути это вещество является энтактогеном. Под его воздействием возникают эйфория и особое психическое состояние, проявляющееся в расширении и обострении эмоционального восприятия: возникает чувство эмоциональной близости и повышенного доверия к окружающим.

MDMA, как и другие психостимуляторы, способен вызывать зависимость, а негативные последствия его употребления подобны тем,

которые развиваются при употреблении амфетамина и метамфетамина. Продолжительное употребление MDMA может привести к изменению личности, неожиданным приступам ярости, а также депрессии, не прекращающейся в течение многих лет, и суицидным попыткам.

*Особенности фармакокинетики и метаболизма.* После орального приема MDMA фармакологический эффект проявляется через 30 – 45 мин, достигает максимума через 1 – 1,5 ч и продолжается от 3 до 10 ч (в среднем 4 – 6 ч). MDMA быстро всасывается в ЖКТ и через 15 – 30 мин обнаруживается в плазме крови, максимальная его концентрация в ней отмечается через 1,5 – 3 ч и понижается до половины пиковой примерно через 8 ч. Период полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) MDMA из плазмы крови составляет 5,8 – 8,4 ч (в среднем 7,6 ч).

Метаболизм MDMA осуществляется в печени в основном с участием изоферментов CYP2D6 и CYP3A4 системы цитохрома P 450; при этом образуются 6 идентифицированных метаболитов, три из которых, включая MDA (3,4-метилendioксиамфетамин или тенамфетамин), являются психоактивными веществами. Через 24 ч от момента употребления 65% MDMA выводится из организма с мочой в неизменном виде и 7% вещества метаболизируется до MDA.

**Катинон** – алкалоид, содержащийся в растении кат (*Catha Edulis*) – кустарнике, произрастающем в Восточной и Южной Африке, на Аравийском полуострове. Первым синтетическим наркотическим веществом – производным катинона был эфедрон, синтезированный в 1982 г. в СССР.

Катинон – сильное наркотическое вещество, которое по своему опьяняющему эффекту, действию на организм и токсичности сравним с амфетамином. Однако, у катинона в меньшей степени выражены локомоторная активность, поведенческие эффекты, вазопрессорное влияние, в то же время он обладает более высоким анорексигенным действием. На основании различий в

характере нарушений дифференцировки зрительных стимулов, вызываемых катиноном и амфетамином, первый оказывается ближе к галлюциногенам.

В последние годы все большее распространение получают синтетические производные катинона, основу которых представляет фенилэтиламин с кетогруппой в  $\beta$ -положении: меткатинон (эфедрон), мефедрон (пара-метилэфедрон или 4-ММС), метедрон, пара-метилэткатинон (4-МЕС), буфедрон, метилон, бутилон (bk-MBDB), этилон (bk-MDEA), производные пировалерона – MDPV (метилендиоксипировалерон) и альфа-PVP (альфа-пирролидинопентиофенон) и др. Они представляют собой порошки белого или коричневого цвета, реже встречаются в форме таблеток. Употребляют эти вещества различными способами: вдыхают через нос, вводят внутривенно, принимают внутрь. На нелегальном рынке синтетические производные катинона часто реализуются под видом «солей для ванн», «подкормки для растений» и т.д., а структура действующих веществ постоянно меняется с целью обойти антинаркотическое законодательство. В настоящее время известно более 50 различных производных катинона, обладающих психотропной активностью.

Сведения о фармакокинетике синтетических производных катинона довольно ограничены. Эти вещества по своей структуре близки к производным амфетамина, однако из-за более высокой гидрофильности их способность проникать через гематоэнцефалический барьер снижена, что несколько ослабляет фармакологическое действие на организм.

Механизм действия новых синтетических производных катинона пока изучен недостаточно, но уже убедительно показано, что данные вещества способны вызывать выраженную зависимость. Кроме того, их влияние на центральную нервную систему носит крайне разрушительный характер: синтетические катиноны способны вызывать выраженные психозы, трудно поддающиеся лечению и развивающиеся порой при первом единичном употреблении.

**Эфедрон** (меткатинон) – синтетический психостимулятор. Популярность его на постсоветском пространстве была обусловлена возможностью изготовления кустарным способом из эфедрина или псевдоэфедрина, которые, обладая способностью вызывать расширение бронхов, входят в состав лекарств от кашля и астмы. Употребляют эфедрон в основном внутривенно. После его приема наступает сильный амфетаминоподобный эффект. Действует наркотик непродолжительное время – 2 – 3 ч, что вынуждает наркозависимых повторять инъекции многократно в течение одного дня. В результате отмечается стремительный рост толерантности. Последствия для психического и физического здоровья подобны тем, что вызываются другими наркотиками амфетаминовой группы.

Меткатинон при пероральном употреблении быстро всасывается в желудочно-кишечном тракте, максимальной концентрации в крови достигает через 2 – 3 ч от момента употребления. Период полуэлиминации  $t_{1/2}$  из плазмы крови составляет 3 – 6 ч. Метаболизм осуществляется преимущественно в печени. 20 – 30% введенной дозы выводится с мочой через 12 – 16 ч, за 24 ч – 70 – 90% общей дозы. На метаболизм меткатинона существенно влияет pH мочи: при кислых значениях отмечается максимальное выведение вещества в неизменном виде и увеличение периода полувыведения, в щелочной моче увеличивается экскреция метаболитов и уменьшается длительность периода полуэлиминации меткатинона.

**Мефедрон** (пара-метилэфедрон) и его аналоги (более известные на нелегальном рынке как «Кристалиус») являются симпатомиметиками и стимуляторами, действуют как стимуляторы высвобождения и ингибиторы обратного захвата моноаминов-нейромедиаторов. По вызываемым эффектам мефедрон напоминает сразу несколько наркотиков: по характеру эйфории близок к амфетамину, в то же время, подобно MDMA, вызывает ощущение принятия, близости, нежности, доброты и любви, а по времени развития и непродолжительности действия эффектов (2 – 3 ч) напоминает кокаин. При

употреблении мефедрона в высоких дозах отмечаются беспокойство, паранойя, депрессия, увеличенное потоотделение, неконтролируемое сокращение челюстных мышц.

*MDPV* (метилендиоксипировалерон) – психостимулятор, действующий как ингибитор обратного захвата дофамина и норадреналина. Впервые был синтезирован в 1960-х гг. с целью использования для лечения хронической усталости, сонливости, а также отсутствия аппетита. В настоящее время в медицинских целях не используется. *MDPV* является практически чистым стимулятором, однако в некоторой степени оказывает эмпагогенное и энтактогенное действие, подобно MDMA, а также проявляет себя как афродизиак, в чем схож с метамфетамином. Эйфория, вызываемая *MDPV*, непродолжительна и после 20 – 30 мин эйфорического состояния наступает состояние чистой стимуляции.

Употребляют метилендиоксипировалерон перорально, интраназально или парентерально. При дозировках 10 – 15 мг он действует как стимулятор, производящий сопутствующий эйфорический эффект, а также как афродизиак. Длительность эффектов составляет примерно от 2,5 до 6 ч (в среднем 3 – 4 ч).

В низких дозах (2 – 3 мг) *MDPV* повышает сосредоточенность и работоспособность, действуя подобно повышенным дозам кофеина, однако, обладает мощным эффектом «редоза» (желания повторного дозирования). Многие пользователи после первичных доз в 5 – 15 мг предпочитают принимать его каждый час или два, чтобы продлить относительно короткий период его активного действия. В этом случае последующие дозы, как правило, меньше начальной.

Эффекты употребления *MDPV* сводятся к психической и физической стимуляции, учащению сердечных сокращений. Развитие побочных эффектов возрастает с увеличением дозы, при этом отмечаются усталость, потеря аппетита, нарушение сна, мышечное напряжение, судороги челюстных мышц, бруксизм, произвольные движения тела (подергивания, чмоканье губами и

др.), тремор, головокружение, нистагм, нервозность, волнение, чрезмерное возбуждение, беспокойство, раздражительность, подавленное настроение, помрачение сознания, тяжелые и длительные панические атаки, мысли о самоубийстве. На следующие сутки после приема развивается усталость, боли в мышцах, нарушение концентрации внимания, головная боль, сухость во рту, тревога, страх.

Регулярное применение MDPV быстро приводит к развитию толерантности и к энергетическому дисбалансу в виде депрессии, слабости, головной боли и других негативных последствий. При передозировке возникает тахикардия, гипертензия, беспокойство, тревожное состояние, различные психотические расстройства, бессонница.

Синдром отмены MDPV проявляется в достаточно тяжелой форме, характерными его симптомами являются депрессия, головные боли, тревожно-паническое состояние, ортостатическая артериальная гипертензия, ригидность мышц.

Основная биотрансформация MDPV осуществляется в печени при участии изофермента CYP2D6 системы цитохрома P 450 с образованием небольшого количества метаболитов, которые связываются с остатками глюкуроновой кислоты и в таком виде выводятся почками.

*Альфа-PVP* (альфа-пирролидинопентиофенон) по силе действия превосходит MDPV. Альфа-PVP ингибирует захват дофамина, что является причиной его мощных стимулирующих свойств, в меньшей степени влияет также на концентрацию норадреналина и серотонина. Относится к стимуляторам с энтактогенными эффектами, проявляющимися в основном в повышенных дозах.

Потенциальная доза в 3 – 5 раз выше, чем у MDPV: при пероральном приеме действующая доза составляет в среднем 40 мг, при парентеральном – 25 мг, а при потреблении способом курения или интраназально – 10 – 20 мг. Продолжительность действия в средних дозах невысокая – 3 – 4 ч, но альфа-

PVP (в отличие от MDPV) вызывает достаточно длительную и интенсивную эйфорию.

Психостимулирующее действие выражается в повышении умственной и физической работоспособности, увеличении скорости рефлексов, энтактогенное – в ощущении особой близости к окружающим людям вплоть до деэгофикации и деперсонализации. Побочные эффекты имеют сходный характер с эффектами, вызываемыми приемом MDPV, но выражены они в гораздо меньшей степени. В низких и средних дозах они вообще не проявляются. Токсичность и эффекты от длительного приема альфа-PVP в настоящее время досконально не изучены, что делает использование данного вещества весьма опасным. Не исключены гепатотоксические, нейротоксические свойства, а также возникновение необратимых психических расстройств при употреблении этого вещества.

### **Введение в химико-токсикологический анализ**

*Химико-токсикологический анализ (ХТА)* – аналитическое исследование, целью которого является идентификация токсикантов, а при необходимости – количественное определение их содержания в исследуемом объекте.

В ХТА наркотических средств и психотропных веществ можно выделить два основных направления: *судебно-правовое*, целью которого является доказательство употребления наркотического средства либо психотропного вещества, и *клиническое*, заключающееся в диагностике состояний острой интоксикации, вызванных употреблением наркотических средств или психотропных веществ.

В соответствии с требованиями обеспечения высокой надежности и достоверности результатов химико-токсикологического исследования (ХТИ), а также согласно рекомендациям ВОЗ и общепринятым мировым стандартам, лабораторное исследование с целью идентификации наркотических средств и

психотропных веществ должно состоять из 2-х основных этапов: предварительного и подтверждающего.

Для осуществления предварительного (а при отрицательном результате – и окончательного) этапа исследования во всех предложенных унифицированных методиках используется иммунохроматографический (ИХ) экспресс-анализ, выполняемый методами «сухой химии». Отрицательный результат теста свидетельствует об отсутствии определяемого наркотического средства; положительный результат дает представление о группе веществ, к которым относится определяемое вещество, поэтому ориентирует на выполнение дальнейших этапов исследования с целью установления конкретного анализа (рисунок 1).

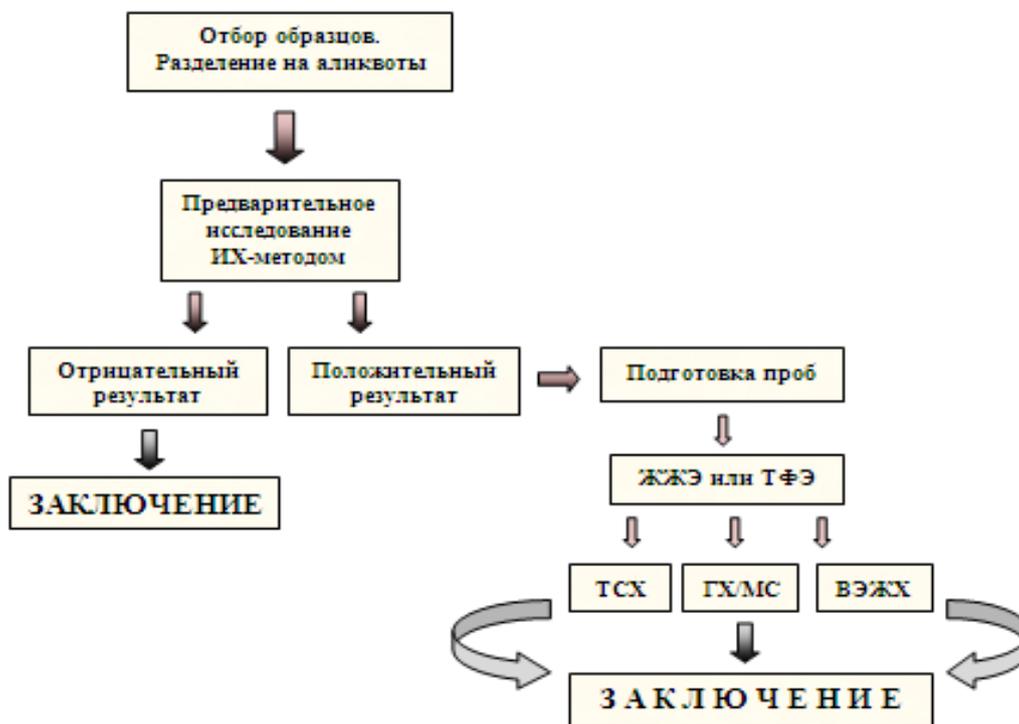


Рисунок 1. Схема, отражающая этапы выполнения исследований психоактивных веществ

В основу методологии ХТА положены 2 варианта проведения исследования: направленное (целевое) и ненаправленное (скрининг). Особенностью проведения 1-го варианта исследования является необходимость подтверждения наличия в биологическом объекте известного токсиканта

(предполагаемого источника отравления). При проведении целевого исследования допускается применение только одного аналитического метода, при этом необходимо использовать наиболее надежные способы подготовки проб, исходя из физико-химических свойств определяемого соединения.

Ненаправленное исследование более сложное и требует многоступенчатой методики исследования, поскольку ставится задача охватить большое количество отличающихся по химической природе веществ с различными физико-химическими свойствами. Иными словами, скрининг – это анализ на неизвестное вещество, который осуществляется в два этапа:

1. Обнаружение групповой принадлежности вещества.
2. Непосредственная идентификация индивидуального токсиканта.

В любом варианте проведения химико-токсикологического исследования ставится задача: исключить ложно отрицательные и ложно положительные результаты. Первые связаны с недостаточной чувствительностью аналитического метода, а вторые – с его относительно низкой специфичностью.

Надежность результатов ХТА определяется:

- соблюдением правил отбора проб биологических жидкостей, их хранения и доставки в химико-токсикологическую лабораторию;
- выбором оптимального способа подготовки проб биологических жидкостей к исследованию;
- правильным выбором аналитического метода и осуществлением контроля качества лабораторных исследований;
- знанием природы анализируемого вещества, способов введения в организм и особенностей распределения в его тканях, путей метаболизма и экскреции.

Достоверность результатов химико-токсикологического анализа во многом определяется правильным выбором аналитического метода исследования, для чего необходимо учитывать такие его характеристики, как чувствительность и специфичность. *Чувствительность* аналитического метода определяется отношением сигнала анализируемого вещества к сигналу базовой

линии и выражается в большинстве случаев в размерности «миллиграммы на литр» (мг/л) биологической жидкости. Выбор метода с низкой аналитической чувствительностью приводит к получению ложноотрицательных результатов. Под *специфичностью* понимают способность метода отличать химическую структуру определенного соединения от структуры ему подобных аналогов. Соответственно, выбор аналитического метода с низкой специфичностью может привести к получению ложно положительного результата.

Важными характеристиками аналитических методов исследования являются показатели критериев «предел обнаружения» и «избирательность метода». *Предел обнаружения* – наименьшее количество массы вещества (или минимальная его концентрация), которое может быть обнаружено аналитическим методом при определенной технике эксперимента с определенной доверительной вероятностью. Предел обнаружения устанавливается на основе контрольного опыта, полностью повторяющего ход анализа реальной пробы. Предел обнаружения и чувствительность метода связаны между собой соответствующей зависимостью: чем ниже предел обнаружения, тем более чувствителен метод. *Избирательностью* называют возможность определения одного вещества (элемента, иона и т.д.) в присутствии других, сопутствующих ему. Выполнение химико-токсикологических исследований должно осуществляться в условиях, позволяющих достигать наименьшего предела обнаружения и наилучшей избирательности используемого метода.

Получение достоверного результата химико-токсикологического исследования не возможно без осуществления контроля качества лабораторных исследований. В ХТА для этой цели используются стандартные вещества, эталонные и рабочие растворы.

*Стандартные вещества* – чистые вещества в стабильной форме, свободные от каких-либо наполнителей или других фармацевтических материалов и являющиеся основой для приготовления эталонных растворов.

Стандартные вещества должны иметь 100%-ную чистоту, известные молекулярную формулу и массу, а также находиться в стабильной форме соли, кислоты или основания.

*Эталонные растворы* – растворы стандартного вещества точной концентрации в дистиллированной или деионизированной воде, либо в органическом растворителе. Они применяются для аналитического контроля и (или) калибровки аналитических приборов. Эталонные растворы готовятся в мерной лабораторной посуде не ниже II класса точности путем точного взвешивания стандартного вещества и растворения полученной навески в точном объеме растворителя. Для обеспечения устойчивости эталонных растворов в течение длительного времени их хранение осуществляется в холодильнике или в морозильной камере в стеклянных виалах с плотно закрывающимися крышками.

*Рабочие растворы стандарта* готовят путем добавления к определенному объему основного эталонного (калибровочного, градуировочного) раствора воды или (если это обуславливается химической природой эталона) – органического растворителя до заданного объема (например, 1 л) с использованием точной мерной посуды (мерных колб). К тому же, водные рабочие растворы используются тех случаях, когда необходимо избежать влияния органических растворителей на экстракционные характеристики некоторых веществ; они применяются и для проверки удерживаемых объемов в жидкостной хроматографии.

Для построения калибровочных (градуировочных) графиков используются *калибровочные* (градуировочные) растворы с разной концентрацией стандартного вещества.

Присутствующие в биологических жидкостях эндогенные или экзогенные вещества, не являющиеся предметом ХТИ и именуемые фоном биоматрицы, нередко могут искажать результаты исследования. Фон – аналитический сигнал, являющийся результатом совместного действия компонентов

биоматрицы, вводимых реагентов и операций, производимых с образцом, – вплоть до момента измерения. Для того, чтобы свести влияние фона к минимуму, в ходе химико-токсикологического анализа биологической жидкости сначала исследуется холостой, а затем контрольный образец.

*Холостой образец* (холостой опыт) – биологический образец, идентичный по составу биоматрице контрольного образца, но не содержащий искомого вещества. Холостой опыт позволяет определить систематическую ошибку, именуемую фоном.

*Контрольный образец* (модельный опыт) – биологический образец, содержащий анализируемое вещество известной концентрации в биоматрице, идентичной исследуемым объектам, и используемый для осуществления контроля качества химико-токсикологического исследования путем использования его в одной серии с анализируемым образцом.

Расчет количественного содержания наркотических средств или психотропных веществ в биологических жидкостях может осуществляться двумя методами: методом абсолютной калибровки и методом внутреннего стандарта. *Метод абсолютной калибровки* заключается в последовательном вводе в аналитический прибор калибровочных растворов различной концентрации, после чего на основе связи между величиной сигнала (для газовой хроматографии – между площадью или высотой полученных пиков) и количеством введенного вещества строятся калибровочные графики, которые в дальнейшем применяются для расчета содержания вещества в исследуемом объекте. Метод абсолютной калибровки требует выполнения операций с высокой точностью и является достаточно трудоемким. Поэтому в количественном анализе для расчета содержания анализируемого вещества в биологическом объекте наиболее часто используется метод внутреннего стандарта.

*Внутренний стандарт* – соединение, химически идентичное анализируемому, точное количество которого добавляется к биологическому

образцу до начала анализа (до этапа подготовки пробы). Расчет количественного содержания аналита в пробе осуществляется по соотношению величины сигнала (для газовой хроматографии – площади пиков) внутреннего стандарта и исследуемого вещества. Большое достоинство метода внутреннего стандарта состоит в том, что при его использовании результаты измерений не зависят от нестабильности работы хроматографа и детектора, так как эти факторы в равной мере влияют на определяемое и стандартное соединение. Внутренний стандарт может быть использован не только для расчета количественного содержания вещества в биологических жидкостях, но и для оценки качества выполнения лабораторного исследования.

### **Характеристика биологических объектов**

Химико-токсикологическое исследование биологических объектов осложняется наличием в них различных эндогенных и экзогенных веществ, не являющихся целью анализа. При всем этом биологические жидкости, как правило, характеризуются незначительным содержанием токсических веществ.

В качестве биологических объектов для выявления наркотических средств и психотропных веществ чаще всего используются сыворотка, плазма крови или моча. Сыворотку получают из спонтанно свернувшейся цельной крови. Для ее получения антикоагулянт не добавляют. Она не содержит факторов свертывания, за исключением кальция. При получении сыворотки в стеклянных центрифужных пробирках объем ее составляет около 1/3 взятого объема крови, но при некоторых патологических состояниях он может быть меньшим. В пробе нормальной крови сгусток образуется при комнатной температуре в течение 20 – 60 мин. Плазму получают из крови путем отделения ее клеток (форменных элементов) центрифугированием пробы; в противоположность сыворотке она содержит факторы свертывания.

Плазма имеет ряд преимуществ перед сывороткой:

- 1) меньшую опасность возникновения гемолиза;

- 2) большой выход жидкой части крови при центрифугировании (на 10 – 20% по сравнению с сывороткой, а при использовании коммерческих пробирок с антикоагулянтом – на 30 – 40%), что имеет немаловажное значение при проведении количественного определения аналитов;
- 3) более быстрое получение материала для исследования в связи с исключением этапа образования сгустка, что особенно важно при выполнении срочных анализов;
- 4) исключение потери части метаболитов за счет их разрушения в период инкубации, необходимой для получения сгустка.

Однако исследование сыворотки или плазмы крови нередко сопряжено с некоторыми трудностями. Так, в результате прибавления к крови антикоагулянта может происходить разрушение комплексов жирных кислот с белками, что вызывает увеличение содержания данных соединений в экстрактах. Другими эндогенными соединениями, затрудняющими исследование, могут быть стероидные гормоны и холестерин.

Наиболее доступным биологическим объектом является моча. Одно из ее преимуществ – возможность отбора пробы в достаточном для исследования объеме. Моча содержит незначительное количество белковых компонентов, что облегчает выделение и анализ исследуемых веществ. Концентрация анализируемых веществ в моче, как правило, выше, чем в других биологических объектах; кроме того, в моче, наряду с нативным соединением, выявляются и продукты его метаболизма, что повышает надежность идентификации веществ и увеличивает время, в течение которого возможно установить факт приема психоактивного вещества.

В то же время некоторые токсиканты присутствуют в моче в виде высокомолекулярных конъюгатов с глюкуроновой кислотой, которые, будучи полярными, не экстрагируются органическими растворителями; поэтому в ряде случаев при подготовке проб мочи необходимо введение предварительного этапа – гидролиза парных соединений, позволяющего разрушать данные

комплексы.

При выборе вида биологического объекта для ХТА необходимо учитывать цель химико-токсикологического исследования, а также фармакокинетические особенности анализируемых веществ. Например, для выявления состояния алкогольного опьянения необходимо проведение химико-токсикологического исследования крови, поскольку лабораторным критерием оценки воздействия этилового спирта на организм является уровень содержания этанола в крови в концентрации 0,3 г/л (0,3‰) и более. Исследование мочи может лишь подтвердить имевшее место употребление спиртного напитка, но не является основанием для установления заключения о наличии алкогольного опьянения, поскольку в конечной фазе элиминации этиловый спирт может определяться в моче, но при этом не будет обнаруживаться в крови. Одновременное исследование крови и мочи с целью определения концентрации этилового спирта целесообразно проводить в случаях, касающихся установления сроков давности употребления этанола.

Большинство наркотических средств и психотропных веществ обладают коротким периодом полуэлиминации ( $t_{1/2}$ ) из плазмы крови, что позволяет обнаруживать их в плазме в течение небольшого промежутка времени (до нескольких часов от момента употребления). Длительным периодом полуэлиминации обладают лишь некоторые синтетические опиоиды: метадон ( $t_{1/2}$  от 24 до 72 часов), трамадол ( $t_{1/2}$  от 4 до 7 часов) и фентанил ( $t_{1/2}$  от 1,5 до 6 часов), а также фенobarбитал ( $t_{1/2}$  – до 14 суток).

Именно поэтому наиболее информативным биологическим объектом при выявлении наркотических средств или психотропных веществ является моча, поскольку с мочой выводятся все психоактивные вещества, частично – в неизменном виде, частично – в виде метаболитов. Период времени, в течение которого возможно выявление в моче наркотических средств и психотропных веществ, составляет от 24 до 72 часов и более – в зависимости от особенностей элиминации анализируемых веществ, а также от аналитических характеристик,

используемых в ходе исследования методов ХТА.

### **Способы подготовки проб биологических жидкостей**

Для подготовки проб биологических жидкостей к химико-токсикологическому исследованию используют различные способы изолирования веществ из биологических объектов: жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ), твердофазную экстракцию (ТФЭ), диализ, озоление, микродиффузию, различные виды перегонки. Наиболее распространенными способами подготовки проб к аналитическому исследованию являются экстракционные, состоящие в использовании ЖЖЭ и ТФЭ.

*Экстракция* – метод разделения, основанный на избирательном извлечении одного или нескольких компонентов анализируемой смеси при помощи органических растворителей (экстрагентов). Поскольку биологические жидкости организма человека являются водной фазой, в качестве экстрагентов применяются несмешивающиеся с водой органические растворители. Переход экстрагируемого вещества в фазу органического растворителя происходит путем диффузии по градиенту концентраций до тех пор, пока не наступит равновесие концентраций вещества в водной фазе и фазе органического растворителя. Метод экстракции нашел широкое применение в химико-токсикологическом анализе для подготовки проб к исследованию, поскольку в процессе его осуществления не происходит химическое превращение выделяемых веществ и не образуются побочные продукты. Применение экстракции позволяет переводить вещества из сильно разбавленных растворов в небольшой объем органического растворителя; полученные экстракты со значительно большей концентрацией определяемого вещества пригодны для исследования любым аналитическим методом ХТА.

**Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)** отличается универсальностью, простой техникой исполнения и позволяет эффективно разделять сложные многокомпонентные смеси. Принцип ЖЖЭ заключается в

распределении растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, одной из которых является вода (биологическая жидкость), а другой – несмешивающийся с водой органический растворитель (экстрагент). Необходимо отметить, что в органических растворителях лучше растворяются неионизированные формы соединений, поэтому важной характеристикой извлекаемых веществ является степень ионизации их функциональных групп, которая характеризуется величиной показателя диссоциации ( $pK_a$ ).

Практически все токсиканты, в том числе и наркотические средства, по физико-химическим свойствам относятся к веществам кислого, основного либо нейтрального характера. По теории электролитической диссоциации Аррениуса – Оствальда кислоты – это вещества, образующие в водном растворе ионы: гидратированные катионы водорода  $H^+$  (ионы гидроксония) и анионы кислотного остатка. Основания – вещества, диссоциирующие в водном растворе с образованием катиона металла и гидроксид-анионов ( $OH^-$ ). Сила кислоты и основания характеризуется их *константами диссоциации* ( $K$ ), которая выражается уравнением: для кислоты (НА):  $K = [H^+] \times [A^-] : [НА]$ ; для основания (МеОН):  $K = [Me^+] \times [OH^-] : [МеОН]$ .

Для представления констант диссоциации в виде справочных данных используют понятие показателя ионизации. *Показатель ионизации* – величина, обратная логарифму констант основной или кислотной ионизации:

$$pK_a = - \lg K$$

где  $pK_a$  – показатель ионизации;

$K$  – константа диссоциации.

В водном растворе величина показателей ионизации кислот и оснований колеблется от 0 до 14. Низкие значения  $pK_a$  (от 0 до 5,5) указывают на высокую степень ионизации и сильные кислотные свойства. Для веществ основного характера  $pK_a$  составляет от 7,0 до 14,0. Показатель ионизации от 5,5 до 7,0 характерен для химических соединений слабокислого или нейтрального характера.

Степень ионизации зависит от pH среды. Поскольку для повышения эффективности процесса извлечения вещества из водной фазы необходимо перевести его в неионизированное состояние, оптимальное значение pH составляет  $pK_a \pm 2$  единицы. Таким образом, при проведении ЖЖЭ необходимо создать pH равную: для кислот  $pK_a - 2$ , а для оснований  $pK_a + 2$ .

Важной количественной характеристикой процесса ЖЖЭ является *степень экстракции* (процент экстракции), которая определяется отношением количества экстрагированного вещества к общему количеству этого вещества в водной фазе:

$$R = \frac{A}{N \times 100}$$

где R – степень экстракции, %;

A – количество вещества в фазе органического растворителя, мг/л;

N – общее количество вещества в водной фазе, мг/л.

На степень экстракции влияет ряд факторов: природа экстрагируемого вещества, природа экстрагентов, температура, pH среды, наличие электролитов в водных растворах. Количество экстрагированного вещества зависит от степени его диссоциации в водной фазе: недиссоциированные молекулы в процессе экстракции переходят в фазу органического растворителя, в то время как ионы гидратируются молекулами воды и вследствие этого остаются в водной фазе и не экстрагируются органическими растворителями.

Органические растворители, используемые в качестве экстрагентов при подготовке проб биологических жидкостей, должны соответствовать ряду требований:

- обладать избирательностью: извлекать из водной фазы анализируемое вещество или определенную группу веществ;
- иметь незначительную растворимость в воде и не растворять воду;
- иметь температуру кипения не ниже  $50^{\circ}\text{C}$  и не выше  $80^{\circ}\text{C}$ . Низкокипящие растворители даже при комнатной температуре быстро испаряются, что

приводит к уменьшению объема экстрагента и служит причиной ошибок при количественном анализе. Использование растворителей с высокой температурой кипения может привести к получению ложно отрицательного результата, поскольку при температуре выше 80°C возможно разрушение анализов;

- отличаться от плотности воды, во избежание образования эмульсий;
- не быть взрывоопасными и сильно ядовитыми.

Одним из вариантов совершенствования процесса экстракции является применение электролитов (*высаливание*). Эффект высаливания заключается в снижении растворимости веществ в водных растворах под воздействием электролитов, вследствие чего повышается экстрагируемость анализируемых веществ. При этом большое значение имеет природа электролита (высаливателя): чем меньше радиус иона, тем более выражено высаливающее действие. Наиболее эффективными высаливателями являются инертные соли II или III валентных металлов.

ЖЖЭ в классическом варианте является достаточно простым и рентабельным способом подготовки проб, однако обладает рядом недостатков: в ходе ее проведения возможно образование эмульсий, что приводит к недостаточному разделению фаз, используются большие объемы органических растворителей, кроме того, для повышения эффективности выделения анализов из биологических жидкостей зачастую необходимо проведение многократной экстракции.

В настоящее время в качестве альтернативного варианта предлагается модифицированная **ЖЖЭ на колонках EXtrelut<sup>®</sup> NT**, которая представляет собой одностадийную жидкостную экстракцию, является простой в исполнении, обладает достаточно высокой эффективностью, позволяет снизить расход органических растворителей, а также получать высокочистые экстракты.

ЖЖЭ «EXtrelut» выполняется с помощью стеклянных или полиэтиленовых колонок, заполненных инертным сорбентом, в качестве которого используется специально обработанный пористый диатомит с большим объемом пор. Водная проба наносится на сорбент, где распределяется в виде тонкой пленки и выполняет функции неподвижной жидкой фазы. В дальнейшем осуществляется элюирование аналитов несмешивающимися с водой органическими растворителями, при этом все липофильные вещества экстрагируются из водной фазы в органическую (рисунок 2).

Объем растворителя должен не менее, чем в 2-3 раза превышать объем введенной в колонку пробы биологической жидкости. Максимальный объем вносимой пробы может составлять 1, 3 или 20 мл, в зависимости от емкости используемых колонок. Важным преимуществом ЖЖЭ на колонках EXtrelut® NT является широкий диапазон pH – от 1 до 10, что дает возможность фракционирования из биологических жидкостей веществ как кислого, так и основного характера.

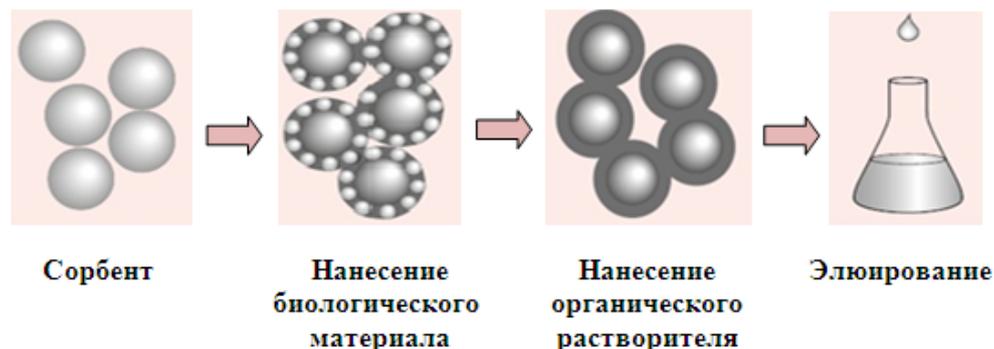


Рисунок 2. Принцип жидкость-жидкостной экстракции на колонках EXtrelut

**Твердофазная экстракция (ТФЭ).** Для получения из биологического материала извлечений с незначительным содержанием эндогенных соединений (для концентрирования анализируемых веществ) рекомендуется использовать метод твердофазной экстракции. В основе метода лежит принцип колоночной хроматографии, который заключается во взаимодействии распределенных в матрице компонентов с твердой фазой. Матрица представляет собой

газообразную или жидкую среду, в которой растворяется исследуемый объект, а твердая фаза - специальный сорбент, заключенный между двумя пористыми фильтрами. Взаимодействия компонентов смеси с твердой фазой являются обратимыми и могут осуществляться по типу гидрофобных (Ван-дер-Ваальсовы силы), полярных (водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия) или ионообменных.

Концентрирование анализируемого соединения (или группы соединений) и удаление фоновых веществ в ходе проведения ТФЭ выполняется с помощью микроколонок (патронов или картриджей), заполненных твердыми сорбентами. В качестве сорбентов применяют модификации силикагеля, содержащие амино-, нитрильные, полиольные группы, углеводородные привитые фазы и др. В зависимости от веществ, используемых для модификации сорбента, изготавливают различные типы патронов для твердофазной экстракции.

После сорбции биоматериала фоновые вещества с сорбента вымываются водой или буферными смесями, а затем осуществляется десорбция анализируемых соединений селективным органическим растворителем.

Использование различных типов патронов, а также возможность выбора разнообразных органических растворителей в качестве элюентов позволяет с высокой скоростью и эффективностью проводить одновременно разделение, выделение, очистку и концентрирование веществ. Одним из преимуществ ТФЭ также является возможность многократного (до 50 раз – в зависимости от типа сорбента) использования патронов.

В процессе ТФЭ разделение компонентов, содержащихся в исследуемом образце, может происходить тремя различными путями:

1) примеси и все мешающие компоненты удерживаются на патроне, а определяемые вещества проходят через него;

2) примеси и мешающие компоненты проходят через патрон, а определяемые вещества сорбируются на патроне, после чего вымываются более полярным растворителем;

3) определяемые вещества и мешающие компоненты сорбируются на патроне, после чего могут фракционироваться за счет применения ступенчатого элюирования, заключающегося в изменении рН или использовании элюирующих растворителей разной ионной силы.

ТФЭ может применяться для подготовки проб с последующим исследованием любыми аналитическими методами ХТА. Типы используемых для ТФЭ сорбентов, а также этапы ее проведения зависят от свойств анализируемых веществ. В настоящее время разработаны различные типы патронов для ТФЭ, позволяющие селективно извлекать из биологических жидкостей вещества определенных групп.

Одним из новых методов подготовки биологических образцов является *SPME* (*Solid Phase Microextraction*) – автоматизированная твердофазная микроэкстракция (или микроэкстракция шприцем, заполненным сорбентом). Принцип SPME основан на сорбции компонентов пробы на нить с полимерным покрытием и последующей термической десорбции в предварительно нагретом инжекторе газового хроматографа. Нить помещена в иглу ручного шприца или шприца автосэмплера. Поверхность нити покрыта слоем сорбирующей фазы (на основе полиметилдисилоксана, карбовакса, стирол/дивинилбензольного сополимера и т.п.), которая селективно удерживает компоненты анализируемой пробы. После прокола мембраны виалы с пробой биологической жидкости, нить выдвигается из шприца в пробу и выдерживается время, необходимое для наступления динамического равновесия между концентрацией аналита в жидкой фазе и на поверхности нити. После этого нить убирается в иглу, шприц извлекается и вводится в нагретый инжектор хроматографа, где нить снова выдвигается и происходит термическая десорбция сконцентрированных компонентов в ток газа-носителя хроматографа (рисунок 3).



Рисунок 3. Этапы твердофазной микроэкстракции

Широкое применение для подготовки проб к химико-токсикологическому исследованию нашел метод микротвердофазной экстракции на основе *SBSE* (*Stir Bar Sorptive Extraction*) с использованием экстрагирующего стержня «Twister»™. «Twister»™ представляет собой стеклянную палочку для магнитной мешалки с полидиметилсилоксановым (PDMS) покрытием, на котором осуществляется адсорбция веществ из анализируемого образца. Магнитная палочка помещается в емкость с биологической жидкостью и вращается в течение установленного промежутка времени, затем «Twister»™ извлекается из образца, высушивается и помещается в устройство TDU (термодесорбер), с помощью которого осуществляется ввод пробы в колонку.

Микроэкстракция с использованием устройства «Twister»™ является эффективным методом извлечения анализируемых веществ из проб со сложной матрицей. Значительным преимуществом данного метода экстракции является отсутствие необходимости использования органических растворителей, а также проведения стадии концентрирования органического экстракта. В отличие от стандартных патронов для ТФЭ магнитные палочки могут повторно использоваться более 50 раз без ухудшения экстрагирующей способности.

Применение методов SBSE и SPME позволяет максимально упростить процесс экстракции и значительно сократить время, необходимое для подготовки проб биологических жидкостей. Важно и то, что указанные методы подготовки проб совместимы только с газовой хроматографией, при этом для

ввода пробы в колонку необходимо наличие дополнительного устройства – термодесорбера.

**Метод термодесорбции** заключается в извлечении летучих компонентов из сорбента при нагревании потоком инертного газа и их ввод в аналитическую систему (газовый хроматограф).

Ввод пробы в колонку осуществляется в три стадии:

- 1 – десорбция с PDMS-фазы в режиме Splitless;
- 2 – улавливание компонентов в охлажденном испарителе;
- 3 – ввод пробы в колонку газового хроматографа в режиме быстрого нагрева.

В химико-токсикологическом анализе применяются следующие варианты термодесорбции:

1. *Одностадийная термодесорбция*, при которой вещества напрямую переносятся из сорбционной трубки в хроматографическую колонку.



Рисунок 4. Одностадийная термодесорбция

2. *Двухстадийная термодесорбция* используется для ввода анализируемых веществ узкой зоной в хроматографическую колонку. При ее проведении компоненты, извлеченные из сорбционной трубки, предварительно фокусируются и после этого узкой зоной направляются в хроматографическую колонку, что создает значительно более высокую чувствительность и эффективность разделения компонентов.



*Рисунок 5. Двухстадийная термодесорбция*

**Дериватизация.** В ходе исследования полярных веществ методом газовой хроматографии нередко возникают определенные трудности. Так, увеличение числа полярных групп в соединении приводит к снижению его летучести, вследствие чего снижается чувствительность и ухудшается воспроизводимость анализа. Поэтому при определении полярных малолетучих соединений после выполнения экстракции необходимо проведение этапа дериватизации, который позволяет исключить потери вещества, обусловленные низкой летучестью и сорбцией, а также улучшить характеристики газохроматографического анализа.

Дериватизация сводится к получению производных искомого вещества путем преобразования полярных групп в неполярные без изменения основной структуры молекулы. Целью реакции дериватизации является образование летучих производных тех веществ, которые в нормальных условиях являются нелетучими или малолетучими.

При осуществлении процедуры дериватизации большое значение имеет правильный выбор реагентов, который основан на учете следующих критериев:

- стабильность полученных дериватов,
- возможность образования для каждого соединения только одного вида деривата,
- отсутствие побочных продуктов реакции,
- отсутствие расщепления пиков дериватов на хроматограмме,
- достаточная эффективность хроматографического разделения анализируемых веществ – для получения интенсивных пиков в масс-спектре, обеспечивающих

высокую чувствительность.

В таблице 2 представлены основные способы дериватизации и рекомендуемые реагенты.

Таблица 2. Типы реакций дериватизации и используемые реагенты

<i>Реакции дериватизации</i>	<i>Реагенты для дериватизации</i>
Ацетилирование	уксусный ангидрид, трифторуксусный ангидрид, пентафторпропионовый ангидрид и др.
Алкилирование	диазометан и др.
Силилирование	BCA – (N,O-бис(триметилсилил)ацетамид, BSTFA – 1% TMCS-бис(триметилсилил)трифторацетамид + 1% триметилхлорсилан, MSTFA – N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид и др.

Дериватизацию необходимо проводить непосредственно перед газохроматографическим исследованием. Это связано с гидролитической неустойчивостью полученных дериватов, обуславливающей достаточно быструю потерю введенных групп, вплоть до образования исходных соединений.

Процедура дериватизации включает четыре последовательных этапа:

1. Упаривание досуха экстракта, полученного в ходе ЖЖЭ или ТФЭ.
2. Внесение в экстракт дериватизационного реагента, осуществляемое в двух вариантах:
  - а) путем разведения сухого остатка безводным растворителем с последующим добавлением дериватизационного реагента;
  - б) добавлением к сухому остатку смеси дериватизационного реагента и безводного растворителя.
3. Нагревание при температуре 70°C в течение 20 мин.
4. Введение в инжектор хроматографа 1 – 2 мкл анализируемого раствора.

Для дериватизации одного соединения можно использовать несколько реактивов в зависимости от числа функциональных групп, которые необходимо блокировать.

К преимуществам процедуры дериватизации можно отнести значительное

повышение качества хроматографического разделения полярных малолетучих соединений, что дает возможность определять низкие концентрации таких веществ в биологических объектах, поскольку исключаются потери веществ из-за низкой летучести и сорбции и улучшаются характеристики процедуры анализа за счет более точного определения площадей пиков и повышения чувствительности определения.

**Гидролиз парных соединений.** В ходе биотрансформации *in vivo* ксенобиотики переходят в более полярные (гидрофильные) соединения, чем исходное вещество, за счет присоединения или высвобождения активных функциональных групп, а также конъюгируют с эндогенными соединениями, такими как глюкуроновая кислота, глутатион, ионы сульфата, в результате чего образуются полярные соединения, легко выводимые почками или желчью.

Процесс экстракции конъюгированных метаболитов представляет большие трудности, что связано с их высокой полярностью, вследствие чего конъюгаты лучше растворяются в воде, чем в органических растворителях. Для разрушения химических связей конъюгированных веществ необходимо введение в процесс подготовки проб биологических жидкостей дополнительного этапа – гидролиза парных соединений. В ХТА применяются три вида гидролиза: ферментативный, кислотный и щелочной.

**Ферментативный гидролиз** осуществляется с помощью ферментов (например,  $\beta$ -глюкуронидазы) и является мягким процессом, в ходе которого образуется незначительное количество побочных продуктов, что позволяет получить более чистый гидролизованный образец. Недостатками этого вида гидролиза являются необходимость строгого соблюдения условий его проведения (поддержание определенного pH среды и температуры), длительное время инкубирования (от 60 мин до 16 часов), изменение активности фермента в зависимости от сроков хранения данного реагента, ингибирование фермента веществами, присутствующими в пробе (солями), а также высокая стоимость содержащего энзим препарата.

**Кислотный гидролиз** заключается в нагревании пробы мочи при температуре 100 – 120°C с растворами соляной кислоты различной концентрации, проводится в герметично закрытых сосудах, которые помещаются в кипящую водяную, глицериновую баню или нагревательный блок. При кислотном гидролизе эффективность высвобождения токсикантов из глюкуронидов зависит от соотношения объемов мочи и хлористоводородной (соляной) кислоты, а также от температуры. Как недостаток кислоты, так и снижение температуры нагревания ведут к неполному гидролизу.

Кислотный гидролиз прост в осуществлении, однако вследствие неспецифичности реакции расщепления ковалентной связи и довольно жестких условий проведения гидролиза (в среде соляной кислоты при кипячении в течение длительного времени), он сопровождается образованием большого количества побочных продуктов, влияющих на качество ХТИ. В результате при хроматографическом анализе гидролизата определяется высокий фон и большое число интенсивных посторонних пиков. В жестких условиях кислотного гидролиза происходит частичное или полное разрушение аналитов до продуктов метаболизма, в результате чего появляется возможность идентифицировать вещество по наличию его метаболитов (маркеров), на чем основаны методики выявления некоторых психоактивных веществ. Однако следует учитывать, что в процессе осуществления кислотного гидролиза возможно полное разрушение не только нативных веществ, но и продуктов их метаболизма.

**Щелочной гидролиз** – разрушение химических связей в высокощелочной среде – заключается в нагревании образца с насыщенным раствором едкого натра в герметично закрытых емкостях при температуре 40 – 60°C. Щелочной гидролиз является более мягким и менее длительным процессом в сравнении с кислотным и зависит только от температурного фактора. Вследствие щадящего воздействия щелочи на высокомолекулярные комплексы, содержащиеся в

биологической матрице, в ходе щелочного гидролиза получают более чистые экстракты и не происходит разрушение аналитов до продуктов метаболизма.

**Разрушение связей с белками.** Основными связывающими компонентами чужеродных веществ являются белки органов и тканей, а также плазменные белки. Степень связывания различных токсикантов с белками (характеризующая процесс их биологической инактивации) варьирует в широких пределах. Основными белками плазмы, связывающими большинство психоактивных веществ, является альбумин, в меньшей степени – глобулины. Конъюгация с белками существенно затрудняет процесс извлечения токсикантов из плазмы крови, поскольку образовавшиеся высокомолекулярные комплексы недостаточно эффективно экстрагируются органическими растворителями. Поэтому в процессе подготовки проб для разрушения комплексов анализируемых веществ с белками плазмы крови необходимо применение процедуры осаждения белков – депротеинизации.

Депротеинизация может осуществляться различными способами: с добавлением в качестве депротеинизирующих агентов хлорной, вольфрамовой или трихлоруксусной кислот, органических растворителей (метанола, ацетонитрила), солей металлов, ферментов, а также с использованием молекулярной фильтрации.

Одним из наиболее распространенных способов депротеинизации образцов плазмы крови является применение органического растворителя ацетонитрила, который позволяет готовить пробы для исследования любого аналита, связывающегося с белками. Для осаждения белков используется объем ацетонитрила, равный трехкратному объему пробы.

Однако следует учитывать, что в ходе депротеинизации могут возникать потери аналитов за счет их адсорбции осажденными белками.

## **Методы определения наркотических и психотропных веществ**

Аналитическое исследование биологического материала на предмет определения наркотических средств и психотропных веществ осуществляется в два этапа. Первый этап (скрининг) заключается в предварительной идентификации веществ, при этом в случае получения отрицательного результата дальнейшее исследование производить нецелесообразно.

При получении на первом этапе положительного результата, в обязательном порядке осуществляется второй этап ХТИ – подтверждающий целенаправленный анализ. В сравнении с предварительными подтверждающие методы должны иметь более высокую или равную чувствительность для уменьшения количества ложно отрицательных результатов и обладать более высокой специфичностью для снижения количества ложноположительных результатов.

Для проведения предварительного анализа наиболее часто применяются иммунологические методы исследования: иммунохроматографический, поляризационный флюороиммуноанализ, радиоиммунный анализ и другие. Преимуществом указанных методов исследования является отсутствие необходимости подготовки проб биологических жидкостей к выполнению анализа, а также быстрота его проведения. Однако использование этих методов анализа не исключает возможности получения ложно положительного результата из-за наличия кросс-реакций с веществами иной химической структуры. Большинство методов иммунного анализа могут указывать только на возможное содержание в организме тестируемого лица наркотического средства и его метаболитов: без определения их количества.

В качестве подтверждающих методов в ХТА используются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газовая хроматография с масс-спектральным детектированием (ГХ/МС), газожидкостная хроматография (ГЖХ) и хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ).

## Иммунохимические методы

Иммунохимические методы исследования, благодаря присущей им относительно высокой специфичности и чувствительности, а также предоставляемой возможности осуществления экспресс-анализа по технологии «сухой химии», применяются, как правило, на предварительном этапе ХТА.

Их сущность заключается в связывании определяемого соединения со специфическими антителами, полученными на конкретный анализ. Интерпретация результата проводится на основании детекции образовавшихся комплексов.

Ключевым компонентом иммунохимических методов, в значительной степени определяющим чувствительность и специфичность анализа, являются антитела – иммуноглобулины, продуцируемые лимфоцитами млекопитающих в ответ на введение в организм токсиканта. Антитела (Ат) характеризуются наличием в своей структуре специфических антигенсвязывающих центров, способных распознавать молекулы антигена и взаимодействовать с ними.

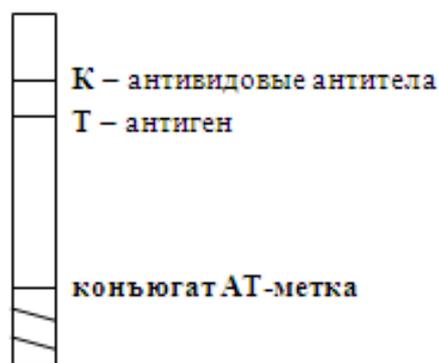
В ХТА нашли применение методы, представленные в таблице 3.

Таблица 3. Принципы иммунохимических методов анализа, используемых в ХТА

<i>Метод</i>	<i>Принцип метода</i>
<b>Иммунохроматографический метод (ИХ)</b>	Основан на протекании иммунной реакции антиген – антитело при движении образца биологической жидкости по полоске за счет капиллярных сил.
<b>Радиоиммунный анализ (РИА) –</b> радиоиммунологический или изотопный иммунологический анализ	Метод количественного определения <i>in vitro</i> биологически активных веществ (гормонов, ферментов, лекарственных препаратов) в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании таких веществ, находящихся в полученном от пациента биологическом материале, и аналогичных им меченных радионуклидом веществ, входящих в состав реактива (и те и другие являются антигенами), со специфическими антителами. Так как меченый антиген добавляют в

	определенном количестве, можно установить, какая часть его связалась с антителами и какая – осталась не связанной с антигеном в результате конкуренции с определяемым не меченным радионуклидом антигеном. Для осуществления РИА выпускают стандартные наборы реагентов, каждый из которых предназначен для определения концентрации конкретного вещества.
<b>Иммуноферментный анализ (ИФА)</b>	Метод качественного или количественного определения различных соединений, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала, следовательно, метод ИФА объединяет две последовательные реакции: иммунную и ферментативную. В ходе иммунной реакции происходит связывание обнаруживаемых молекул, а ферментативная реакция позволяет распознать и измерить результат иммунологической реакции.
<b>Поляризационный флюороиммунный анализ (ПФИА)</b>	Метод основан на конкурентном связывании со специфическими антителами определяемого антигена и антигена, меченного флуоресцентной меткой (трейсера).

Наиболее широко на предварительном этапе химико-токсикологического исследования применяется **иммунохроматографический анализ (ИХ)**, основанный на протекании иммунной реакции антиген – антитело при движении образца биологической жидкости по полоске за счет капиллярных сил. Интерпретация результата осуществляется путем визуальной (либо объективной: с использованием специальных отражательных фотометров) детекции окрашенных зон в определенных местах локализации иммунореагентов на различных участках полоски. Исследование выполняется с помощью экспресс-тестов (тест-полосок) на основе моноклональных антител (рисунок 6).



*Рисунок 6. Принцип работы тест-полоски*

На нижний участок тест-полоски нанесен конъюгат Ат-метка, состоящий из специфических к определенному анализу антител и метки – коллоидного золота. На тестовой линии иммобилизован антиген, а на контрольной линии – антивидовые антитела, специфические к первичным антителам. После погружения тест-полоски в исследуемую пробу биологическая жидкость поднимается по материалу носителя и проходит нижний участок с нанесенным на нем конъюгатом Ат-метка, который также начинает подниматься с током жидкости. При отсутствии в пробе определяемого антигена меченые антитела доходят до тестовой зоны, в результате чего происходит иммунная реакция с иммобилизованным антигеном с образованием окрашенной зоны.

В случае присутствия антигена в пробе (в концентрации, не ниже установленного порогового уровня) происходит связывание анализа с конъюгатом Ат-метки с образованием иммунного комплекса. В результате происходит блокировка активных центров связывания антител, и образовавшийся иммунный комплекс окажется не способным связаться с иммобилизованным антигеном в тест-зоне и будет продолжать продвижение по тест-полоске. В итоге тест-зона остается неокрашенной. Иммунный комплекс будет дальше продвигаться по полоске до участка с внутренним контролем, где формируется антивидовый иммунный комплекс, что приводит к образованию окрашенной контрольной зоны (рисунок 7).



*Рисунок 7. Визуальная оценка результатов иммунохроматографического исследования*

Окрашивание контрольной зоны является признаком (контролем) сохранности тест-полоски. Если окраска в этой зоне не обнаруживается, то иммунореагенты тест-полоски не активны. Поэтому результаты такого теста оценивать нельзя и следует повторить тестирование с помощью новой тест-полоски.

Существенным недостатком ИХ метода является возможность получения ложно положительных результатов из-за возможности протекания кросс-реакций с некоторыми веществами иной химической структуры. Поэтому при положительном результате для исключения ошибок в обязательном порядке необходимо проведение подтверждающего химико-токсикологического исследования другим, более специфичным, методом.

### **Хроматографические методы**

*Хроматография* – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюентом), протекающей через неподвижную.

#### ***Основные термины, используемые в хроматографии:***

*Сорбция* (от лат. sorbeo – поглощаю) – поглощение твердым телом либо жидкостью различных веществ из окружающей среды. Поглощаемое вещество,

находящееся в среде, называют *сорбатом* (сорбтивом), а поглощающее твердое тело или жидкость – *сорбентом*.

*Адсорбция* (от лат. ad – на, при и sorbeo – поглощаю) – поглощение вещества из газообразной среды или раствора поверхностным слоем жидкости или твердого тела.

*Абсорбция* (лат. absorptio от absorbere – поглощать) – поглощение сорбата всем объемом сорбента.

*Десорбция* – удаление сорбированного вещества с поверхности сорбента.

*Сорбент* (неподвижная фаза) – твердое вещество, способное удерживать анализируемые вещества.

*Элюент* (подвижная фаза) – растворитель или смесь растворителей, предназначенная для продвижения анализируемой смеси в хроматографической системе.

*Хроматограмма* (графическая запись хроматографического процесса) – кривая, отражающая содержание отдельных анализируемых фракций в элюате (в ХТА описывающая также зависимость концентрации анализируемых веществ в элюате от времени). Хроматограмма состоит из ряда пиков, каждый из которых соответствует одному компоненту анализируемой пробы.

*Хроматографический пик* – кривая, отражающая содержание конкретного вещества по величине сигнала детектора (на выходе вещества из колонки).

*Время удерживания* вещества ( $t_R$ ) – время пребывания сорбата в хроматографической колонке: от момента ввода пробы в хроматограф до момента регистрации максимума хроматографического пика. Каждое вещество при одних и тех же условиях имеет определенное время удерживания на конкретном сорбенте, на этой особенности основана идентификация аналитов.

*Объем удерживания* вещества ( $V_R$ ) – объем элюента, прошедший через колонку за период, равный времени удерживания вещества.

В таблице 4 представлена классификация хроматографических методов.

Таблица 4. Классификация хроматографических методов анализа, их краткая характеристика

<i>Принцип классификации</i>	<i>Виды хроматографии</i>	<i>Характеристика</i>
<b>По агрегатному состоянию фаз хроматографической системы</b>	Газовая:	Подвижная фаза – газ или пар
	- <i>газожидкостная</i>	подвижная фаза – газ или пар, неподвижная – жидкость, нанесенная на твердый носитель или стенки колонки
	- <i>газотвердофазная (газоадсорбционная)</i>	подвижная фаза – газ или пар, неподвижная – твердый адсорбент
	Жидкостная:	Подвижная фаза - жидкость
	- <i>жидкость-жидкостная</i>	подвижная и неподвижная фаза – несмешивающиеся между собой жидкости, при этом неподвижная фаза нанесена на твердый носитель или стенки колонки
	- <i>жидкостно-твердофазная (жидкостно-адсорбционная)</i>	подвижная фаза – жидкость, неподвижная – твердый адсорбент
<b>По механизмам разделения</b>  (по характеру взаимодействия сорбент – сорбат)	Адсорбционная	Разделение основано на различии сорбируемости разделяемых веществ твердым адсорбентом
	Распределительная	Разделение основано на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе (высококипящая жидкость, нанесенная на твердый макропористый носитель) и элюенте
	Ионообменная	Разделение основано на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси
	Эксклюзионная (молекулярно-ситовая):	Разделение основано на разной проницаемости молекул компонентов в неподвижную

		фазу (высокопористый неионогенный гель)
	- <i>гель-проникающая</i>	элюент – неводный растворитель
	- <i>гель-фильтрация</i>	элюент – вода
	Осадочная	Разделение основано на различной способности анализируемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе
	Аффинная	Разделение основано на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.)
	Адсорбционно-комплексообразовательная	Разделение основано на образовании координационных соединений различной прочности в фазе или на поверхности адсорбента
<b>По технике выполнения</b>	Колоночная	Разделение осуществляется в специальных колонках
	Плоскостная:	
	- <i>бумажная</i>	Разделение веществ осуществляется на специальной бумаге
	- <i>тонкослойная</i>	Разделение веществ осуществляется в тонком слое сорбента
<b>В зависимости от способа перемещения разделяемой смеси вдоль слоя сорбента</b>	Фронтальная	В слой сорбента непрерывно вводится разделяемая смесь, состоящая из элюента и анализируемых компонентов, которая и является подвижной фазой. Через некоторое время после начала процесса наименее сорбируемый компонент опережает остальные и выходит в виде зоны чистого вещества раньше всех, а за ним в порядке сорбируемости

		последовательно располагаются зоны компонентов смеси
	Проявительная (элюентная)	Через слой сорбента непрерывно проходит поток элюента и периодически в слой сорбента вводится разделяемая смесь веществ. Через определенное время происходит деление исходной смеси на отдельные вещества, располагающиеся зонами на сорбенте, между которыми находятся зоны элюента
	Вытеснительная	В сорбент вводится разделяемая смесь, а затем поток газа-носителя, содержащего вытеснитель (элюент), при движении которого смесь через некоторый период времени делится на зоны отдельных веществ
<b>По относительной полярности подвижной и неподвижной фаз</b>	Нормально-фазовая	Жидкостная хроматография, при которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная
	Обращенно-фазовая	Жидкостная хроматография, при которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная
<b>По цели хроматографирования</b>	Аналитическая	Качественный анализ смеси и (или) количественное определение ее компонентов
	Препаративная	Получение небольших количеств веществ в чистом виде, а также концентрирование и выделение микропримесей
	Промышленная (производственная)	Получение чистых веществ в больших количествах

Следует отметить ряд преимуществ хроматографических методов исследования, обуславливающих их широкое применение в химико-токсикологическом анализе:

1. Высокая эффективность хроматографического разделения, обусловленная динамическим характером чередования многократных акций сорбции и десорбции разделяемых компонентов.
2. Селективное разделение широкого спектра веществ благодаря использованию технологий, основывающихся на различных типах взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы.
3. Одновременно происходящее разделение и идентификация нескольких компонентов.
4. Возможность решения как аналитических (разделение, идентификация и количественное определение веществ), так и препаративных (очистка, выделение и концентрирование) задач.

**Хроматография в тонком слое сорбента является (ТСХ)** является одним из наиболее распространенных методов адсорбционной хроматографии. Это разновидность плоскостной хроматографии, при которой сорбент наносится в виде тонкого слоя на пластинку. Метод ТСХ уступает по чувствительности современным аппаратным методам ХТА, однако является простым в исполнении и менее затратным.

Преимуществами этого метода являются:

- высокая производительность (по числу одновременно анализируемых проб);
- высокая селективность, которой легко варьировать, подбирая состав подвижной фазы;
- возможность использования однократного или многократного элюирования, а также одновременного разделения компонентов одного и того же образца с помощью различных элюентов;
- оптимизация разрешающей способности хроматографической системы при разделении сложной смеси только для интересующих компонентов;
- возможность визуализации хроматографических зон разделенных веществ путем обработки хроматографических пластин различными реагентами.

К недостаткам метода ТСХ относятся:

- ограниченная разделяющая способность из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны (3-10 см);
- более низкая чувствительность в сравнении с методами газовой и высокоэффективной хроматографии;
- зависимость результатов анализа от параметров окружающей среды (относительной влажности, температуры).

Метод ТСХ основан на принципе чередования процессов сорбции и десорбции веществ в закрепленном слое сорбента (неподвижной фазе) при их перемещении подвижной жидкой фазой (системой органических растворителей). неподвижной фазой может служить сухой сорбент (адсорбционная хроматография) либо сорбент, покрытый жидкой фазой (распределительная хроматография). Систему растворителей (элюент) подбирают в соответствии со свойствами разделяемых веществ: для разделения полярных веществ используют полярные растворители, а для малополярных веществ – менее полярные или неполярные.

Хроматографическое разделение (проявление или элюирование) производят в герметично закрытых стеклянных камерах. Отмеривание компонентов смеси для приготовления хроматографических систем производят с помощью пипеток, мерных пробирок или цилиндров (не менее 2-го класса точности). Смешивание компонентов осуществляют в мерных цилиндрах или пробирках со шлифом (перемешивание в хроматографической камере недопустимо). Приготовленную систему переносят в хроматографическую камеру, которую закрывают крышкой и не менее 30 минут насыщают парами растворителей.

Классическая, наиболее простая и широко используемая методика тонкослойной хроматографии включает проведение следующих основных операций:

- 1) нанесение анализируемой пробы на слой сорбента;



линии до линии фронта растворителя, который рассчитывается по формуле:

$$R_f = \frac{A}{B}$$

где  $R_f$  – скорость фракции;

$A$  – фронт вещества, см;

$B$  – фронт растворителя, см.

Величина  $R_f$  является характерной величиной для каждого вещества на определенном сорбенте в конкретных условиях эксперимента и зависит от:

- активности и качества сорбента;
- толщины слоя сорбента;
- качества и природы растворителя.

Значение  $R_f$  не зависит от длительности проявления, однако данная величина подвержена влиянию других факторов (например, влажности и температуры воздуха) и, следовательно, может служить лишь предварительным ориентиром для идентификации веществ.

**Сорбенты.** В качестве сорбентов в ТСХ применяют материалы, которые отвечают следующим требованиям:

- возможность формирования химически и физически стабильных слоев;
- отсутствие способности к образованию ковалентных связей с разделяемыми веществами;
- нерастворимость в подвижной фазе и неспособность перемещаться вместе с ней по пластинке;
- отсутствие компонентов, мешающих разделению или детектированию;
- отсутствие собственной окраски;
- отсутствие способности набухать или сжиматься под действием подвижной фазы.

Современные сорбенты имеют вид сплошных или пористых гранул, представляющих собой пространственную сетку линейных полимеров. Важнейшей характеристикой сорбента считают его активность, т.е.

способность сорбировать (удерживать) компоненты разделяемой смеси. Активность сорбента зависит от природы активных центров и от их концентрации на поверхности сорбента, от степени дисперсности частиц сорбента, от размеров поверхности сорбента, от природы подвижной фазы, взаимодействующей с сорбентом, и от содержания в нем воды. Чем больше воды содержит сорбент, тем меньше его активность, поскольку молекулы воды, связываясь с активными центрами сорбента, блокируют их.

Таблица 5. Классификация сорбентов для ТСХ:

<i>Неорганические сорбенты</i>	<i>Органические сорбенты</i>	<i>Молекулярные сита</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- силикагель;</li> <li>- окись алюминия;</li> <li>- силикаты магния;</li> <li>- пористое стекло;</li> <li>- гидроксилпатит.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- угли активные;</li> <li>- графитированные сажи;</li> <li>- целлюлоза;</li> <li>- полимерные макропористые сорбенты;</li> <li>- полиамидные порошки;</li> <li>- кизельгур (целит, диатомовая земля).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- гели на основе декстрана (сефадексы);</li> <li>- агарозные гели;</li> <li>- полиакриламидные гели;</li> <li>- поливинилацетатные гели;</li> <li>- полистирольные гели.</li> </ul>

В качестве *подвижной фазы* (элюента) в ТСХ используют либо чистые органические растворители (этилацетат, бензол и т.п.), либо их смеси (хроматографические системы) в определенном соотношении. Выбор подвижной фазы определяется природой сорбента и свойствами анализируемой смеси. Одной из важных характеристик подвижных фаз является элюирующая способность. Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями или группами на поверхности сорбента, т.е. способность вытеснять соединения, сорбированные на неподвижной фазе.

Необходимо отметить, что изменяя состав элюента и количество растворителей в нем, можно получать подвижные фазы с желаемыми свойствами.

Эффективность разделения определяемых компонентов во многом зависит от правильно осуществленного подбора подвижной фазы, в соответствии со следующими правилами:

1. Выбирают такую систему, в которой разделяемые компоненты имеют небольшую растворимость (если растворимость вещества высокая, то вещества будут перемещаться с фронтом, а при низкой растворимости – оставаться на старте).
2. Состав системы должен быть постоянным и легко воспроизводимым.
3. Растворитель или компоненты системы не должны быть ядовитыми или дефицитными.
4. Система должна полностью разделять вещества близкого строения, причем различия в  $R_f$  должно быть не менее 0,05.
5. Система не должна вызывать химические изменения разделяемых компонентов.
6. В выбранной системе анализируемые вещества должны иметь различные значения  $R_f$  и распределяться по всей длине хроматограммы (желательно, чтобы значения  $R_f$  лежали в пределах 0,05-0,85).
7. При выборе системы необходимо учитывать природу разделяемых веществ: при хроматографировании веществ, имеющих основные свойства, система не должна обладать кислой реакцией среды и наоборот.

***Идентификация анализируемых веществ.*** Идентификация аналитов, имеющих окраску на хроматограмме, не представляет особых трудностей: после высушивания пластинок определяют расстояние от линии старта до центра каждого пятна и вычисляют коэффициенты подвижности. Если в состав анализируемой пробы входят бесцветные вещества, дающие неокрашенные, т.е. визуально не идентифицируемые пятна на хроматограмме, необходимо провести детектирование этих пятен, для чего хроматограммы проявляют.

Для детекции аналитов после хроматографического разделения в тонком слое сорбента используют физические и химические методы.

## 1. *Физические методы:*

- облучение ультрафиолетовым светом – используется для обнаружения флуоресцирующих соединений (пятна светятся при облучении пластинки УФ-светом) или нефлуоресцирующих веществ, но с применением сорбента с флуоресцирующим индикатором (сорбент светится, пятна не светятся);

- термическая обработка. Высушенную после хроматографирования пластинку осторожно нагревают (до  $\sim 200^{\circ}\text{C}$ ), избегая потемнения слоя самого сорбента (например, в тех случаях, когда тонкий слой сорбента содержит крахмал). При этом пятна проявляются обычно в виде коричневых зон (за счет частичного термоллиза органических компонентов);

2. *Химические методы* применяются наиболее часто. Они основаны на проведении различных химических реакций на хроматографических пластинах и на обработке пластин реагентами, позволяющими получать окрашенные соединения с разделяемыми компонентами смесей. Использование химических методов возможно благодаря инертности сорбентов, применяемых в ТСХ.

Для идентификации веществ, не имеющих окраски, хроматограммы обрабатывают реагентами, образующими окрашенные соединения с разделяемыми компонентами смесей. Реагенты наносятся на хроматографическую пластину либо капельным способом, либо способом напыления. Капельное нанесение осуществляется с помощью капилляра или пастеровской пипетки, при этом слой реактива наносится на пластинку непрерывно. Для напыления реагентов применяют распылители, позволяющие распылять жидкость в виде мелкодисперсного аэрозоля, в этом случае реагент покрывает пластину равномерным слоем. В ТСХ используют две конструкции распылителей: распылитель Морриса («самоварчик») и распылитель Флика (пробирочный вариант). Для неагрессивных реагентов можно использовать аэрограф.

Реагенты, используемые в ТСХ для детекции неокрашенных соединений, можно разделить на *универсальные*, позволяющие обнаруживать широкий

спектр соединений различных типов, и *специфичные* (селективные) реагенты.

В качестве универсальных реагентов обычно используются:

- концентрированная серная кислота, как в чистом виде, так и в смеси с азотной кислотой, с этанолом, с другими окислителями (хромовой, ванадиевой, молибденовой кислотами), с альдегидами (формалином);
- хлорная кислота (25% или 70%-ная);
- насыщенный раствор трихлорида сурьмы в хлороформе или 10 – 20%-ный раствор пентахлорида сурьмы в хлороформе;
- йод;
- флуоресцеин-бромный реактив, позволяющий обнаруживать все ненасыщенные соединения, легко реагирующие с бромом;
- вода – используется для обнаружения гидрофобных соединений.

Специфичные реагенты позволяют идентифицировать отдельные соединения либо классы соединений. В литературе описано более 250 таких реагентов, в таблице 6 перечислены наиболее часто используемые в анализе наркотических средств и психотропных веществ.

Таблица 6. Специфичные реагенты для ТСХ

<i>Специфичные реагенты</i>	<i>Способ приготовления и нанесения на пластинку</i>	<i>Детектируемые вещества</i>
Железо (III) хлористое	2 г хлорида железа (III) растворяют в воде и объем доводят до 100 мл. Наносится способом напыления.	морфин, тебаин, меконовая кислота
Нингидрин в ацетоне	0,5 г нингидрина растворяют в 40 мл ацетона. Наносится способом напыления с последующим прогреванием в токе теплого воздуха.	амфетамин, метамфетамин и их производные
Нингидрин в этаноле	1) 0,2 г нингидрина растворяют в 100 мл этилового спирта; 2) 1 г нингидрина растворяют в 100 мл этилового спирта. Наносятся способом напыления с последующим прогреванием при температуре 105 °С.	амфетамин, метамфетамин и их производные
Нингидрин в	0,05 г нингидрина растворяют в 5 мл конц.	трамадол

серной кислоте	серной кислоты. Наносится капельным способом.	
Реактив Вагнера	В 10-15 мл воды растворяют 2 г йодида калия. К этому раствору прибавляют 1 г йода. После растворения йода добавляют воду до 100 мл. Наносится способом напыления.	кокаин
Реактив Драгендорфа	В 20 мл азотной кислоты (пл.1,18) растворяют 8 г основного нитрата висмута. Полученный раствор вливают в раствор, содержащий 27,2 г йодида калия в 30 мл воды. Через несколько суток жидкость фильтруют и разбавляют водой до 100 мл. Наносится способом напыления.	все азотистые основания (в т. ч. алкалоиды опия; метадон; трамадол; амфетамин, метамфетамин и их производные)
Реактив Драгендорфа (модификация Мунье)	В 10 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,85 г основного нитрата висмута и прибавляют 40 мл воды. К этой жидкости прибавляют раствор, содержащий 8 г йодида калия в 20 мл воды. Перед употреблением берут 1 мл указанного раствора, прибавляют к нему 2 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды. Наносится способом напыления.	все азотистые основания (в т. ч. алкалоиды опия; метадон; трамадол; амфетамин, метамфетамин и их производные)
Реактив Дюкенуа	2 г ванилина растворяют в 100 мл 1% спиртового раствора ацетальдегида. Наносится способом напыления.	каннабиноиды
Реактив Либермана	1г нитрита натрия растворяют 10 мл концентрированной серной кислоте. Наносится капельным способом.	метадон; амфетамин, метамфетамин и их производные
Реактив Манделина	10 мг ванадата аммония растворяют в 2 мл конц. серной кислоты. Наносится капельным способом.	опийные алкалоиды и их производные; метадон; трамадол; пентазоцин; ЛСД
Реактив Марки	К 1 мл концентрированной серной кислоты прибавляют каплю формалина и охлаждают. Наносится капельным способом.	опийные алкалоиды и их производные; трамадол; амфетамин, метамфетамин и

		их производные
Реактив Мекке	1 г селеновой кислоты растворяют в 100 мл концентрированной серной кислоте. Наносится капельным способом.	морфин, кодеин, героин.
Реактив Саймона	А) Растворяют 1 часть 10% ацетальдегида в 1 части 5% раствора нитропруссиды натрия. Б) растворяют 2 г карбоната натрия в 100 мл воды. Перед употреблением смешивают реактивы А и Б в соотношении 1:2. Наносится способом напыления.	амфетамин, метамфетамин и их производные
Реактив Саймона в ацетоне	А) Растворяют 1 г нитропруссиды натрия в 100 мл 5% водного раствора ацетона. Б) растворяют 2 г карбоната натрия в 100 мл воды. Перед употреблением смешивают реактивы А и Б в соотношении 1:1. Наносится способом напыления.	амфетамин, метамфетамин и их производные
Реактив Скотта	А) 16 мл конц. соляной кислоты доводят водой до 100 мл. Б) 2,5 г тиоцианата кобальта растворяют в воде и объем доводят до 100 мл. Реактивы А и Б наносятся способом последовательного напыления.	опийные алкалоиды и их производные; метадон; кокаин
Реактив Фреде	К растертому в порошок молибдату аммония (или натрия) прибавляют конц. серную кислоту. Смесь интенсивно взбалтывают. Полученный насыщенный раствор молибденовой кислоты в конц. серной кислоте сливают с осадка. Наносится капельным способом.	морфин, кодеин, героин; бупренорфин, промедол, метадон, фенциклидин; ЛСД
Реактив Эрдмана	К 20 мл конц. серной кислоты добавляют 10 капель 30% раствора азотной кислоты в 100 мл воды. Наносится капельным способом.	морфин
Соль прочного синего Б	0,01 г соли прочного синего Б растворяют в 10 мл в 70%-ного этилового спирта. Наносится способом напыления.	каннабиноиды
Соль прочного черного К	0,1 г соли прочного черного К растворяют в 50 мл воды. Наносится способом напыления.	метадон; амфетамин, метамфетамин и их производные

**Газовая хроматография (ГХ)** широко используется в качестве метода разделения и анализа смеси веществ. Разделение веществ осуществляется в элюционном режиме. При этом вещества переводятся в газообразное состояние и вводятся в поток газа-носителя на входе в хроматографическую колонку. Газ-носитель, выполняющий роль подвижной фазы, проходит через колонку, и все растворенные в нем вещества распределяются между неподвижной и подвижной фазами. В результате постоянного движения потока газа-носителя и перераспределения молекул аналитов между двумя фазами, введенные в хроматографическую колонку вещества проявляются на выходе из нее в виде отдельных зон, которые регистрируются как хроматографические пики.

Методом ГХ можно разделять не только газы или пары веществ, но и жидкие вещества, способные растворяться в неподвижной жидкой фазе. Процесс хроматографического разделения происходит за счет неоднократного повторения цикла «сорбция – десорбция». В зависимости от типа используемой неподвижной фазы выделяют два вида газовой хроматографии: газо-адсорбционную и газо-абсорбционную.

*Адсорбция* представляет собой концентрирование веществ на поверхности раздела фаз (твердой и газообразной, твердой и парообразной или твердой и жидкой), одна из которых представляет собой неподвижную фазу в виде твердого носителя. При *абсорбции* молекулы веществ также соприкасаются с поверхностью, но не твердого вещества, а жидкой неподвижной фазы, при этом они не задерживаются на поверхности, а растворяются в объеме жидкости, нанесенной на какой-либо твердый носитель. Процессы, связанные с абсорбцией газов в жидкостях, лежат в основе газожидкостной хроматографии (ГЖХ) – одного из наиболее распространенных в настоящее время в ХТА методов разделения веществ.

В основе *газо-жидкостной хроматографии* лежит способность веществ, находящихся в газообразном состоянии, растворяться в жидкостях, иными словами – способность к абсорбции. Математическим выражением этого

процесса является *коэффициент растворимости* (распределения), который выражается следующей формулой:

$$K_p = \frac{q \text{ г/мл Н.Ф.}}{q \text{ г/мл П.Ф.}}$$

где  $K_p$  – коэффициент растворимости;

$q$  г/мл Н.Ф. – количество вещества (в граммах) в 1 мл неподвижной фазы;

$q$  г/мл П.Ф. – количество вещества (в граммах) в 1 мл подвижной фазы.

Коэффициент растворимости – величина безразмерная, так как прямо пропорционально зависит от количества неподвижной жидкой фазы (НЖФ), удерживаемой в колонке. Поскольку определить истинное количество неподвижной жидкой фазы, находящейся в колонке, затруднительно, чаще используется понятие *удельного удерживаемого объема* ( $V_g$ ). Эта величина имеет следующее выражение:

$$V_g = \frac{\text{Количество растворенного вещества на 1,0 г неподвижной фазы}}{\text{Количество растворенного вещества на 1 мл газа при } 0^\circ\text{C}}$$

Процесс сорбции газа жидкостью продолжается до момента наступления равновесия концентрации анализируемого вещества в неподвижной жидкой фазе и находящейся над ней газовой фазе. Эта зависимость описывается законом Генри и выражается в виде так называемого коэффициента Генри ( $\Gamma$ ), который по своей сути является выражением коэффициента распределения. Данный закон учитывает влияние различных сил взаимодействия, возникающих между неподвижной жидкой фазой и анализируемыми веществами, находящимися в газообразном состоянии: специфических (донорно-акцепторные взаимодействия, водородные связи, комплексообразование) и неспецифических (дисперсионных, ориентационных, индукционных) сил.

Основным параметром, определяющим размывание веществ при их прохождении через колонку, является *эффективность* – способность хроматографической системы (колонки) предотвращать или ограничивать размывание зон разделяемых веществ. Эффективность колонки измеряется

числом теоретических тарелок. Увеличение количества теоретических тарелок приводит к улучшению хроматографического разделения и получению более узкого пика при одинаковом времени удерживания. Число теоретических тарелок (ЧТТ) характеризует количество ступеней установления равновесия распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами, и на практике может быть рассчитано по следующей формуле:

$$N = 16 (X / Y)^2$$

где N – число теоретических тарелок;

X – расстояние от точки ввода пробы до вершины пика;

Y – величина отрезка нулевой линии между касательными к сторонам пика.

Следует отметить, что ЧТТ не отражает в полной мере характеристики хроматографического разделения, поскольку не зависит от размеров (длины) колонки.

В процессе хроматографического разделения большая часть молекул вещества сорбируется неподвижной жидкой фазой. Небольшая часть молекул остается в газовой среде и продвигается дальше по колонке, сорбируясь на следующем ее участке. Поступающая в колонку новая порция газа-носителя не содержит analyта и вымывает из жидкой фазы сорбированные молекулы, перенося их на следующий участок колонки, где снова происходит сорбция этих молекул. Этот процесс продолжается непрерывно по всей длине колонки.

Небольшая область колонки (ячейка), в которой наступает сорбционно-десорбционное равновесие, называется теоретической областью разделения. В газовой хроматографии ее называют теоретической тарелкой, а участок колонки по его длине, в котором наступает равновесие, называется высотой эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ). Эффективность хроматографической системы при использовании набивной колонки описывается величиной, которая по данным различных источников литературы имеет обозначения ВЭТТ или H:

$$H = \frac{L}{N}$$

где  $H$  – высота эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ);

$L$  – длина колонки, см;

$N$  – число теоретических тарелок.

Чем меньше значение ВЭТТ, тем больше  $N$  (ЧТТ) и, следовательно, выше эффективность хроматографического разделения. Система считается эффективной, если на 1 метр колонки приходится около 1000 теоретических тарелок. Зная ЧТТ и длину ( $L$ ) колонки, а также средний диаметр зерна твердого носителя, можно рассчитать значение приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ПВЭТТ):

$$\text{ПВЭТТ (h)} = \frac{H}{dC}$$

где ПВЭТТ ( $h$ ) – приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке;

$H$  – высота эквивалентная теоретической тарелке;

$dC$  – средний диаметр частиц твердого носителя, мм.

ПЭВТТ является безразмерной величиной и более детально характеризует качество колонки, поскольку, в отличие от ВЭТТ, учитывает диаметр частиц.

Основной задачей теории хроматографии является установление законов движения и размытия хроматографических зон. Базой всей теории хроматографии является описание характера изотерм сорбции и скорости установления равновесия. В зависимости от характера изотерм выделяют линейную и нелинейную хроматографию. В зависимости от того, учитывается или не учитывается скорость установления равновесия, хроматография делится на идеальную и неидеальную. Именно теория неидеальной хроматографии рассматривает реальный процесс, который учитывает скорость установления равновесия. В практике химико-токсикологического анализа применяется линейная неидеальная хроматография. В качестве основных теорий используются теория тарелок и теория скоростей.

Теория тарелок основана на следующих положениях:

- коэффициенты распределения  $K$  постоянны;
- диффузия в направлении потока пренебрежимо мала;
- скорость установления равновесия между растворенным веществом и двумя фазами достаточно велика по сравнению со скоростью подвижной фазы;
- систему следует рассматривать как прерывную (дискретную), состоящую из множества элементарных объемов, в каждом из которых устанавливается свое равновесие.

Теория скоростей, основанная на моделях непрерывного потока для хроматографических систем, является более точным приближением к реальным условиям, чем теория тарелок, но сложность ее расчетных формул затрудняет использование данной теории в практической газовой хроматографии. Более простые математические расчеты используются в теории тарелок, которая позволяет получить результаты, практически аналогичные теории скоростей. В соответствии с классическими представлениями размывание хроматографических зон определяется тремя независимыми факторами: неравномерностью движения потока подвижной фазы, молекулярной диффузией и тем, что система не достигает состояния полного равновесия. Отражает этот подход уравнение Ван-Деемпера. В упрощенной форме это уравнение имеет следующий вид:

$$H = A + \frac{B}{U} + C \cdot U$$

где  $H$  – высота эквивалентная теоретической тарелке;

$A$  – вихредиффузионная характеристика;

$B$  – показатель продольной молекулярной диффузии;

$C$  – показатель сопротивления массопереносу;

$U$  – скорость потока газа-носителя, мл/мин.

Постоянная  $A$  учитывает неравномерность движения потока подвижной фазы. Она описывает зависимость высоты тарелки от неоднородности

прохождения потока через пористую структуру набивки колонки. Согласно уравнению Ван-Деемтера, вклад фактора вихревой диффузии ( $A$ ) в размытие хроматографических зон наибольший. Для снижения этого фактора необходимо заполнять колонку, по возможности, сорбентом с одинаковыми по форме зернами. Для капиллярных колонок параметр  $A$  равен нулю.

Второй параметр –  $B / U$  – учитывает влияние скорости потока газа-носителя ( $U$ ). Для снижения эффекта размывания хроматографических зон необходимо увеличивать скорость потока газа-носителя, однако, следует учитывать, что чрезмерно высокая скорость подвижной фазы может привести к значительному снижению чувствительности метода. Целесообразно также применять тонкий слой неподвижной жидкой фазы, чтобы уменьшить расстояние, проходимое молекулами вещества в неподвижной жидкой фазе перед тем, как оно достигнет поверхности и перейдет в подвижную фазу. С целью уменьшения объема подвижной фазы в колонке необходимо использовать сорбенты с частицами малого размера.

Третий показатель уравнения –  $C \cdot U$  – является наиболее существенным фактором при определении эффективности колонки в практических условиях. Он выражает сопротивление массопереносу в колонке, препятствующее мгновенному установлению равновесия молекул растворенного вещества между газом-носителем и неподвижной жидкой фазой. Следует учитывать, что для уменьшения  $H$  (ВЭТТ) необходимо снижать скорость потока подвижной фазы.

Таким образом, с помощью уравнения Ван-Деемтера можно определять условия, позволяющие свести к минимуму размывание хроматографических зон и достигать максимального разделения. Однако выводы из уравнения Ван-Деемтера по разным показателям могут быть весьма противоречивы. Поэтому на практике для уменьшения величины  $H$  (ВЭТТ) необходимо подбирать оптимальные условия экспериментальным путем. Например, выбирают сорбент с таким размером частиц, чтобы скорость подвижной фазы удовлетворяла

условиям разделения. Следует учитывать, что диффузия вносит преобладающий вклад в величину  $N$  при низких скоростях, а влияние массопереноса, наоборот, преобладает при высоких скоростях.

**Селективность хроматографического процесса.** В газовой хроматографии селективность является мерой взаимного распределения двух и более веществ в ходе хроматографического процесса, или иначе – это мера относительного удерживания или относительной подвижности двух и более веществ. Удерживание веществ, характеризуемое временем удерживания (или подвижностью), прямо пропорционально величине коэффициента распределения, который зависит от физико-химических свойств определяемых веществ, подвижной фазы и неподвижной фазы. Таким образом, основным требованием к любой хроматографической системе является обязательное различие в коэффициентах распределения ( $K$ ) анализируемых веществ, т.е.  $K_1 \neq K_2$ .

В то же время селективность зависит не только от физико-химических свойств неподвижной и подвижной фазы, но и от их относительных количеств. Следовательно, более достоверной характеристикой хроматографического процесса является коэффициент равновесного распределения ( $K$ ), который можно определить как отношение концентраций вещества в подвижной ( $C_s$ ) фазе к его концентрации в неподвижной ( $C_m$ ) фазе:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Очевидно, что при постоянстве  $K$  изменение количества подвижной фазы на определенном участке колонки приведет к изменению времени элюирования анализируемого вещества вследствие изменения концентрации вещества в газе-носителе.

В газовой хроматографии селективность в большей степени определяется природой неподвижной фазы и выражается фактором селективности

(относительным удерживанием), который описывается следующим уравнением:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{I'_{R2}}{I'_{R1}}$$

где  $\alpha$  – фактор селективности;

$t'R$  – исправленное время удерживания;

$I'R$  – исправленный объем удерживания.

$t'R2 > t'R1$ , соответственно  $I'R2 > I'R1$ . Поэтому  $\alpha$  равен или больше 1.

**Степень разделения веществ.** На практике важным моментом является оптимизация разделения двух трудноразделимых пиков. Степень разделения двух веществ в виде пиков на хроматограмме характеризуется критерием разделения ( $R$ ), равным отношению интервала между максимумами двух соседних разделенных пиков ( $\Delta R_t$ ) к сумме их полуширин у основания ( $\omega$ ):

$$R = \frac{\Delta R_t}{\omega} = \frac{2(R_{t2} - R_{t1})}{\omega_1 + \omega_2}$$

где  $R$  – критерий разделения;

$R_t$  – расстояние удерживания хроматографического пика;

$\Delta R_t$  – интервал между максимумами двух соседних пиков;

$\omega$  – постоянная величина, зависящая от структуры набивки колонки и коэффициента относительного распределения.

При этом два гауссовых пика считаются разделенными, если  $R = 1,5$  (разделение 99,7%), но для практических целей достаточно  $R = 1$  (разделение 98%). На рисунке 9 показаны два полностью разделенных пика.

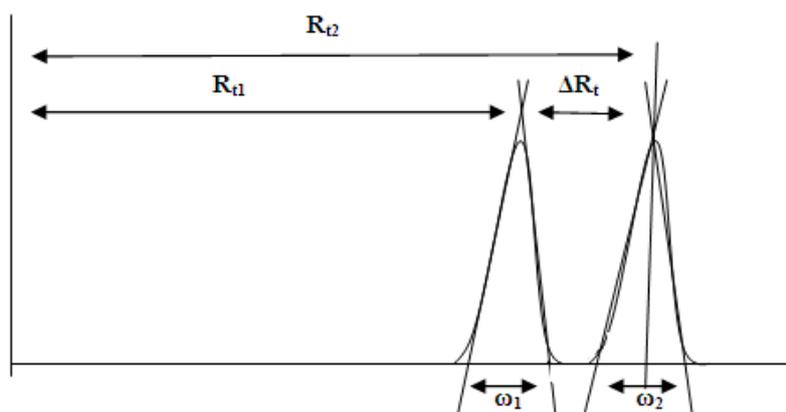


Рисунок 9. Разделение пары растворенных веществ

Разделение веществ в ходе хроматографического исследования определяется тремя факторами:

- относительным удерживанием ( $\alpha$ ), которое зависит от относительных положений двух пиков на хроматограмме и определяется селективностью неподвижной фазы;
- относительным распределением ( $k$ ), которое выражает положения пиков относительно пика воздуха и определяется коэффициентом распределения и количеством неподвижной фазы в данной колонке;
- числом теоретических тарелок ( $N$ ), которое является мерой расширения хроматографической полосы в колонке и зависит почти от всех переменных.

**Асимметрия пика.** К сожалению, на практике хроматографические пики не всегда являются гауссовыми, что связано с невозможностью выполнения всех требования элюционной хроматографии. Есть несколько факторов, которые могут быть причиной отклонений, проявляющихся в размытии фронта или тыла пика.

Графическое изображение хроматографического процесса при постоянной температуре называется изотермой сорбции. Линейная изотерма описывает гауссовы пики, когда концентрация вещества довольно низкая и нет перегрузки колонки, но, к сожалению, линейная область может оказаться ниже практического предела чувствительности детектора. В свою очередь,

перегрузка колонки неминуемо приводит к асимметричным пикам: чаще наблюдаются выпуклые изотермы, которые описывают пики с размытием тыла (образование «хвостов») (рисунок 10).

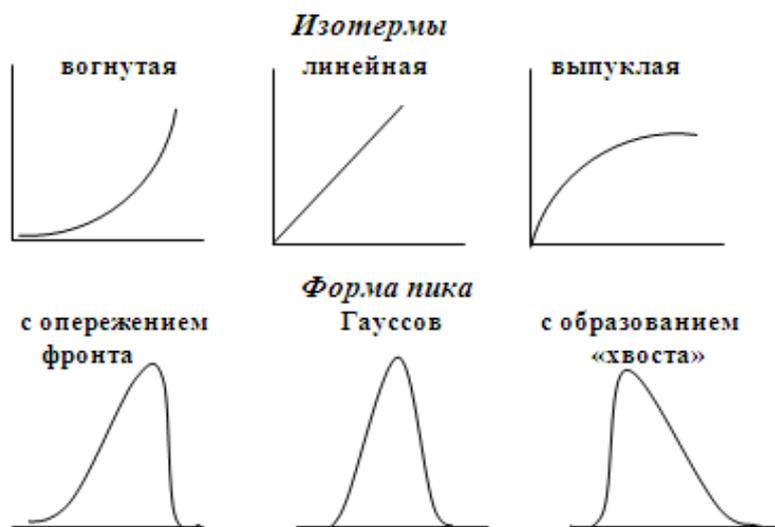


Рисунок 10. Асимметрия пика, вызванная нелинейностью изотерм сорбции

Одним из факторов, вызывающих размытие тыла пика, является медленная десорбция растворенного вещества, что обусловлено активностью сильно адсорбирующих центров набивки колонки. Поэтому рекомендуется дезактивировать активные центры путем химической обработки. Среди других источников асимметрии можно назвать некачественный ввод пробы и влияние системы детектирования.

Асимметрия пиков может существенно снизить эффективность разделения, а также привести к значительным погрешностям при количественном определении анализируемых веществ.

**Неподвижная жидкая фаза** (НЖФ) определяет селективные взаимодействия между компонентами анализируемой пробы и набивкой колонки, иными словами, определяет последовательность выхода веществ из колонки, отношение времен удерживания максимумов их зон, а также характер размывания пиков.

При выборе жидкой фазы необходимо обращать внимание на ряд предъявляемых к ней требований:

- химическую и термическую стойкость;
- инертность;
- низкое давление пара при рабочих температурах колонки;
- достаточные коэффициенты разделения;
- низкую вязкость;
- достаточную селективность по отношению к компонентам пробы, которые должны быть разделены;
- хорошую растворимость в одном из летучих растворителей;
- способность смачивать носитель при рабочих температурах колонки;
- возможность нанесения на поверхность носителя равномерной пленкой.

Поскольку нет единого параметра, с помощью которого можно было бы описать характеристики удерживания жидкой фазы, для классификации различных неподвижных фаз используются разные показатели. Существует несколько классификаций НЖФ.

#### 1. Классификация по химическому составу:

- углеводороды: предельные углеводороды, смеси предельных и непредельных углеводородов, ароматические углеводороды (сквалан, парафиновое масло, апиэзоновые смазки, алкилнафталины, полифениловый эфир);
- силоксаны с радикалами различной полярности (метилсилоксан, метилфенилсилоксан, нитрилсилоксан, полиэфирсиликоны);
- эфиры простые и сложные, полиэфиры, полигликоли.
- фталаты и фосфаты.

#### 2. Классификация по полярности:

- неполярные (Сквалан (С30), Апиэзон (С62), ПМС, SE-30 и др.);
- малополярные (эфиры терефталевой кислоты, полипропиленгликоли, ПФМС-4 и др.);
- среднеполярные (кремнийорганические жидкости с привитыми CN-группами, НСКТ, ХЕ-1150 и др.);
- полярные (полиэтиленгликоли (ПЭГ-20М), Карбовакс-20М и др.);

- сильнополярные (1,2,3-трис-(β-цианэтокси)пропан, гексацианэтиловый эфир маннита (6С) и др.).

Способность к удерживанию полярного растворенного вещества тем лучше, чем выше полярность жидкой фазы (в сравнении с неполярным веществом, имеющим одну и ту же температуру кипения). Поэтому для разделения полярных сорбатов используются полярные неподвижные фазы, а неполярных – неполярные.

3. Классификация НЖФ по характеру межмолекулярного взаимодействия фаза-вещество представлена в таблице 7.

Таблица 7. Классификация НЖФ по характеру межмолекулярного взаимодействия фаза-вещество

<i>I тип</i>	<i>II тип</i>	<i>III тип</i>
Неполярные насыщенные (возможны только дисперсионные взаимодействия)	Полярные с локально концентрированными отрицательными зарядами, π-связями, свободными электронными парами при атомах N и O (доноры электронов)	Полярные с локально концентрированными положительными и отрицательными зарядами (акцепторы и доноры электронов)
апиезоны (L, M, J, N, T, H), <i>n</i> -Гексадекан (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> ), парафиновое масло, сквалан (C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> ), <i>n</i> -Тетракозан (C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> )	адипинаты, нитрилы, нитрилоэфиры, полифенилы, себацинаты, сквалан, стеараты, сукцинаты, трикрезилфосфат, фталаты, эфиры полиэтиленгликоля	гидроксиламины, гликоли, глицерин, диглицерин, инозит, пентаэритрит, сорбит, полиэтиленгликоли

4. Классификация по максимально допустимой рабочей температуре:

- органические НЖФ – до 200°C;
- кремний-органические НЖФ – до 350°C.

Верхний предел температуры колонки обычно определяется величиной

испарения, которая является результатом медленного уноса газообразной части неподвижной жидкой фазы потоком газа-носителя. В случаях использования полимерных жидких фаз химическое разложение ограничивает верхнюю рабочую температуру. Максимальная рабочая температура устанавливается экспериментальным путем, и соответствующие данные предоставляются производителем. Тем не менее, к этим данным следует относиться критически, поскольку в конкретных условиях практический верхний предел может оказаться ниже паспортных данных. Необходимо иметь в виду, что для каждой жидкой фазы существует нижний предел рабочей температуры, который чаще всего является точкой плавления фазы. Однако всегда следует помнить о том, что с понижением температуры вязкость жидкой фазы возрастает и эффективность колонки резко снижается.

Чаще всего в качестве жидкой фазы используются различные замещенные и незамещенные метилсиликоны, наибольшее значение из которых имеют силиконы с высоким коэффициентом диффузии, обладающие термической стабильностью, и при низкой температуре представляющие собой жидкости или смолоподобные вещества.

*Хроматографическая колонка* является одним из основных компонентов хроматографической системы и представляет собой трубку с фиксированной неподвижной жидкой фазой, через которую протекает подвижная газообразная фаза.

В зависимости от расположения неподвижной фазы колонки делятся на:

- насадочные (набивные) – наполнены зернистым наполнителем: адсорбентом (система газ-адсорбент) или инертным твердым носителем, обработанным жидкой неподвижной фазой (система газ-жидкость); их эффективность зависит от размеров зерен насадки, от способа нанесения НЖФ на твердый носитель и от тщательности набивки трубки сорбентом;
- капиллярные – имеют неподвижную фазу (твердую либо жидкую), нанесенную в виде тонкого слоя (толщиной несколько мкм) на внутреннюю

стенку капилляра.

Важными характеристиками хроматографических колонок являются диаметр, форма и длина. Влияние диаметра колонки на эффективность разделения четко не определено. При аналитических исследованиях на набивных колонках наиболее эффективными являются змеевиковые с внутренним диаметром 2 мм. Основная характеристика капиллярных колонок – функция квадрата внутреннего диаметра трубки. В тех случаях, когда требуется высокая эффективность, предпочтительны малые внутренние диаметры (0,25 мм и меньше). Минимальная длина колонки определяется числом теоретических тарелок, необходимых для получения требуемой степени разделения. Степень разделения возрастает как корень квадратичный из длины колонки, т.е. длину необходимо увеличить в 4 раза, чтобы получить двукратное улучшение степени разделения.

Большинство хроматографических разделений в газовой хроматографии осуществляется с использованием *насадочных* (набивных) колонок, важным компонентом которых является твердый носитель. Правильный выбор твердого носителя нередко имеет решающее значение для успешного разделения веществ. Твердый носитель должен прочно удерживать неподвижную жидкую фазу и создавать большую поверхность соприкосновения между подвижной фазой (газ-носитель) и НЖФ, не вступая при этом в химическое взаимодействие с анализируемыми веществами. Поэтому к твердым носителям предъявляются определенные требования:

- большая удельная поверхность – для того, чтобы упростить получение мелкодисперсного распределения жидкой фазы;
- химическая инертность – для предотвращения адсорбции компонентов пробы в рабочих условиях;
- механическая прочность – необходимо, чтобы твердый носитель выдерживал процессы нанесения покрытия и наполнения колонки;

- должен состоять из однородных по размеру частиц (иметь узкий ситовый состав), чтобы обеспечить равномерное наполнение колонки;
- должен обладать соответствующей пористой структурой для получения быстрого массопереноса в обеих фазах;
- должен отличаться термостойкостью для осуществления режимов работы при высоких температурах.

В газовой хроматографии используются следующие типы носителей:

1) диатомитовые носители (сорбенты на основе панцирей ископаемых водорослей – диатомий):

- с большой насыпной массой, большой удельной поверхностью и достаточно большой механической прочностью (ИНЗ-600, Динохром-Н, Сферохром-2, Хромосорб Р),

- с небольшой удельной поверхностью, малой насыпной массой и малой адсорбционной активностью (Хроматон, Инертон, Порохром, Динохром-П, Хромосорб-W, Хромосорб-G);

2) силикагели – диоксид кремния SiO<sub>2</sub> (Силохромы, Поросил и др.);

3) оксид алюминия;

4) политетрафторэтилен (Полихром-1, Хромосорб Т и др.),

5) полимерные носители на основе сополимеров стирола и дивинилбензола (Полисорб, Porapak, Chromosorb 101-108).

Наиболее часто в качестве твердого носителя используют диатомиты, которые изготавливаются из диатомитовой земли путем обжига с добавлением присадок. Их делят на две основные группы, различающиеся по цвету. Белые диатомиты относительно инертны и имеют низкую удельную поверхность, но являются достаточно хрупкими. Розовые диатомиты имеют большую удельную поверхность, обладают надлежащими характеристиками механической прочности, однако химическая инертность у них недостаточно высокая. Таким образом, колонки, наполненные белым диатомитом, имеют более низкую эффективность, в сравнении с розовым материалом, однако благодаря более

низкой активности они предпочтительнее для разделения полярных соединений. Низкая химическая инертность носителя (вследствие увеличения его поверхностной активности) может приводить к образованию стойких химических связей с аналитами, и как следствие, – к размытию хроматографических зон. Для снижения поверхностной активности диатомиты промываются концентрированной кислотой и дополнительно обрабатываются силанизирующими веществами.

При использовании набивных колонок важен правильный выбор количества нанесенной неподвижной фазы. Количество неподвижной фазы, наносимой на носитель, выражается, согласно Международной системе единиц (SI) в единицах массового отношения и, как правило, составляет 50 – 400 г на 1 кг твердого носителя (при выражении в единицах весовой процентной концентрации: 5 – 40%). При выборе неподвижной фазы необходимо учитывать температуру кипения анализируемых веществ: для легкокипящих веществ содержание НЖФ составляет 15 – 25%, для тяжелых сорбатов – 2 – 5%.

С повышением содержания НЖФ у сорбентов:

- повышается селективность;
- уменьшается адсорбционный эффект (регистрируются симметричные пики);
- увеличивается емкость колонки.

При понижении содержания НЖФ у сорбентов:

- эффективность разделения повышается;
- с повышением температуры в меньшей степени увеличивается фоновый ток (меньше унос фазы);
- возрастает скорость анализа;
- появляется возможность работать при более высоких температурах.

**Капиллярные колонки** представляют собой длинную тонкую трубку, изготовленную из нержавеющей высоколегированной стали или стекла, на внутреннюю поверхность которой нанесена жидкая фаза. Внутренний диаметр

такой трубки обычно составляет 0,25 – 0,55 мм. Длина капиллярных колонок обычно колеблется от 10 до 100 метров.

Существует несколько типов капиллярных колонок:

- капиллярные колонки с пленкой жидкой неподвижной фазы, которая нанесена непосредственно на внутреннюю поверхность колонки (WCOT);
- капиллярные колонки с пористым слоем, пропитанным жидкой фазой (PLOT): на внутренних стенках расположен слой носителя, несущего неподвижную фазу;
- капиллярные колонки с твердым носителем (ПКК-ТН или PLOT): на внутренних стенках нанесен слой твердого носителя;
- капиллярные колонки с химически привитой неподвижной фазой.

Преимуществами капиллярных колонок являются:

- малые объемы вводимых проб,
- невысокие значения расхода газа-носителя,
- высокая эффективность (до нескольких тысяч теоретических тарелок на 1 м),
- возможность использования для разделения многокомпонентных смесей.

В то же время капиллярные колонки обладают рядом недостатков:

- толщина пленки НЖФ (0,1 – 0,8 мкм) не позволяет достичь высокой емкости колонки при анализе концентрированных растворов;
- эффективность работы капиллярной колонки в значительной мере определяется чистотой и однородностью внутренней поверхности капилляра;
- особенности капиллярной хроматографии предъявляют жесткие требования к детекторам: они должны обладать высокой чувствительностью и скоростью регистрации сигнала, а также иметь небольшой объем измерительной камеры (в наибольшей степени удовлетворяет всем требованиям пламенно-ионизационный детектор);
- капиллярные колонки, выполненные из стекла, обладают высокой остаточной адсорбционной активностью (особенно по отношению к полярным соединениям) и низкой механической прочностью.

Содержание НЖФ для капиллярных колонок колеблется от 0,1 до 20% внутренней поверхности капилляра (в зависимости от задаваемой толщины пленки).

Выбор *газа-носителя* (ГН) зависит главным образом от нагрузки неподвижной фазы. В качестве газа-носителя в ГХ используют инертные, легко получаемые в чистом виде газы, такие как гелий или азот, реже – водород. Именно физико-химические свойства неподвижной фазы определяют оптимальный диапазон скоростей газов. Легкие газы-носители (водород, гелий) лучше применять для колонок с малым содержанием НЖФ, которые работают с высокими скоростями потока для быстрых аналитических разделений. Тяжелые газы-носители (азот, аргон) наиболее пригодны для колонок с высоким содержанием НЖФ, работающих с оптимальной скоростью потока в препаративном режиме.

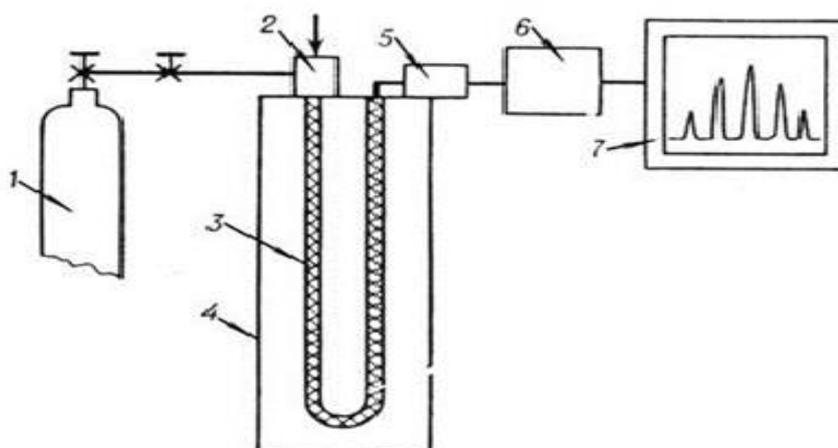
Кроме этого, выбор газа-носителя определяется типом применяемого детектора: для большинства ионизационных детекторов наиболее подходящими газами-носителями являются азот и аргон, а для детектора по теплопроводности – гелий и водород.

Требования, предъявляемые к газу-носителю:

- инертность по отношению к разделяемым веществам и сорбенту;
- взрывобезопасность;
- чистота (наличие примесей в ГН приводит к флюктуациям нулевой линии, ухудшению пределов детектирования и разрушению лабильных веществ);
- вязкость ГН должна быть как можно меньше, чтобы поддерживался небольшой перепад давлений в колонке;
- коэффициент диффузии компонента в ГН должен иметь оптимальное значение, так как он влияет на размывание пиков;
- ГН должен обеспечивать высокую чувствительность детектора;
- ГН должен быть вполне доступным, поскольку в ходе хроматографического процесса он расходуется в значительных количествах.

## *Устройство газохроматографического комплекса.*

Газохроматографический комплекс (газовый хроматограф) состоит из источника инертного газа (при использовании детекторов ионизации в пламени дополнительно вводятся источник водорода и компрессор для подачи воздуха); регуляторов подачи газов; устройства для ввода пробы; хроматографической колонки, которая находится в термостатируемом блоке; детектора; преобразователя сигналов и регистрирующего узла (рисунок 11).



*Рисунок 11. Принципиальная схема газохроматографического комплекса:  
1 – баллон с инертным газом, оснащенный понижающим редуктором;  
2 – устройство для ввода пробы в хроматографическую колонку; 3 – колонка;  
4 – термостат колонки; 5 – детектор; 6 – преобразователь сигналов; 7 – регистрирующий узел*

Принцип работы газового хроматографа заключается в следующем. Поток газа-носителя из баллона через регуляторы расхода и давления газа непрерывно в регулируемом количестве подается через испаритель в хроматографическую колонку, а затем – в детектор. С помощью специальных устройств (шприцев-дозаторов или пробоотборного крана) анализируемую пробу подают в систему ввода, откуда она в соответствующем виде переносится потоком газа-носителя непосредственно в колонку. При прохождении полученной газовой смеси вдоль сорбента происходит разделение. Из колонки газовый поток, несущий в определенной

последовательности разделенные компоненты, поступает в детектор. Электрический сигнал от детектора проходит через преобразователь и регистрируется в виде хроматограммы на самописце или мониторе персонального компьютера.

*Типы детекторов для газовой хроматографии.* Детектор – устройство, предназначенное для обнаружения в потоке газа-носителя анализируемых веществ по какому-либо физико-химическому параметру. Отклик детектора осуществляется за счет преобразования свойств в электрический сигнал. Точность и чувствительность всей хроматографической системы в значительной степени определяются характеристиками детектора. Способность детектора обнаруживать незначительные количества различных органических веществ позволяет работать с очень малыми объемами проб и достигать при этом высокой эффективности хроматографического разделения. Более того, малые объемы исследуемых проб позволяют использовать колонки с низким содержанием НЖФ, что дает возможность анализировать высокотемпературные органические соединения при рабочих температурах колонки, значительно более низких, чем температуры кипения этих соединений.

*Общие требования, предъявляемые к детекторам:*

- достаточная чувствительность;
- достаточная селективность;
- малая инерционность;
- малая зависимость показаний от параметров опыта (температуры, давления, скорости потока и др.);
- линейная связь между показаниями и концентрацией вещества;
- стабильность «нулевой линии»;
- легкость записи сигнала и передачи его на расстояние.

Для обнаружения и измерения количества аналитов в потоке подвижной фазы при выходе из хроматографической колонки используют различные типы

детекторов, выбор которых зависит от цели химико-токсикологического исследования и физико-химических особенностей анализируемых веществ. По способности реагирования на анализируемые соединения детекторы делятся на:

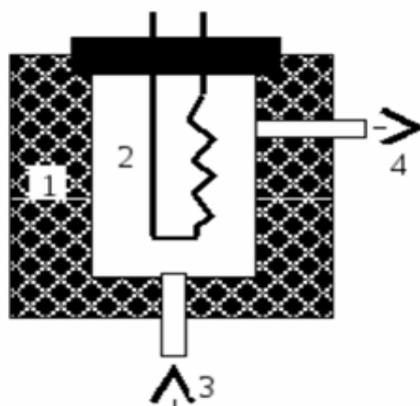
- непосредственно реагирующие на анализируемое вещество;
- дающие суммарный сигнал на вещество и газ-носитель.

В аналитической практике чаще используется первый тип детекторов, которые подразделяются на интегральные и дифференциальные.

Сигнал *интегрального детектора* пропорционален общей массе вещества в потоке газа-носителя, проходящем через детектор. При прохождении через детектор потока чистого газа-носителя на хроматограмме записывается прямая линия по горизонтальной оси, а при поступлении в детектор анализируемого вещества сигнал смещается по вертикальной оси в виде ступени. Расстояние, на которое смещается сигнал прямо пропорционально общей массе вещества. Таким образом, хроматограмма, полученная с помощью интегрального детектора состоит из серии ступеней, высота которых прямо пропорциональна массе соответствующего анализируемого вещества.

Сигнал *дифференциального детектора* пропорционален концентрации вещества в потоке газа-носителя или массовой скорости потока элюируемого вещества. Хроматограмма, получаемая с помощью этих детекторов состоит из серии пиков, площадь которых соответствует количеству вещества. Дифференциальные детекторы бывают двух видов: концентрационные и потоковые. Концентрационные детекторы показывают изменение концентрации вещества на выходе из колонки (детектор по теплопроводности). Потоковые детекторы измеряют поток вещества, который является произведением концентрации вещества на скорость движения потока (детектор ионизации в пламени).

*Детекторы по теплопроводности (ДТП), или катарометры. Принцип их работы основан на регистрации различий в теплопроводности газа-носителя при попадании в него анализируемого вещества (рисунок 12).*

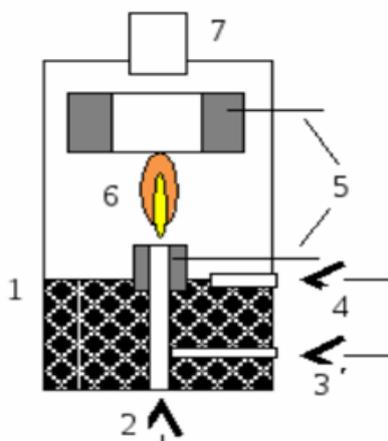


*Рисунок 12. Схема ячейки катарометра: 1 – корпус; 2 – нить накаливания; 3 – вход газа-носителя; 4 – сброс газа-носителя*

Чувствительность детектора пропорциональна относительной разности теплопроводностей газа-носителя и анализируемых веществ, поэтому для повышения чувствительности необходимо использовать газ-носитель с высокой теплопроводностью (например, водород или гелий). При использовании водорода или гелия на хроматограмме будут регистрироваться пики только в одном направлении, поскольку все вещества имеют более низкую теплопроводность, чем эти газы. Использование водорода ограничено не только его взрывоопасностью, но и возможностью реагирования с НЖФ. При применении азота в качестве газа-носителя пики на хроматограмме могут быть разнонаправленными относительно нулевой линии, поскольку теплопроводность веществ может колебаться в широких пределах: может быть как более низкой, так и более высокой. ДТП уступает большинству других детекторов по чувствительности, но в то же время обладает рядом преимуществ: универсальностью и неразрушающим характером детекции аналитов.

Принцип работы *пламенно-ионизационного детектора (ПИД или ДИП)* заключается в измерении тока, проходящего через водородное пламя горелки,

размещенной на выходе из колонки. Ток возникает за счет ионизации примесей, содержащихся в газе-носителе, водороде и воздухе, и является постоянным фоновым током детектора. Поскольку в пламени чистого водорода содержится незначительное количество ионов, сопротивление газового пространства очень велико и ток детектора весьма мал. При внесении с газом-носителем из колонки анализируемых веществ число ионов в пламени резко увеличивается, сопротивление пламени падает и в детекторе регистрируется соответствующее возрастание ионного тока (рисунок 13).



*Рисунок 13. Схема пламенно-ионизационного детектора:*

*1 – корпус; 2 – вход газа-носителя; 3 – подача водорода; 4 – подача кислорода; 5 – электроды; 6 – пламя; 7 – выход газов*

*Термоионный детектор (ТИД или ТДИ)* является разновидностью детектора ионизации в пламени и применяется для детектирования азотсодержащих соединений. Основное отличие от ДИП состоит в том, что в зону горения вводится соль щелочного металла. Введение паров соли щелочного металла в водородное пламя горелки дает термоионный эффект в виде увеличения чувствительности детектора к определенной группе органических соединений (фосфор- и азотсодержащих).

*Пламенно-фотометрический детектор (ПФД)* – его работа основана на измерении свечения водородного пламени при сгорании в нем фосфор- и серосодержащих соединений. Различие условий сжигания в пламенно-фотометрическом детекторе и пламенно-ионизационном состоит в том, что в

ПФД пламя обогащено водородом, в то время как в ПИД оно обогащено кислородом.

*Детектор электронного захвата (ДЭЗ или ЭЗД)* – потоковый детектор, применяется для определения галоген-, кислород- и азотсодержащих веществ, некоторых металлоорганических соединений и других веществ, содержащих атомы с явно выраженным сродством к электрону. В ионизационную камеру помещается радиоактивный источник, испускающий  $\beta$ -частицы, которые при столкновении с молекулами газа-носителя образуют свободные электроны и положительно заряженные молекулярные ионы. Под воздействием создаваемого между электродами постоянного напряжения образовавшиеся свободные электроны движутся к аноду с высокой скоростью, в результате в системе возникает электрический ток, который усиливается и регистрируется измерителем малых токов. Если в камеру детектора попадают соединения, способные захватывать электроны, то концентрация заряженных частиц в камере изменяется, что приводит к снижению фонового тока детектора. Таким образом, сигналом детектора является уменьшение начального тока, связанное с количеством анализируемого компонента. Чувствительность детектора зависит от природы анализируемых веществ, а также от вида и числа атомов, обладающих сродством к электрону.

В химико-токсикологическом анализе для идентификации и количественного определения наркотических средств и психотропных веществ в настоящее время широко используется метод масс-спектрометрического детектирования в сочетании с газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографией.

*Масс-спектральный детектор (МС)* – устройство, позволяющее детектировать масс-спектральные характеристики ионов веществ. Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами

или атомами, а масс-спектрометрия позволяет детектировать непосредственно сами частицы. Таким образом, масс-спектрометрический детектор можно рассматривать как универсальный детектор, который позволяет определить состав анализируемой смеси и идентифицировать разделяемые компоненты.

Масс-спектрометрия представляет собой совокупность трех процессов, состоящих в ионизации молекулы, разделении ионов по массам и детектировании ионов путем измерения отношения массы заряженных частиц к их заряду ( $m/z$ ) (рисунок 14).

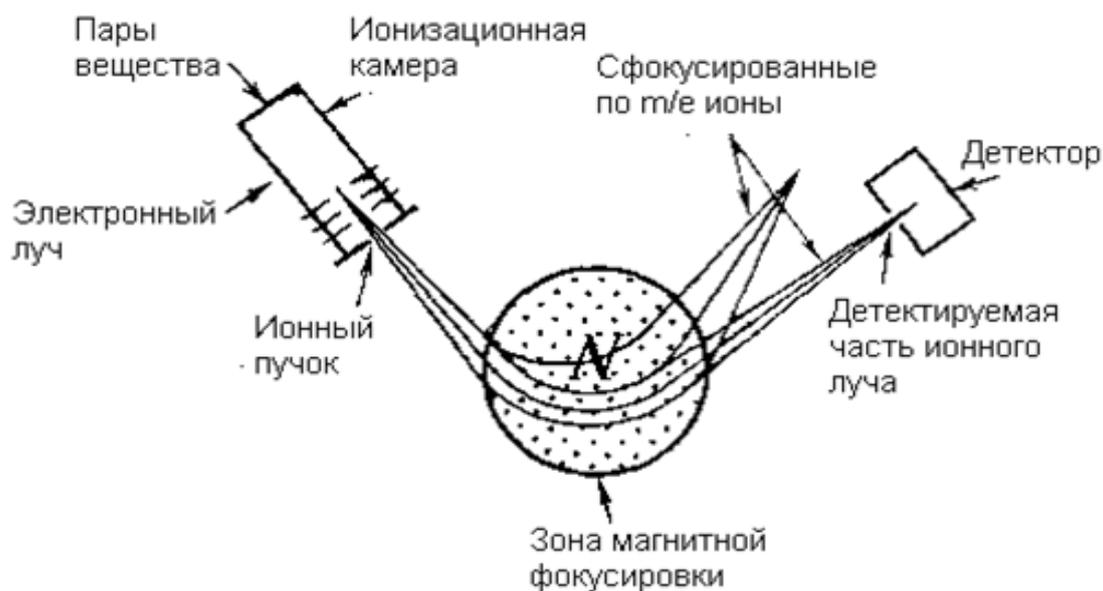


Рисунок 14. Схема и принцип работы масс-спектрометра

В масс-спектрометрии регистрируются только заряженные частицы (катион-радикалы, катионы). Регистрация ионов проводится в двух режимах: *сканирования* диапазона величин отношения массы к заряду для анализируемого вещества (SCAN) или *мониторинга характеристических ионов* анализируемого и других присутствующих в пробе веществ в пределах определенного заданного времени (селективный ионный мониторинг, SIM).

Для представления масс-спектральных данных используют графики, называемые масс-спектрами, которые дают информацию о молекулярной массе аналита и его структуре. Идентификация веществ осуществляется на основании выявления *характеристического иона* – молекулярного иона или его

фрагмента, характерного для вещества определенной химической структуры.

Важной аналитической характеристикой масс-спектрометрии является *разрешение* (или разрешающая способность) – количественная мера, характеризующая способность анализатора разделять ионы с различными значениями соотношения масса/заряд ( $m/z$ ). При этом, чем выше разрешение прибора, тем больше его способность различить два пика с близкими массами, т.е. определить точную массу иона.

В современных масс-спектрометрах используют различные механизмы и способы ионизации. *Ионизация* – процесс превращения нейтрального атома или молекулы в заряженную частицу путем удаления из них или присоединения к ним одного или нескольких электронов.

### ***Способы ионизации.***

При масс-спектрометрическом детектировании регистрируются исключительно заряженные частицы. Ни молекулы, ни радикалы не могут быть исследованы в своей исходной нейтральной форме.

Все существующие способы ионизации могут быть разделены на две группы: «мягкие» и «жесткие». Такое разделение основано на величине избытка внутренней энергии в образующемся молекулярном ионе. Если эта величина мала, фрагментация незначительна и ион регистрируется как молекулярный. Такой процесс называется «мягкой» ионизацией, он дает информацию о молекулярной массе соединения и его элементном составе (масс-спектрометрия высокого разрешения). Определенный избыток внутренней энергии запускает процесс разрыва химических связей в исходном молекулярном ионе, приводя к появлению различных фрагментных ионов. Иногда молекулярный ион вообще не удается зарегистрировать. Подобный процесс называется «жесткой» ионизацией, он позволяет получить структурную информацию благодаря массам фрагментных ионов.

*Электронная ионизация (electron ionization, EI)*, или электронный удар, является одним из наиболее известных способов ионизации, который применим

для относительно неполярных низкомолекулярных веществ. Ионизация вещества осуществляется потоком электронов с высокой энергией, источником которого является нагретая металлическая проволока (катод). Электроны, покидающие поверхность катода, разгоняются электрическим полем по направлению к аноду и проходят через объем, занятый анализируемым веществом, предварительно переведенным в газообразное состояние, с молекулами которого происходит взаимодействие, заключающееся в передаче энергии. Пролетая вблизи молекулы, электрон вызывает возбуждение ее электронной оболочки, в результате собственные электроны молекулы перемещаются на более высоколежащие орбитали. Начиная с определенных значений энергии (энергии ионизации), возбуждение заканчивается потерей электрона и превращением молекулы в соответствующий катион-радикал, называемый молекулярным ионом. Образующиеся катион-радикалы выталкиваются специальным электродом из ионизационной камеры и после фокусировки в узкий пучок направляются в анализатор. Эффективность ионизации зависит от энергии ионизирующих электронов, максимум эффективности достигается при энергии примерно 70 эВ.

Образующийся после взаимодействия молекулы с пучком электронов катион-радикал получает избыточную энергию, которая усиливает колебания связей и может стать причиной разрыва наиболее слабых из них (фрагментации). В результате фрагментации происходит распад молекулярного иона на две частицы, одна из которых – ион с меньшей массой (осколочный ион), вторая – радикал или нейтральный фрагмент.

Электронная ионизация – универсальный метод, позволяющий исследовать химические соединения разных классов. Однако у него есть существенный недостаток, состоящий в необходимости перевода молекул образца в газовую фазу. Именно поэтому метод непригоден для полярных, термолабильных и тяжелых молекул.

*Химическая ионизация (chemical ionization, CI)*, или ионизация в ионно-молекулярных реакциях, является более «мягким» методом, поскольку молекулярный ион получает небольшую порцию избыточной энергии, и степень фрагментации оказывается весьма незначительной. При CI вещества попадают в источник ионов, так же как и при EI. Ионизация образца осуществляется пучком предварительно ионизированных молекул газа (метана, изобутана, аммиака или аргона), в результате чего между ионами и анализируемыми молекулами могут протекать различные реакции:

- протонирование:  $M + BH^+ \rightarrow MH^+ + B$ ;
- перезарядка:  $M + X^+ \rightarrow M^+ + X$ ;
- электрофильное присоединение:  $M + X^+ \rightarrow MX^+$ .

Все эти реакции приводят к генерированию из нейтральной молекулы заряженных ионов (преимущественно катионов), которые стабильнее катион-радикалов.

Недостатками химической ионизации являются необходимость перевода образца в газовую фазу, слабо выраженная фрагментация и быстрое загрязнение источника ионов.

*Ионизация электрическим полем (field ionization, FI) и полевая десорбция (field desorption, FD)*. Оба метода относятся к «мягким» способам ионизации и имеют одинаковый механизм воздействия на вещество. Основную роль выполняет эмиттер – электрод, выполненный в виде узких пучков микроигл, на котором создается высокая напряженность электрического поля. Молекулярные орбитали вещества под действием поля искривляются, и происходит переход (туннелирование) электронов из молекулы на эмиттер. Энергия, переносимая в результате этого процесса, составляет доли электрон-вольт, поэтому в большинстве случаев пик молекулярного иона является единственным сигналом в спектре. Высокий положительный потенциал эмиттера выталкивает образовавшийся молекулярный ион по направлению к детектору.

Выбор одного из описанных способов ионизации для проведения исследования определяется агрегатным состоянием анализируемой пробы. Ионизация электрическим полем (FI) применяется для получения масс-спектров газообразных соединений (при этом эмиттер находится в заполненной газом-веществом камере). При ионизации десорбцией электрическим полем (FD) вещество непосредственно наносится на эмиттер, что позволяет анализировать жидкости и твердые вещества.

*Бомбардировка быстрыми атомами (fast atom bombardment, FAB) и масс-спектрометрия вторичных ионов с ионизацией в жидкой фазе (liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS).* Ионизация осуществляется пучком разогнанных атомов (чаще атомами аргона и ксенона), который направляется на раствор вещества, нанесенного на металлическую подложку. Взаимодействуя с раствором, атомы создают интенсивный локальный разогрев, в результате чего молекулы, находящиеся на поверхности, испаряются, формируя над поверхностью образца область высокотемпературной плазмы, в которой протекает ионизация.

Для получения пучка атомов используют два подхода. В первом случае вначале генерируют ионы соответствующего газа, которые ускоряют потенциалом 6 – 8 кВ. Разогнанные ионы направляются далее в область с нейтральным газом, где, сталкиваясь с нейтральными частицами, передают им свою кинетическую энергию. Ускоренные таким образом атомы направляются на поверхность образца. В другом методе разогнанные ионы перед бомбардировкой образца проходят через пучок электронов, движущихся в перпендикулярном направлении. Захватывая электроны, ионы превращаются в атомы.

Отличие масс-спектрометрии вторичных ионов с ионизацией в жидкой фазе (LSIMS) заключается в том, что вместо атомов образец бомбардируется разогнанными ионами, – чаще всего  $\text{Cs}^+$ .

Такие способы ионизации нельзя назвать «мягкими», поскольку бомбардировка быстрыми атомами приводит к передаче молекулам значительной энергии, в результате чего наряду с пиками молекулярных ионов в спектрах некоторых соединений наблюдаются интенсивные пики осколочных ионов.

*Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)* заключается в облучении короткими лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор анализируемого соединения в органической матрице. В процессе облучения над поверхностью образца создается область высокотемпературной плазмы, в которой происходит ионизация. Образующиеся ионы с помощью фокусирующего электрода выводятся из зоны ионизации и направляются в анализатор. Ценность метода MALDI заключается в возможности анализа сложных молекул, например, белков, полимеров и нуклеиновых кислот.

*Ионизация распылением в электрическом поле (electrospray ionization, ESI)*. Вещество для ионизации поступает в растворе полярного растворителя (им может быть вода, ацетонитрил, метанол и т.д.), при этом в растворе присутствуют катионы водорода или щелочных металлов (натрия или калия). Раствор вещества поступает в тонкий капилляр (диаметр около 0,1 мм), на который подается высокое напряжение (2 – 5 кВ). Раствор выходит из капилляра в виде очень мелкого аэрозоля, состоящего из заряженных капель. Заряженные капли движутся в направлении анализатора к противоэлектроду, по пути движения капли уменьшаются в размерах за счет испарения, которому способствует ток сухого азота в первом сепараторе и вакуум – во втором. Достигая определенного критического размера, при котором силы поверхностного натяжения не способны противостоять силам кулоновского отталкивания, капли взрываются (кулоновский взрыв), распадаясь на более мелкие. Этот процесс продолжается до тех пор, пока не заканчивается

образованием иона анализируемого соединения. Далее через узкие отверстия сепараторов ионизированные частицы попадают в ионную оптику.

### ***Механизмы ионизации.***

*Протонирование* – механизм ионизации, при котором к молекуле присоединяется протон, сообщая ей заряд  $1+$  на каждый присоединенный протон. Положительные заряды обычно локализуются на основных частях молекулы, таких, как амины, с образованием стабильных катионов. При помощи протонирования часто ионизируют пептиды. Протонирование осуществляется при таких способах ионизации, как MALDI и ESI.

*Депротонирование* – механизм ионизации, при котором отрицательный заряд  $1-$  получается при отрыве протона от молекулы. Такой механизм ионизации обычно осуществляется при MALDI и ESI и эффективен для определения в образцах пробы веществ кислого характера, включая фенолы, карбоновые и сульфоновые кислоты.

*Катионизация* – механизм ионизации, в котором заряженный комплекс образуется при координационном присоединении положительно заряженного иона к нейтральной молекуле, при этом катионизацией считается присоединение иона, отличного от протона, например щелочного металла или аммония. Катионизация применима к молекулам, которые не способны к протонированию. Связь катионов, в отличие от протонов, с молекулой менее ковалентна, поэтому заряд будет локализован на катионе, что минимизирует размывание заряда и фрагментацию молекулы. Такой механизм ионизации эффективен для углеводов. Катионизация может осуществляться при MALDI и ESI.

*Прямой перенос заряженной молекулы в газовую фазу.* Перенос соединений, уже заряженных в растворе, легко достигается при использовании десорбции или путем выбрасывания заряженных частиц из конденсированной фазы в газовую. Обычно этот механизм осуществляется при MALDI или ESI.

*Электронный удар* (отрыв электрона). Отрыв электрона придает молекуле

1+ положительный заряд, в результате чего образуются катион-радикалы. Такой механизм ионизации обычно применяется для относительно неполярных соединений с низкой молекулярной массой и часто приводит к образованию значительных количеств фрагментарных ионов.

*Захват электрона.* Отрицательный заряд 1- придается молекуле при присоединении электрона. Этот механизм ионизации применим для молекул с большим сродством к электрону, таких, как галогенсодержащие соединения.

***Типы масс-анализаторов***, используемых для разделения и регистрации ионов.

*Магнитный секторный масс-спектрометр (magnetic sector).* Исторически первый из предложенных типов анализаторов. Принцип его работы состоит в том, что вылетающие из источника ионов частицы при помощи ускоряющего поля и системы электродов попадают в магнитное поле анализатора. Под действием поля траектория движения частиц искривляется, и ион начинает двигаться по окружности, радиус которой пропорционален величине  $m/z$ . Ионы с меньшим значением  $m/z$  отклоняются сильнее, чем более тяжелые. Однако ионы, вылетающие из источника, имеют разную кинетическую энергию и, следовательно, скорость, поэтому ионы с одинаковым отношением  $m/z$ , но разной скоростью несколько отклоняются от средней траектории, что приводит к размытию сигнала и потере разрешающей способности. Для получения спектра высокого разрешения используется система двойной фокусировки, где помимо магнитного анализатора на пути движения ионов помещают электростатический анализатор. В электрическом поле ионы также начинают двигаться по окружности, однако в этом случае траектория движения зависит от кинетической энергии частицы. Ионы с большей энергией отклоняются сильнее и проходят большее расстояние, с меньшей энергией – меньше. В результате достигается более точная фокусировка пучка и, как следствие, высокое разрешение (рисунок 15).

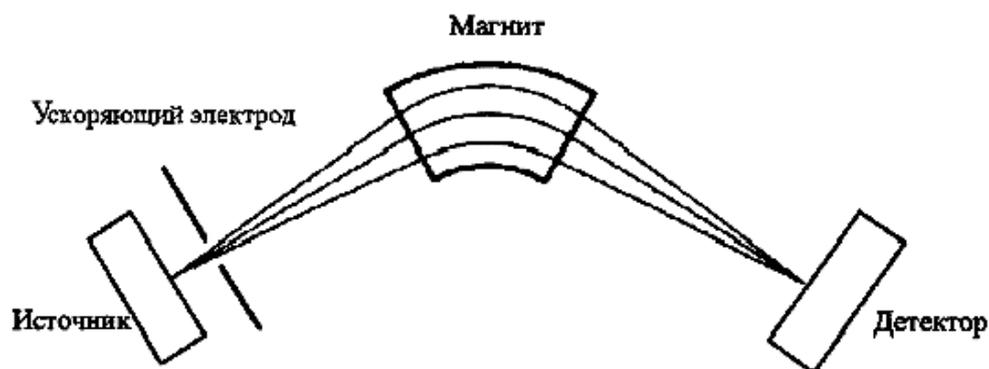


Рисунок 15. Схема масс-спектрометра с магнитным анализатором

Квадрупольный масс-спектрометр (*quadrupole*) состоит из четырех параллельных стержней круглого или гиперболического сечения. Противоположные стержни соединены друг с другом, и к ним подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжений (рисунок 16). Попав в анализатор, положительно заряженный ион будет двигаться к отрицательно заряженному стержню, однако, если полярность последнего изменится, ион изменит направление движения. В результате, под действием электрического поля ионы, вводимые в квадруполь, начинают колебаться относительно осей  $x$  и  $y$ . Так как каждый ион имеет свою собственную частоту колебаний, зависящую от массы, через анализатор проходят лишь те из них, частота которых находится в резонансе с радиочастотой квадруполя. Прошедшие анализатор ионы регистрируются детектором. Поскольку величина соотношения  $m/z$  зависит от радиочастотной составляющей, ее постепенное изменение позволяет просканировать всю рабочую область соотношения  $m/z$  и получить масс-спектр.

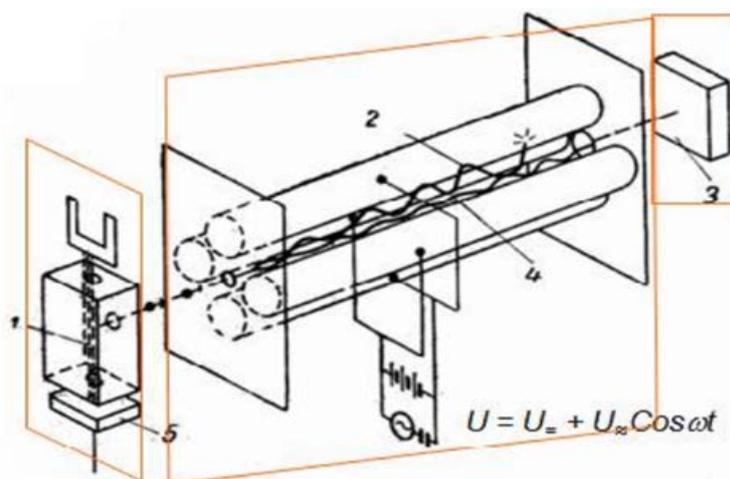


Рисунок 16. Схема квадрупольного масс-спектрометра: 1 – ионизирующий пучок электронов, 2 – раскачиваемый ион, 4 – нераскачиваемый ион, 3 и 5 – коллекторы ионов

*Ионная ловушка (ion trap).* Работа этого анализатора основана на тех же принципах, что и квадрупольного масс-спектрометра. Основой прибора являются 3 электрода: два концевых гиперболической формы имеют потенциал земли, между ними находится кольцевой электрод, на который подается радиочастотное напряжение. Эта система электродов создает подобие ловушки, попадая в которую ионы начинают двигаться по замкнутым орбитам внутри кольцевого электрода. Пространство внутри ловушки заполнено инертным газом (чаще всего гелием): для того, чтобы в результате столкновений с ионами принимать их избыточную энергию и не давать им распадаться дальше или взаимодействовать с другими ионами. Образовавшиеся ионы некоторое время удерживаются в ловушке. После подачи дополнительного радиочастотного сигнала на концевые электроды импульсное изменение амплитуды радиочастотного напряжения заставляет ионы с определенным соотношением  $m/z$  переходить на нестабильные траектории и покидать ловушку, попадая на электронный умножитель. В результате генерируется масс-спектр.

*Времяпролетный анализатор (time-of-flight, TOF).* Его работа основана на принципе, в соответствии с которым скорость движения разогнанных ионов обратно пропорциональна их массе. Ионы из источника разгоняются электрическим полем, приобретая достаточно большую кинетическую энергию,

и вылетают в бесполевое пространство. На входе в это пространство все ионы имеют одинаковую кинетическую энергию, однако, в зависимости от массы, они двигаются с разными скоростями и, соответственно, достигают детектора, расположенного в конце трубы их пролета, через разный промежуток времени: тяжелые ионы позже, чем более легкие.

Зарегистрировав ионы и измерив время достижения детектирующей системы, можно посчитать и их массу. Все процессы происходят за миллионные доли секунды. Существенное преимущество такого анализатора состоит в том, что все попавшие в анализатор ионы доходят до детектирующей системы. Разрешающая способность современных времяпролетных масс-спектрометров достигает сотен тысяч, они обладают высокой точностью измерения масс, а также неограниченным диапазоном масс (возможностью измерять массы очень больших молекул). Кроме того, благодаря единовременному старту ионов со всеми значениями соотношения  $m/z$  к детектору, масс-спектры оказываются идентичными вне зависимости от того, в какой части хроматографического пика они были зарегистрированы. Это важное преимущество времяпролетных анализаторов по сравнению с другими масс-спектрометрами (рисунок 17).

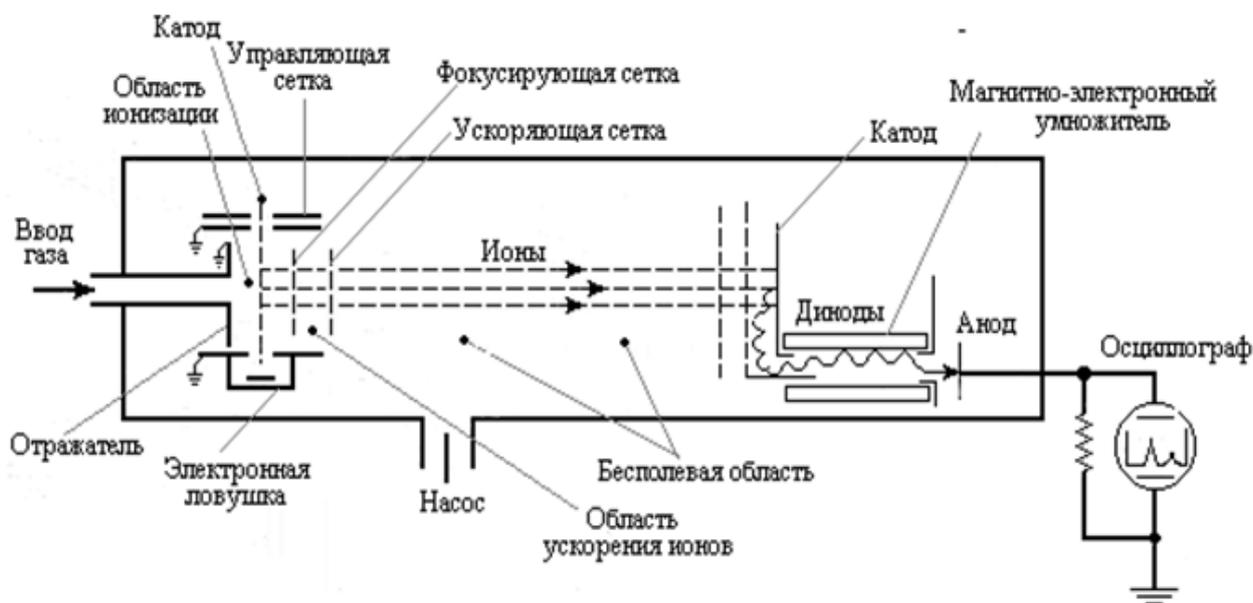


Рисунок 17. Схема времяпролетного масс-анализатора

*Методы детектирования ионов.* Конечный блок масс-спектрометра отвечает за детектирование ионов. В первых классических приборах использовались фотопластинки, на которые подавались пучки ионов. Места, в которые попадали пучки, были светлыми, а отсутствию ионов соответствовали темные места. В настоящее время в ХТА применяются более совершенные методы детектирования ионов.

*Чашка Фарадея* (или цилиндрический электрод). Принцип его действия заключается в излучении электрона при ударе иона о поверхность вторичного электрода с последующим усилением полученного тока и его изменения. Недостатком этого детектора является низкая чувствительность.

*Электронный умножитель* – усовершенствованная модель чашки Фарадея, в которой происходит многократное (до  $10^6$  раз) усиление сигнала ионов.

*Сцинтилляционный счетчик* (или *фотоумножитель*). В настоящее время это основной тип детектора, используемого в масс-спектрометрии. Принцип его работы состоит в следующем: ионы ударяют в динод (электрод, обладающий высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии), в результате высвобождаются электроны, которые ударяют о промежуточные электроды (эмиттеры), «выбивая» из них каждый по 2-3 электрона, в результате чего количество электронов лавинообразно растет и к аноду «подлетает» многократно увеличенное количество электронов.

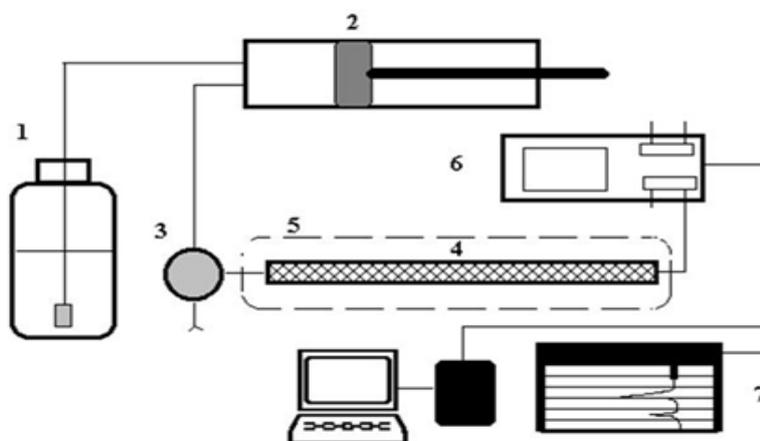
**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)** является одним из методов хроматографического разделения смесей веществ и широко применяется при анализе наркотических средств и психотропных веществ.

В зависимости от неподвижной фазы различают два варианта жидкостной хроматографии: жидкость-твердофазную и жидкость-жидкостную (когда неподвижная жидкая фаза закрепляется на твердом носителе).

В отличие от газовой хроматографии, которая позволяет осуществлять разделение веществ, легко переводимых в парообразное состояние под

действием высокой температуры, аналитические возможности ВЭЖХ определяются растворимостью аналита в подвижной фазе (в качестве которой используется жидкость), что позволяет выделять, а также качественно и количественно анализировать сложные смеси нелетучих термолабильных органических соединений с различной молекулярной массой. Отличительной особенностью ВЭЖХ является также использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (обычно от 1,8 до 5 мкм).

На рисунке 18 представлена принципиальная схема высокоэффективного жидкостного хроматографа.



*Рисунок 18. Блок-схема жидкостного хроматографа: 1 – емкость с элюентом; 2 – насос; 3 – инжектор; 4 – колонка; 5 – термостат; 6 – детектор; 7 - регистрирующая система*

Насос предназначен для создания постоянного потока растворителя. Его конструкция определяется, прежде всего, рабочим давлением в системе, а также необходимостью смешивания различных растворителей непосредственно перед введением в хроматографическую колонку. Инжектор обеспечивает ввод пробы смеси разделяемых компонентов в колонку с достаточно высокой воспроизводимостью. Колонки для ВЭЖХ представляют собой толстостенные трубки из нержавеющей стали, способные выдержать высокое давление. Большую роль играет плотность и равномерность набивки колонки сорбентом. Термостат обеспечивает постоянство температуры. Регистрирующая система в простейшем случае состоит из дифференциального усилителя и самописца. В

сложных хроматографических системах используется блок интерфейса, соединяющий хроматограф с персональным компьютером, который осуществляет сбор и обработку информации, а также управление прибором.

Основными характеристиками метода ВЭЖХ являются эффективность и селективность. *Эффективность*, как и в газовой хроматографии, измеряется числом теоретических тарелок (ЧТТ): чем выше эффективность, тем больше ЧТТ. К значительной потере эффективности может привести эффект размывания. Вещества вводятся в колонку в виде узкой зоны, которая, размываясь в результате диффузионных процессов, расширяется по мере ее продвижения по колонке. Мерой размывания является высота эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ). Установлено, что размывание полосы в хроматографической колонке обусловлено тремя причинами: наличием вихревой диффузии, молекулярной диффузии и сопротивления массопередаче. Размывание в колонке уменьшается при использовании более мелких сорбентов, более равномерных по составу (узкая фракция), более плотно и равномерно упакованных в колонке, а также при использовании более тонких слоев привитой фазы, менее вязких растворителей и оптимальных скоростей потока.

*Селективность* – это способность данной хроматографической системы разделять конкретные соединения в смеси веществ. В ВЭЖХ она определяется выбором условий разделения с учетом различий во взаимодействии разделяемых веществ как в неподвижной, так и в подвижной фазах. Необходимо отметить, что, в отличие от газовой хроматографии, в которой взаимодействия в подвижной (газовой) фазе незначительны и селективность системы в основном определяется только взаимодействиями веществ с неподвижной фазой, в жидкостной хроматографии подвижная (жидкая) фаза не является инертной, а селективно взаимодействует с разделяемыми веществами. Поэтому в ВЭЖХ при выборе условий хроматографического разделения необходимо учитывать 3 важных фактора:

- природу сорбента,
- природу растворителя (элюента),
- химическую структуру и свойства разделяемых компонентов.

При подборе систем растворителей учитывают как растворимости компонентов смеси, так и элюотропные ряды растворителей.

Важным параметром удерживания в жидкостной хроматографии является коэффициент емкости  $k$ , определяемый как отношение массы вещества в неподвижной фазе к массе вещества в подвижной фазе:

$$k = \frac{m_n}{m_p}$$

где  $m_n$  – масса вещества в неподвижной фазе;

$m_p$  – масса вещества в подвижной фазе.

Для того, чтобы анализируемые вещества разделялись на колонке, коэффициент емкости  $k$  должен быть больше 0, т. е. вещества должны удерживаться неподвижной фазой. В то же время значение коэффициента емкости не должно быть слишком большим, чтобы получить приемлемое время элюирования. Если для данной смеси веществ выбрана неподвижная фаза, обеспечивающая достаточное удерживание аналитов, то в дальнейшем выбирается такой растворитель, который может обеспечить различные для всех анализируемых компонентов коэффициенты емкости. Этого добиваются, меняя элюирующую силу растворителя.

*Элюирующая способность* (сила) – это способность подвижной фазы вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности сорбента, что способствует десорбции разделяемых соединений и более быстрому перемещению хроматографических зон.

*Неподвижная фаза* в ВЭЖХ обычно представляет собой инертный материал, поверхность которого химически модифицирована, или полимер с заранее известными сорбционными свойствами, или внутреннюю поверхность колонки, обработанную специальным образом.

Основные типы сорбентов для ВЭЖХ:

- 1) поверхностно-пористые сорбенты, представляющие собой непроницаемое для растворителя твердое ядро из стекла, на поверхность которого нанесен тонкий слой пористого абсорбента (обычно силикагеля);
- 2) пористые сорбенты на основе силикагеля;
- 3) пористые сорбенты на основе оксида алюминия;
- 4) пористые сорбенты на полимерной основе.

В качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ наибольшее применение находят носители на основе силикагеля или пористых полимеров (PRP-1, RS-пак, DS-613 и др.).

*Подвижная фаза* (элюент) в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию:

- 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке;
- 2) регулирует константы равновесия, и, следовательно, удерживание в результате взаимодействия как с неподвижной фазой (сорбируясь на ее поверхности), так и с молекулами разделяемых веществ.

В качестве подвижной фазы в ВЭЖХ обычно используют чистые растворители или их смеси. Чем сильнее растворитель адсорбируется неподвижной фазой, тем выше его элюирующая способность. Поэтому к растворителям, составляющим подвижную фазу, предъявляются довольно жесткие требования:

- чистота растворителя (различные примеси в подвижной фазе влияют на разделение в колонке, детектирование и воспроизводимость результатов);
- химическая инертность;
- совместимость с детектором. Наиболее распространенными в практике ВЭЖХ детекторами в настоящее время являются диодно-матричные УФ-детекторы, с которыми не могут быть использованы такие растворители, как бензол, толуол, четыреххлористый углерод, диметилформамид и хлороформ, а также сложные эфиры и кетоны;

- вязкость растворителя – должна быть по возможности низкой, так как ее повышение ведет к ухудшению массопередачи и эффективности разделения.

Взаимодействие растворителя с растворенным веществом определяется основными типами межмолекулярных взаимодействий: дисперсионным, индукционным, донорно-акцепторным (включая образование водородной связи) и диэлектрическим (сольватация ионов). Суммарный эффект всех типов взаимодействий определяет полярность растворителя, а преимущественное проявление какого-либо из них – его селективность. Полярность растворителя определяет его элюирующую силу: в адсорбционной и нормально-фазной распределительной хроматографии с увеличением полярности элюирующая сила растворителя возрастает, а в обращенно-фазной, наоборот, снижается. Чем больше элюирующая сила подвижной фазы, тем меньше коэффициент емкости для данного вещества на данном сорбенте. Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют элюотропным рядом. В адсорбционной хроматографии общепринятым является элюотропный ряд Снайдера.

Для повышения эффективности разделения высокополярных и ионогенных компонентов в подвижную фазу вводят специфические добавки: фосфорную и уксусную кислоты – для разделения соединений кислого характера; аммиак и алифатические амины – для разделения соединений основного характера, алкилсульфаты натрия – для разделения соединений анионного характера, соли тетраалкиламмония – для разделения соединений катионного характера.

При проведении исследований биологических объектов методом ВЭЖХ необходимо обращать внимание на следующие факторы, оказывающие значительное влияние на результаты анализа:

- *Соблюдение технологии приготовления проб.* Сухие остатки, подготовленные для анализа, следует растворять в наименее полярном из возможных растворителей, совместимом с детектором. Полученный раствор

необходимо фильтровать через мелкопористые фильтры для удаления механических микропримесей, которые могут загрязнить колонку, что приведет к снижению ее эффективности.

- *Ограничение объема вводимой пробы.* Поскольку емкость хроматографических колонок для ВЭЖХ незначительная, необходимо ограничивать объем вводимой пробы. В аналитической ВЭЖХ обычно работают с пробами объемом от 1 до 10 мкл.

- *Минимизация «мертвого объема»* хроматографической системы. Эффективность разделения в ВЭЖХ в большой степени зависит от величины «мертвого объема», который складывается из объемов свободного пространства между местом ввода пробы и колонкой, между колонкой и детектором, а также объема соединительных трубок в детекторе. «Мертвый объем» вызывает размытие хроматографической зоны, поэтому необходимо добиваться максимального его уменьшения.

- *Очистка растворов от механических примесей.* Все растворы, используемые в качестве компонентов подвижной жидкой фазы необходимо фильтровать через мелкопористые фильтры для удаления механических микропримесей.

- *Промывка хроматографических колонок.* В качестве подвижных жидких фаз в ВЭЖХ часто используются водные растворы солей, которые могут вызвать модификацию сорбента, а так же приводить к прорастанию грибковой микрофлоры при их длительном нахождении в колонке. Поэтому после хроматографического разделения колонки обязательно прокачиваются специальными промывочными растворами, в составе которых обязательно наличие не менее 50% органического растворителя. После промывки колонка остается заполненной данным раствором до проведения следующего исследования.

В зависимости от механизма взаимодействия разделяемого вещества с неподвижной фазой выделяют несколько видов ВЭЖХ: адсорбционная,

распределительная, ионообменная, ион-парная, лигандообменная, эксклюзионная и аффинная.

В ходе *адсорбционной хроматографии* разделение осуществляется в результате взаимодействия разделяемого вещества с адсорбентом (таким, как силикагель или оксид алюминия), имеющим на поверхности активные полярные центры, при этом элюент представляет собой неполярную жидкость. Механизм сорбции состоит в специфическом взаимодействии между полярной поверхностью сорбента и полярными (либо способными поляризоваться) участками молекул анализируемого компонента. В процессе продвижения по колонке разделение молекул веществ осуществляется благодаря различной их способности к взаимодействию с адсорбционными центрами. Достигаемое при этом разделение компонентов зависит от взаимодействия, как с растворителем, так и с адсорбентом.

*Распределительная хроматография.* Разделение смеси веществ осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися фазами: элюентом (подвижной фазой) и фазой, находящейся на сорбенте (неподвижной фазой).

Распределительная жидкостная хроматография в зависимости от полярности сорбента и элюента подразделяется на нормально-фазовую и обращенно-фазовую. При нормально-фазовом варианте адсорбция веществ осуществляется из неполярного элюента на сорбент, содержащий полярные группы, привитые к его поверхности. В качестве модификаторов поверхности силикагеля (привитых фаз) используются замещенные алкилхлорсиланы, содержащие полярные группы, такие как нитрильная, аминогруппа и другие. Разделение веществ происходит путем донорно-акцепторного взаимодействия или образования водородных связей. Обращенно-фазовая жидкостная хроматография основана на распределении компонентов смеси между полярным элюентом и неполярными группами (длинными алкильными или алкилсилильными), привитыми к поверхности сорбента. Взаимодействие

осуществляется благодаря дисперсионному (гидрофобному) взаимодействию разделяемых молекул с поверхностью (образование водородной связи возможно в подвижной фазе лишь с молекулами элюента, содержащего воду).

В *ионообменной хроматографии* разделение компонентов смеси достигается за счет обратимого взаимодействия ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента. Вещества, имеющие разное сродство к фиксированным зарядам, разделяются на анионитах или на катионитах. Поверхность анионитов имеет положительно заряженные группы, которые сорбируют из подвижной фазы анионы. Катиониты, соответственно, содержат группы с отрицательным зарядом, взаимодействующие с катионами. В качестве подвижной фазы используют водные растворы солей кислот, оснований, а также другие растворители (например, водный раствор аммиака), т.е. системы растворителей, имеющих высокое значение диэлектрической проницаемости и большую тенденцию ионизировать соединения. В качестве неподвижных фаз в ионообменной хроматографии применяют ионообменные смолы и силикагели с привитыми ионогенными группами. При хроматографическом разделении ионы анализируемого вещества конкурируют с ионами, содержащимися в элюенте, стремясь вступить во взаимодействие с противоположно заряженными группами сорбента. Таким образом, ионообменную хроматографию можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть каким-либо образом ионизированы.

*Ион-парная хроматография* представляет собой своеобразную комбинацию адсорбционной и ионообменной хроматографии. В качестве неподвижной фазы используют гидрофобный адсорбент, а подвижной – водно-органический элюент с добавлением поверхностно-активных ионогенных соединений (ион-парных реагентов), например, додецилсульфата Na или триметилацетиламмония бромида. Разделение основано на способности гидрофобной поверхности адсорбента удерживать ион-парный реагент путем образования ионита, за счет чего поверхность адсорбента приобретает

определенный заряд, в результате происходит разделение ионогенных соединений. Одним из вариантов ион-парной хроматографии является предварительное образование ионных пар разделяемых ионов с ион-парным реагентом, которые затем удерживаются на гидрофобной поверхности адсорбента.

*Лигандообменная хроматография* основана на различной способности разделяемых соединений образовывать комплексы с катионами переходных металлов (Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) и других) и фиксированными группами (лигандами) неподвижной фазы. Часть координационной сферы ионов металла занята молекулами воды или другими слабыми лигандами, которые могут вытесняться молекулами разделяемых соединений. Этот вид ВЭЖХ наиболее эффективен для разделения оптических изомеров.

*Эксклюзионная хроматография* (ситовая, гель-проникающая или гель-фильтрационная) представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в котором разделение основано на различиях в размерах молекул. В отличие от других вариантов ВЭЖХ, где разделение идет за счет различного взаимодействия компонентов с поверхностью сорбента, роль твердого наполнителя в эксклюзионной хроматографии заключается в формировании пор определенного размера, а неподвижной фазой является растворитель, заполняющий эти поры. Поэтому применение термина «сорбент» к данным наполнителям в определенной степени условно. Молекулы малых размеров проникают в сравнительно тонкие поры сорбента и задерживаются в них, крупные молекулы либо не проникают в поры, либо проникают лишь в широкие поры и проходят колонку с незначительным удерживанием. Поверхность сорбента и состав элюента подбирают так, чтобы исключить или уменьшить энергию адсорбционного взаимодействия. Эксклюзионная хроматография применяется для разделения олигомеров и полимеров.

*Аффинная хроматография* (биоспецифическая) основана на образовании прочной связи со специфическими группами неподвижной фазы (лигандами

или аффинантами). Взаимодействие лигандов с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних. Так, например, при разделении ферментов лигандами служат их субстраты, ингибиторы или коферменты, токсинов – рецепторы, белков – антитела и т. д. Аффинная хроматография используется для выделения ферментов, белков или гормонов.

**Принцип детектирования, детекторы и предъявляемые к ним требования.** Детектирование компонентов анализируемой пробы основано на регистрации изменений отдельных физико-химических свойств подвижной фазы (поглощения или излучения света, способности флюоресцировать, электропроводности, способности окисляться или восстанавливаться, диэлектрической проницаемости и т.д.), которые определяются наличием в ней молекул разделяемых соединений. В настоящее время жидкостные хроматографы оснащаются широким спектром детекторов (таблица 8).

Таблица 8. Типы детекторов для ВЭЖХ

<i>Детекторы</i>	<i>Принцип детектирования</i>
Спектрофотометрический (УФ) детектор	В основе лежит поглощение монохроматического светового потока анализируемым веществом, содержащимся в элюате и выходящим из колонки. В процессе элюирования измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ.
Флюоресцентный детектор	Принцип работы основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Применяется для детектирования соединений, обладающих флуоресцентными свойствами или сравнительно легко переводимых во флюоресцирующие соединения.
Диодная матрица (DAD)	Позволяет с большой скоростью определять поглощение света в широком диапазоне длин волн без остановки потока подвижной фазы. «Матрица» фотодиодов постоянно регистрирует поглощение электромагнитного (светового) излучения в режиме сканирования, что позволяет снимать неискаженные спектры быстро проходящих через ячейку детектора компонентов анализируемой смеси, растворенных в элюенте.

Рефрактометрический детектор	Принцип работы основан на изменении показателя преломления элюата на выходе из колонки.
Быстросканирующий УФ-детектор (FSD)	Определяет поглощение света в широком диапазоне длин волн ультрафиолетовой области спектра
ИК-детектор	Принцип работы основан на регистрации поглощения в инфракрасной области спектра.
Электрохимический детектор	Применяется для анализа веществ, обладающих электрохимической активностью (способных при определенном потенциале окисляться или восстанавливаться). Регистрируются электрохимические свойства соединений в потоке элюента. Различают детекторы, которые реагируют либо на изменение свойств элюата (кондуктометрический детектор), либо на конкретный компонент элюата (амперометрический). Большинство электрохимических детекторов работают в амперометрическом режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами, погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени.
Масс-детектор	Принцип работы основан на детектировании ионов, образующихся в ходе воздействия на пробу высокого пучка электронов. Используют масс-спектрометры высокого разрешения и достаточного быстродействия с химической ионизацией при атмосферном давлении или ионизацией с применением электрораспыления.
Детектор по светорассеянию испаренного образца (ELSD)	Принцип работы основан на распылении хроматографического элюента в смеси с инертным газом, испарении подвижной фазы в пролётной трубке и детекции оставшихся частиц образца по светорассеянию.
Лазерный детектор испарительного светорассеяния (ELLSD)	Детектор светорассеяния, оснащенный лазером в качестве источника света.
Детектор заряженного аэрозоля (CAD)	Поток элюента смешивается с потоком сухого воздуха или азота, превращаясь в аэрозоль, капли которого, высыхая, образуют твердые частицы. После этого поток элюента смешивается с газом, несущим положительно заряженные ионы, при этом заряд перераспределяется на образовавшиеся частицы. Суммарный заряд, приобретенный частицами, фиксируется в зоне коллектора.

Детекторы, применяемые в ВЭЖХ, должны отвечать ряду требований:

- детектор не должен вызывать размывания зоны хроматографического пика,
- должен обладать высокой чувствительностью,
- детектор не должен вызывать разрушения анализируемого образца,
- температура, скорость потока и состав растворителя не должны оказывать влияния на работоспособность детектора,
- отклик детектора на количество вещества должен быть линейным в широком диапазоне,
- при прохождении вещества детектор должен давать как качественную информацию, подтверждающую состав или строение вещества, так и количественную.

### **Алгоритмы лабораторной диагностики употребления наркотических средств**

*(по материалам утвержденных МЗ РБ инструкций по применению  
методик определения наркотических средств в биологических жидкостях)*

Результатом активно осуществлявшейся в течение многих последних лет научно-практической деятельности явилась разработка методик, использование которых в специализированных лабораториях позволило реализовать принципы унификации и стандартизации технологий лабораторного исследования, под которыми понимается научно обоснованный выбор и внедрение в практику работы лабораторий химико-токсикологического анализа единых аналитических процедур, в наибольшей мере удовлетворяющих современному уровню развития медицинской науки и потребностям практики, обеспечивающих надежность и сопоставимость результатов диагностических исследований, выполняемых в различных лабораториях.

На рисунках 19, 20, 21, 22 и 23 представлены алгоритмы химико-токсикологического исследования, направленного на выявление в

биологических жидкостях организма человека наркотических средств и психотропных веществ (по материалам утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкций по применению методик определения наркотических средств в биологических жидкостях).

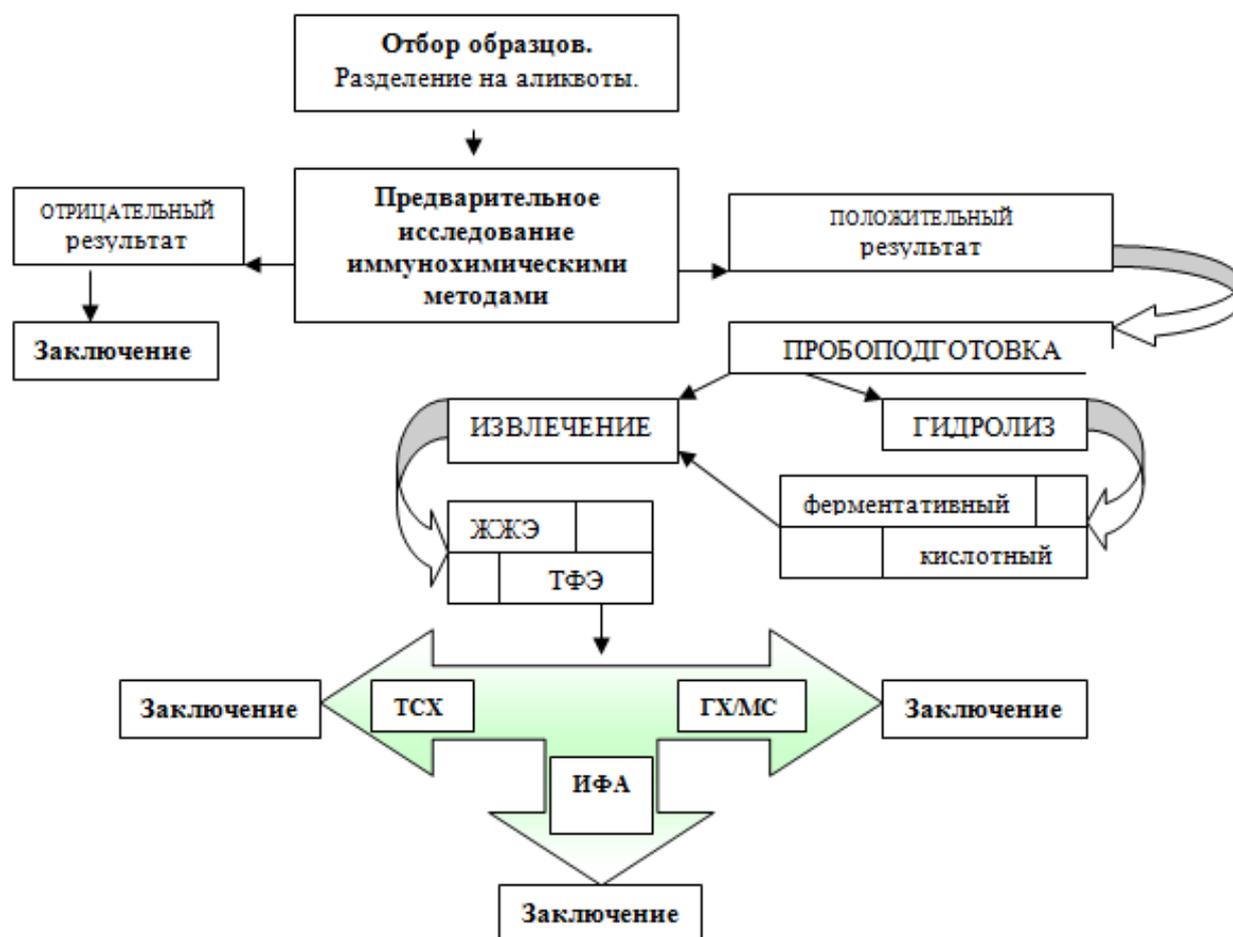


Рисунок 19. Алгоритм лабораторно-диагностического исследования отравления опиатами

(Инструкция по применению № 061-0610 «Методика обнаружения и количественного определения опиатов в биологических жидкостях»)

О высокой диагностической надежности лабораторного исследования свидетельствуют показатели: диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), предсказательной ценности положительного (ПЦ+) и отрицательного результатов (ПЦ-) теста, представленные в таблице 9.

Таблица 9. Показатели диагностической надежности методов ХТА

Показатели	ИХ	ТСХ	ПФИА	ГХ/МС
ДЧ	100%	98%	98%	100%
ДС	93,3%	88%	88%	100%
ДЭ	98,3%	98,9%	98,9%	100%
ПЦ+	93,8%	89%	89%	100%
ПЦ-	100%	97,9%	97,9%	100%

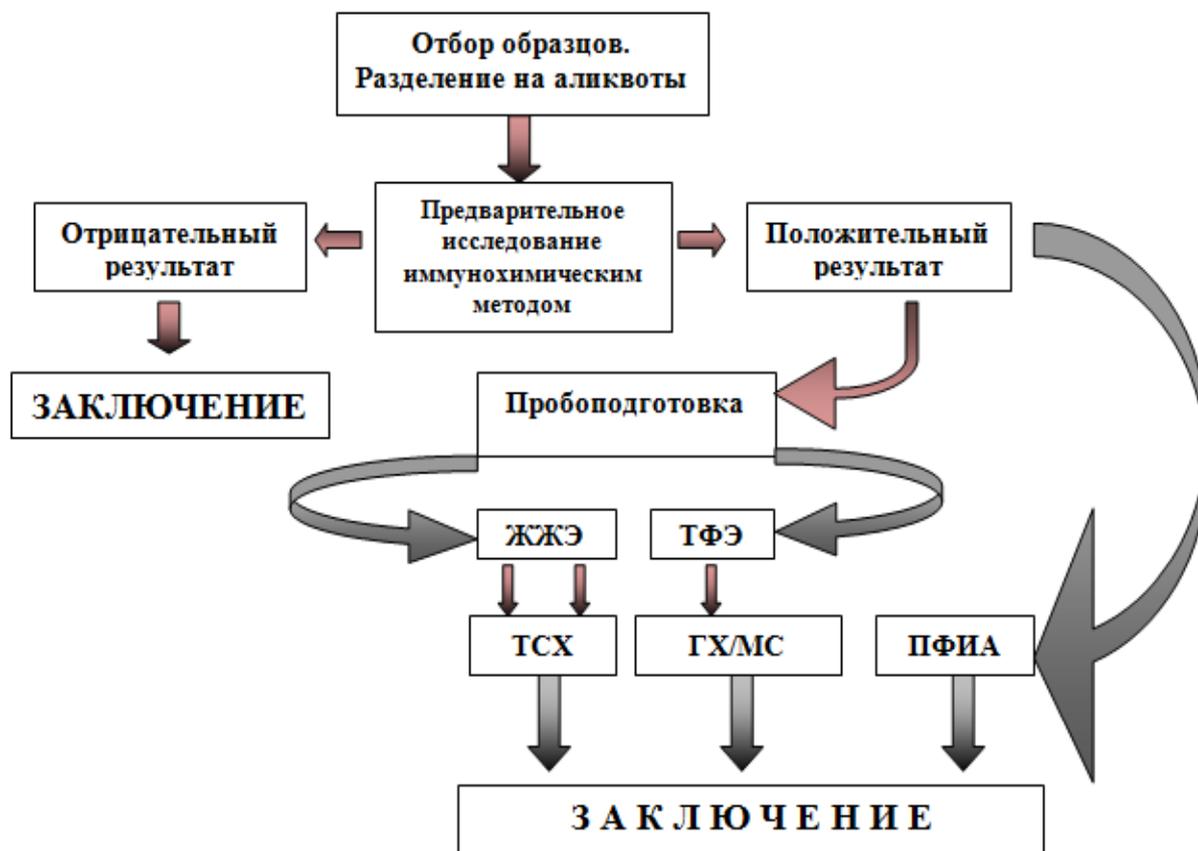


Рисунок 20. Последовательность этапов лабораторно-диагностического исследования метадона в биологических жидкостях  
(Инструкция по применению № 104-0910 «Методика идентификации и количественного определения метадона в биологических жидкостях»)

Показатели диагностической надежности методов выявления метадона в моче составляют величины, представленные в таблице 10.

Таблица 10. Показатели диагностической надежности методов ХТА

Методы ХТА	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %	ПЦ+, %	ПЦ-, %
ИХ	97,4	94	95,6	93,8	97,5
ПФИА	98,7	97,5	98,1	97,5	98,8
ТСХ	100	100	100	100	100
ГХ/МС	100	100	100	100	100

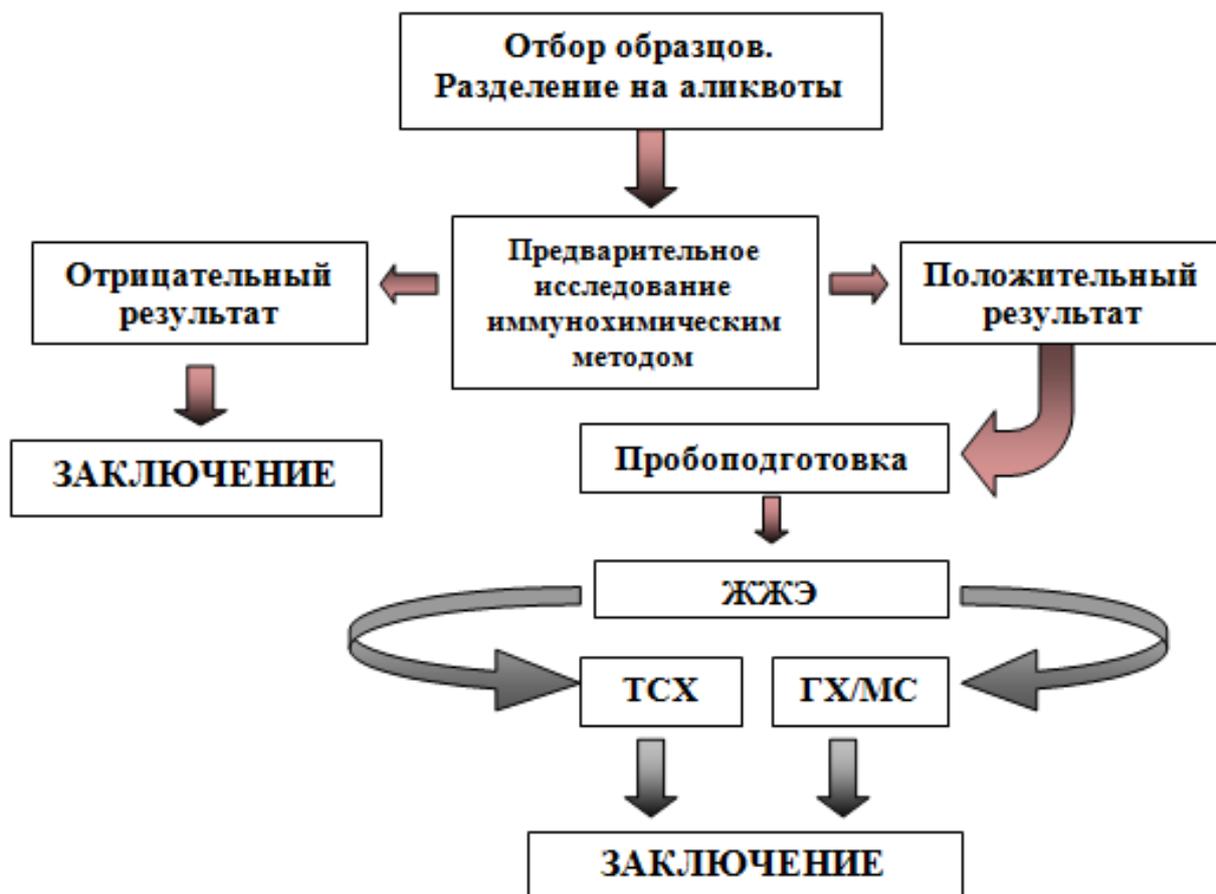


Рисунок 21. Алгоритм лабораторно-диагностического исследования биологических жидкостей для выявления трамадола (Инструкция по применению № 049-0511 «Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных немедицинским употреблением трамадола»)

Оценка показателей надежности аналитических методов, предлагаемых для идентификации трамадола, приведена в таблице 11.

Таблица 11. Показатели диагностической надежности методов ХТА

Методы ХТА	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %	ПЦ+, %	ПЦ-, %
ИХ	98	97	98	97	98
ТСХ	95	96	96	95	95
ГХ/МС	100	98	99	98	100

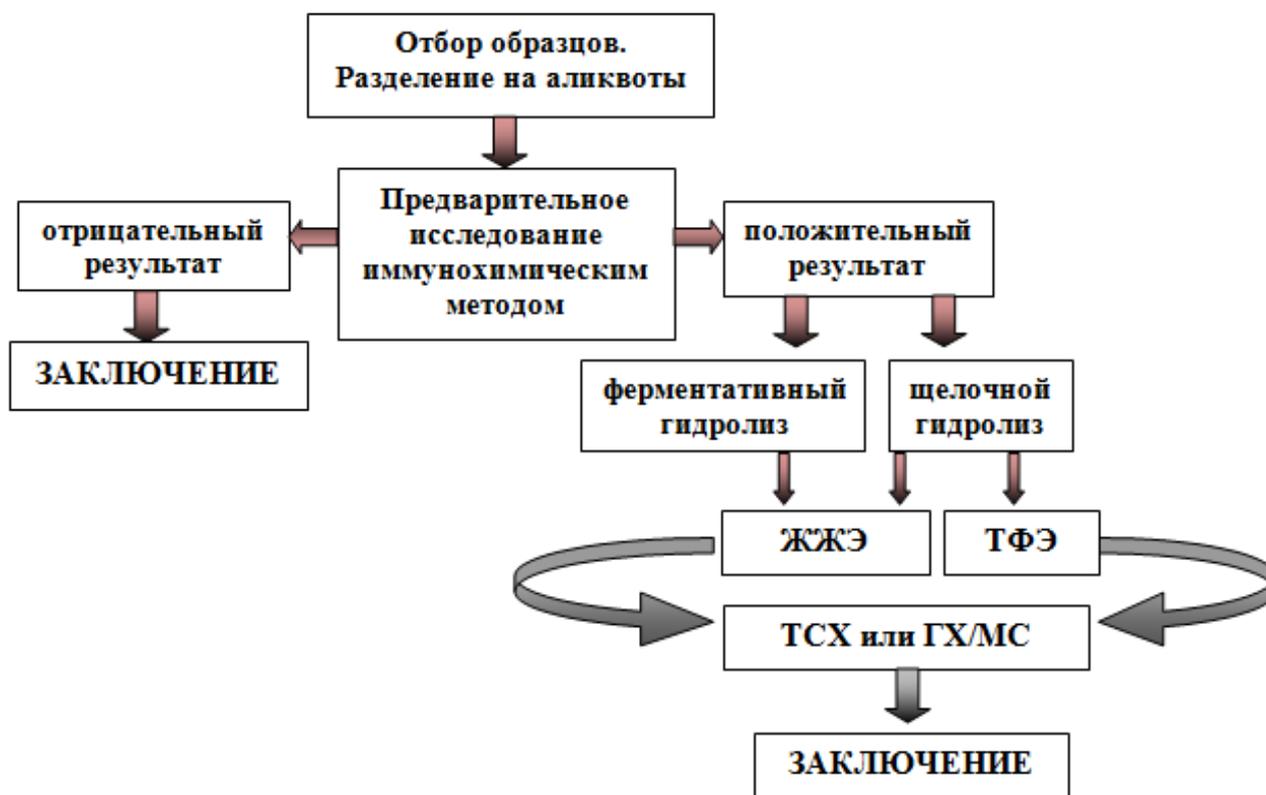
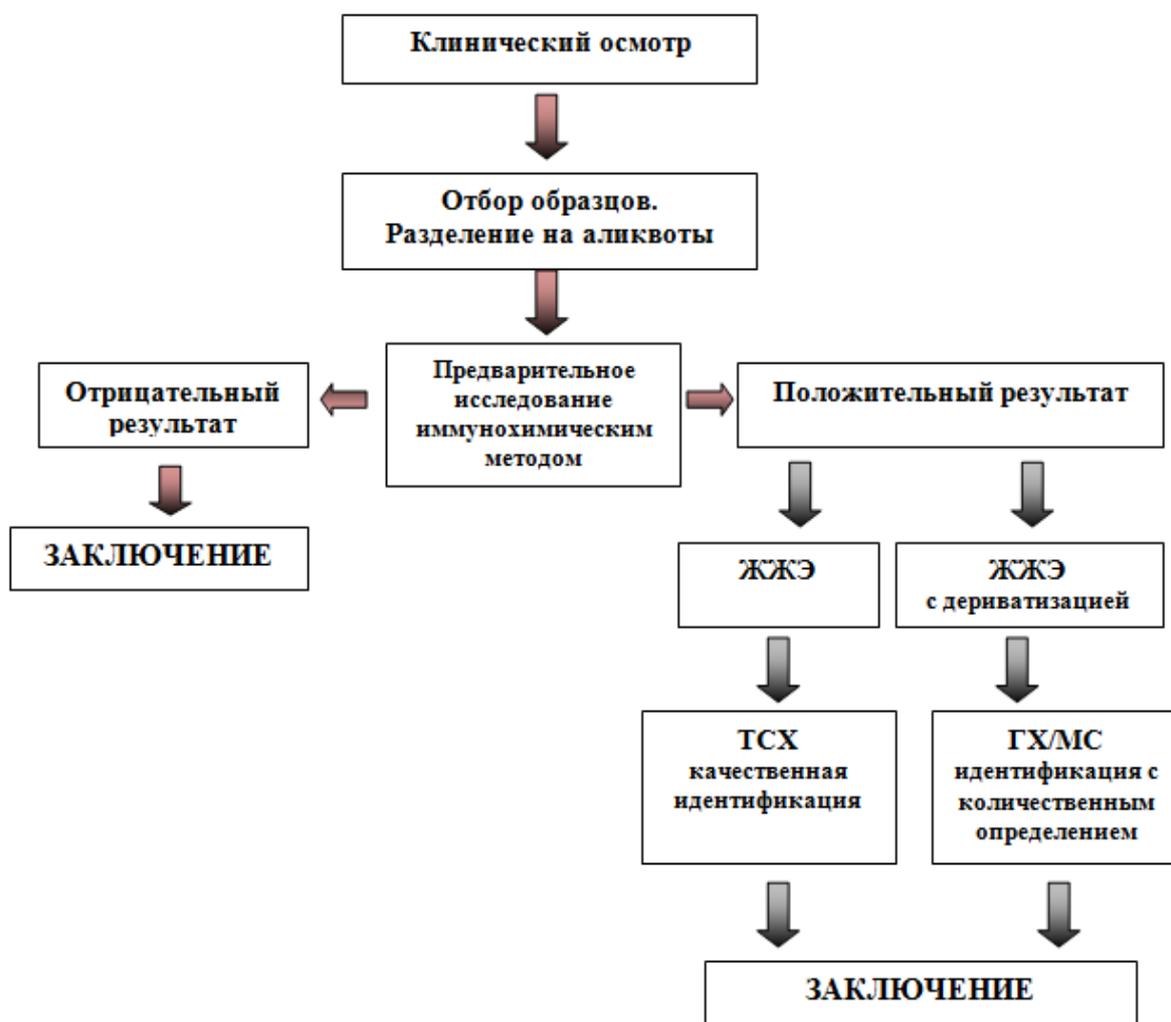


Рисунок 22. Последовательность этапов клинико-лабораторной диагностики употребления каннабиноидов (Инструкция по применению № 065-0512 «Клиническая и лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных каннабиноидами»)

О высокой диагностической надежности лабораторного исследования свидетельствуют показатели, представленные в таблице 12.

Таблица 12. Показатели диагностической надежности методов ХТИ

Методы ХТА	ДЧ, %	ДС, %	ДЭ, %	ПЦ+, %	ПЦ-, %
ИХ	98	93	96	94	98
ТСХ	100	100	100	100	100
ГХ/МС	100	100	100	100	100



*Рисунок 23. Последовательность этапов лабораторной диагностики выявления фенобарбитала в биологических жидкостях  
(Инструкция по применению № 077-0713 «Метод лабораторной диагностики состояний интоксикации, вызванных потреблением фенобарбитала»)*

Все представленные в Инструкциях методы, соответствующие европейскому и мировому уровню исследований, прошли апробацию в ведущих специализированных учреждениях нашей страны

Использование описанных в Инструкциях по применению методик служит основой для дальнейшего осуществления унификации соответствующих методов лабораторного исследования.

## Список литературы:

1. Веселовская, Н.В. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм: учеб. пособие / Н.В. Веселовская [и др.] – М.: Нарконет, 2008. – 264 с.
2. Головкин, А.И. Современная классификация психоактивных веществ / А.И. Головкин // Наркология. – 2007. – т. 8.
3. Еремин, С.К. Анализ наркотических средств / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
4. Иванов, В.В. Курительные смеси – новая проблема отечественной психиатрии / В.В. Иванов, А.А. Синевич, А.В. Сташкевич // Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. – 2013. – №2 (12). – С. 89-95.
5. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2 т. / Пер. с англ. / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981 – Т. 1. – 612 с.
6. Крамаренко, В.Ф. Химико-токсикологический анализ: практикум / В.Ф. Крамаренко. – Киев: Вища шк., 1982. – 272 с.
7. Лебедев, А.Т. Масс-спектрометрия в токсикологических исследованиях / А.Т. Лебедев // Токсикол. вестн. – 2010. – № 4. – С. 2–12.
8. Микеш, О. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам / О. Микеш [и др.] – М.: Мир, 1982. – 781 с.
9. Митрука, Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине / Б.М. Митрука. – М.: Медицина, 1978. – 600 с.
10. Острые отравления новыми синтетическими наркотиками психостимулирующего действия: информ. письмо / К.М. Брусин [и др.] – Екатеринбург, 2011. – 18 с.
11. Отравления наркотическими средствами, действующими на опиоидные рецепторы. Клиническая и лабораторная диагностика: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников [и др.]; под ред. В.С. Камышникова. – Минск : Адукацыя і выхаванне, 2010. – 72 с.
12. Рожанцев, В.В. Феномен Spice / В.В. Рожанцев // Наркология. – 2010. – №3. – С. 80-84.
13. Софронов, Г. Синтетические каннабиноиды, состояние проблемы / Г. Софронов [и др.] // Наркология. – 2012. – Т.11. – №10(130). – С. 97-110.
14. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. – М.: Химия, 1986. – 213 с.
15. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учеб. пособие для вузов / Е.Ю. Афанасьева [и др.]; под ред. Н.И. Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.
16. Турцевич, А.М. Обоснование необходимости клинико-лабораторной диагностики наркотического опьянения, вызванного каннабисом: этапы исследования / А.М. Турцевич [и др.] // Весці НАН Беларусі. – 2012. – №2. – С. 117-123.
17. Химико-аналитическое определение наркотических и допинговых средств: учеб. пособие / Б.А. Руденко [и др.]. – М.: Нарконет, 2007. – 368 с.

18. Шилейко, И.Д. Новое поколение наркотиков: состояние проблемы / И.Д. Шилейко, О.Р. Айзберг, А.Т. Кузьменко // *Лечебное дело*. – 2015 г. – № 2 (42). – С. 27-30.
19. Экспертное исследование производных амфетамина: метод. реком./ Алексеев И.Г. [и др.] – М.: ЭКЦ МВД России, 1997. – 47 с.
20. A survey study to characterize use of Spice products (synthetic cannabinoids) / R. Vandrey, K.E. Dunn, J.A. Fry, E.R. Girling // *Drug Alcohol Depend.* – 2012. – Vol. 120, № 1–3. – P. 238–241.
21. Bird, I. M. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications / I. M. Bird // *BMJ*. – 1989. – Vol. 299. – P. 783–787.
22. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities / D.R. Compton, K.C. Rice, B.R. De Costa et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1993. – Vol. 265, № 1. – P. 218–226.
23. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review / T.H. Moore, S. Zammit, A. Lingford-Hughes et al. // *Lancet*. – 2007. – Vol. 370, № 9584. – P. 319–328.
24. David, F. Stir bar sorptive extraction for trace analysis / F. David, P. Sandra // *J. Chromatogr. A* – 2007. – Vol. 1152, № 1. – P. 54–69.
25. Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction / C. Bicchi [et al.] // *J. Chromatogr. A* – 2005. – Vol. 1094, № 1. – P. 9–16.
26. Evaluation of the usefulness of extrelut (R) columns obtained from MERCK for isolation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) in the water phase / J. Jablonski [et al.] // *Med Pr.* – 1996. – Vol. 47, № 2. – P. 169–173.
27. Humbert, L. Extraction en phase solide (SPE): theorie et applications / L. Humbert // *Ann. Toxicol. Anal.* – 2010. – Vol. 22, № 2. – P. 61–68.
28. Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review / Cristina I.C. Silvestrea [et al.] // *Anal. Chimica A.* – 2009. – Vol. 652, № 1. – P. 54–65.
29. Liquid-phase microextraction of basic drugs – selection of extraction mode based on computer calculated solubility data / S. Pedersen-Bjergaard [et al.] // *J. of Separation Science* – 2005. – Vol. 28, № 11. – P. 1195–1203.
30. Pacher, P. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy / P. Pacher, S. Batkai, G. Kunos // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – Vol. 58(3). – P.389-462.
31. Pflieger, K. Mass Spectral and GC Data: in 4 pt. / K. Pflieger, H.H. Maurer, A. Weber. – Weinheim: WILEY-VCH, 2004 – Pt. 4. – 3022 p.
32. Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC–MS for profiling and target component analysis of pharmaceutical drugs in urine / B. Tienpont [et al.] // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* – 2003. – Vol. 32, № 4. – P. 569–579.
33. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs / L.S. Melvin, G.M. Milne, M.R. Johnson et al. // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 44, № 5. – P. 1008–1015.

Учебное издание

**Камышников** Владимир Семенович  
**Шилейко** Ирина Дмитриевна  
**Кузьменко** Андрей Тимофеевич  
**Статкевич** Дмитрий Александрович  
**Чубуков** Александр Михайлович

**Технологии химико-токсикологического анализа  
и их использование в практике диагностики состояний,  
вызванных употреблением наркотических средств**

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск В.С. Камышников

Подписано в печать 22. 09. 2015. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 8,69. Уч.- изд. л. 6,36. Тираж 100 экз. Заказ 274.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.