

**СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ЖИДКОСТЬ-ЖИДКОСТНОЙ
И ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ИЗОЛИРОВАНИИ
ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Вергун О.М.

Вергун О.М.

*Кандидат биологических наук, доцент
Доцент кафедры фармацевтической химии
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минска, Беларусь
Государственный комитет судебных экспертиз по г.Минску,
государственный медицинский судебный эксперт-химик,
г. Минск, Беларусь
vom_v@tut.by*

Аннотация: Судебная медицинская химическая экспертиза является важнейшей отраслью судебной экспертизы и требует постоянного обновления и изучения новых данных, относящихся к методам подготовки проб, идентификации и обнаружения тех или иных токсичных веществ.

В судебной химии одним из важнейших этапов проведения исследования является этап изолирования (извлечения) веществ, повлекших отравление или смерть человека, из биологического объекта, либо биологических жидкостей, иными словами — пробоподготовка. Наиболее часто применяемыми и воспроизводимыми методами является жидкость-жидкостная экстракция и более современный метод — твердофазная экстракция. Благодаря данным методам подготовки проб происходит наиболее полное изолирование токсических веществ из объектов биологического характера для эффективного проведения дальнейшего исследования.

Ключевые слова: жидкость-жидкостная экстракция; твердофазная экстракция; изолирование; биологические объекты; газовая хроматография с масс-селективным детектированием.

COMPARISON OF LIQUID-LIQUID AND SOLID-PHASE EXTRACTION METHODS FOR ISOLATION OF TOXIC SUBSTANCES FROM BIOLOGICAL MATERIAL

Viarhun O.M.

*Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus; State Medical Forensic Expert
Chemist, State Committee of Forensic Examinations of Minsk,
Minsk, Belarus
vom_v@tut.by*

Abstract. *Forensic chemical examination is the most important branch of forensic science and requires constant updating and study of new data related to methods of sample preparation, identification and detection of certain substances.*

In forensic chemistry, one of the most important stages of research is the isolation (extraction) of substances from a biological sample or biological fluid—in other words, sample preparation. The most commonly used and reproducible methods are liquid-liquid extraction and the more modern method of solid-phase extraction. These sample preparation methods ensure the most complete isolation of toxic substances from biological samples for effective further analysis.

Key words: *liquid-liquid extraction; solid-phase extraction; isolation; biological objects; gas chromatography with mass-selective detection.*

В химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе метод экстракции является базовым для изолирования токсических веществ из объектов биологического происхождения, а также для очистки вытяжек от примесей, для выделения токсических веществ из предварительно очищенных извлечений.

Экстракция — процесс выделения одного или нескольких токсичных веществ из различных биологических объектов с помощью растворителя, называемого экстрагентом. Объекты, из которых извлекают токсические соединения, могут быть твердыми субстанциями (например органы трупа) или жидкостями. Поэтому процессы извлечения подразделяют на экстракцию в системе: жидкость – жидкость и (или) твердое тело – жидкость.

Процесс экстракции целевых компонентов является многостадийным. Основными стадиями этого процесса могут быть: проникновение экстрагента в объекты, в которых находится исследуемое токсическое вещество; растворение целевого компонента в экстрагенте или взаимодействие целевого компонента с экстрагентом; далее очистка или освобождение от соэкстрактивных веществ; концентрирование экстракта. Каким бы не было высокотехнологичное оборудование для обнаружения и идентификации токсического вещества, если нарушен процесс пробоподготовки (извлечения) токсикант(ты) так и останутся в объекте, соответственно исследование будет осуществлено в пустую и результат окажется ложноотрицательным. Степень изолирования исследуемых веществ из биологического материала является важным элементом и зависит от многих

факторов: физико-химических свойств самого токсиканта; от растворимости извлекаемых веществ в экстрагенте, при этом необходим подбор растворителя либо системы растворителей; структуры (пористости) биологического материала; проникающей способности экстрагентов в клетки и ткани биологического материала; степени его измельчения, интенсивности перемешивания смеси измельченного биологического материала и экстрагента; кратности настаивания биологического материала с экстрагентом, температуры и рН среды и многих других факторов [1].

Целью данного исследования явилось проведение сравнительных исследований по изолированию веществ разных фармацевтических групп из крови различными способами и выявить более эффективный метод подготовки проб.

Материалы и методы. Материалом явились биологический материал (трупная кровь). Методами: жидкость-жидкостная экстракция с использованием различных систем экстрагентов и твердофазная экстракция с использованием картриджей для твердофазной экстракции (Bond Elut Certify 300 mg/6 ml, Agilent Technologies, Part No: 12102082 (США)).

Исследования подготовленных образцов проводились с помощью метода газовой хроматографии — масс-спектрометрии (далее ГХ-МС). Условия хроматографирования: газовый хроматограф Agilent 8890; колонка капиллярная: HP-5MS UI, 30м x 0,25мм, $\Delta F=0,25$ мкм; газ-носитель — гелий скорость потока 1,5 мл/мин; температура колонки: 90 °С, 1,3 мин, 11 град/мин, 315 °С, 8,0 мин; температура инжектора — 280 °С; режим инжектора при вводе пробы — Splitless; детектор масс-селективный — моноквадруполь: MSD 5977B; интервал сканируемых масс: 40-570 m/z; температуры детектора: MS Source — 230 °С, MS Quad — 150 °С; настройки умножителя и источника ионов: Gain — 1 °С. Программное обеспечение MassHunter Workstation GC/MS Vers. 10.1.49.

Идентификацию веществ проводили по характерным масс-спектрам и индексам удерживания (RI) по базам данных библиотек NIST v3.0, DRUGS_SP1, MPW2011. С учетом относительной интенсивности сигналов зарегистрированных ионов принадлежность полученных масс-спектров обнаруженных веществ подтверждали наличием в них соответствующих молекулярных и характеристичных ионов, образующихся в соответствии с основными направлениями фрагментации молекул в процессе электронной ионизации.

По литературным данным, экстрагируемость химических соединений зависит от растворимости их в воде и в несмешивающихся с водой органических растворителях, применяемых для экстракции. В зависимости от состава и свойств экстрагентов экстракционные системы делятся на две группы. К первой группе относятся экстракционные системы с «физическим» распределением компонентов. В этих системах отсутствует химическое взаимодействие между экстрагентом и экстрагируемыми веществами. Различная растворимость некоторых веществ, а, следовательно, и неодинаковая экстрагируемость их объясняются физическими свойствами этих веществ и экстрагентов. Ко второй группе относятся экстракционные системы, в которых экстракция

осуществляется за счет химического взаимодействия извлекаемых веществ с экстрагентами. Эффективность разделения веществ в таких системах зависит от прочности образующихся соединений или комплексов. Эти экстракционные системы используются для извлечения неорганических веществ. Экстракция с помощью экстрагентов, взаимодействующих с экстрагируемыми веществами, является более сложным процессом, чем экстракция, основанная на физическом распределении. При использовании экстрагентов, взаимодействующих с экстрагируемыми веществами, процессы экстракции могут осложняться побочными реакциями. В ряде случаев одновременно может происходить экстракция нескольких различных соединений [1].

Метод твердофазной экстракции базируется на специфических взаимодействиях выделяемых компонентов с сорбентом (ионообменником) при пропускании раствора через патрон со сравнительно малым количеством твердой фазы, что в свою очередь влечет меньший расход растворителя для последующей десорбции сконцентрированных соединений и устраняет необходимость упаривания.

ТФЭ имеет много общего с хроматографией. Для концентрирования и извлечения неполярных соединений наиболее удобен метод обращенно-фазовой экстракции, когда сорбент имеет меньшую полярность, чем анализируемый раствор [2].

Ход работы. Сравнение методик изолирования наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ из биологических жидкостей (в частности трупной крови) проводится на основе экспериментальных данных, полученных в результате проведения изолирования методом ЖЖЭ и ТФЭ с последующей оценкой полученных результатов путем получения спектров газовой хроматографией с масс-селективным детектированием.

Для проведения эксперимента подготавливали образцы биологических жидкостей (кровь) с известным количеством изолируемых веществ. Концентрации, затравленные в биологические жидкости, соответствуют токсическим концентрациям веществ в крови согласно литературным данным [3]. Расчет производился на 7,0 мл биологической жидкости.

Для расчета и контроля во все экспериментальные образцы вводили внутренний стандарт (ВС). Для веществ кислого характера ВС — гексенал (100 мкг/мл л — 50 мкл на 1 мл биологической жидкости), для веществ основного характера ВС — этилморфин (100 мкг/мл — 50 мкл на 1мл биологической жидкости). В таблице 1 представлены численные характеристики изолируемых веществ.

Характеристики изолируемых веществ

| Изолируемое вещество | Токсическая концентрация в крови, мкг/мл | Концентрация раствора изолируемого вещества, мкг/мл | Объем, затравленный в 7 мл биожидкости, мкл |
|---------------------------|--|---|---|
| d,l-амфетамин гидрохлорид | 0,2 | 1 | 1400 |
| d,l-МДМА гидрохлорид | 0,5 | 100 | 35 |
| d,l-метадон гидрохлорид | 0,2 | 100 | 14 |
| α -PVP | 10 | 100 | 700 |
| Амитриптилина гидрохлорид | 0,5 | 30 | 120 |
| Доксиламин сукцинат | 1 | 100 | 70 |
| Карбамазепин | 10 | 80 | 875 |
| Лидокаина гидрохлорида | 6 | 50 | 840 |
| Натрий этаминал | 10 | 100 | 700 |
| Прегабалин | 2400 | 150 | 112000 |
| Прокаин | 20 | 500 | 280 |
| Промедол | 0,2 | 100 | 14 |
| Тиопентал | 5 | 100 | 350 |
| Трамадол | 1 | 100 | 70 |
| Фенобарбитал | 30 | 100 | 2100 |

Методика проведения жидкость-жидкостной экстракции

Экстракция веществ кислого и нейтрального характера проводилась следующим образом: к 1 мл биологической жидкости (крови) прибавляли 2,0 мл 0,3 М фосфатного буфера с рН 2,5 для создания кислой среды. Перемешивали и проводили экстракцию 3,0 мл хлороформа в течение 10 минут. Смесь центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Органический слой переносили в другой флакон и выпаривали досуха в токе теплого воздуха, избегая перегрева остатка. К остатку во флаконе добавляли 0,4 мл ацетонитрила и 3,0 мл гексана. Флакон закрывали, сильно встряхивали 30 секунд, центрифугировали при 5000 об/мин 10 минут. Слой гексана отбрасывали. Ацетонитрильный раствор переносили в емкость для дериватизации и выпаривали досуха в токе теплого воздуха, избегая перегрева остатка. **Метилирование:** к сухому остатку прибавляли 25 мг безводного карбоната калия, 500 мкл безводного ацетона и 40 мкл йодметана, герметично закрывали и термостатировали при 60 °С в течение 60 минут. После охлаждения емкость открывали, всю жидкость (без соли) переносили в виалу емкостью 2,0 мл и выпаривали досуха. Далее для получения пригодных для инструментальной оценки полученных растворов сухой остаток реконструировали — в виалу добавлением 100 мкл этилацетата, тщательно перемешивали — (раствор № 1). Далее раствор № 1 исследовали методом ГХ-МС.

Экстракция веществ щелочного характера: к 1,0 мл биологической жидкости (объекта) прибавляли 2,0 мл насыщенного боратного буфера (для создания рН около 12). Перемешивали и проводили экстракцию 8,0 мл 1-хлорбутана в течение 10 минут. Смесь центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Для реэкстракции органический слой переносили в другой флакон,

добавляли 3,0 мл 0,1 М раствора серной кислоты, встряхивали 5 минут, центрифугировали при 4000-5000 об/мин 5 минут. Водный слой отбирали в третий флакон, прибавляли 0,3 мл 2 М раствора гидроксида натрия (устанавливая рН раствора в интервале 10-11), добавляли 3,0 мл 1-хлорбутана, встряхивали 10 минут и далее смесь центрифугировали при 4000-5000 об/мин 10 минут. Органическое извлечение переносили в выпарительную емкость, добавляли 100 мкл 10 г/дм³ раствора уксусной кислоты в этаноле и выпаривали досуха. Полученный сухой остаток реконструировали — добавлением 100 мкл этилацетата, тщательно перемешивали — (раствор № 2). Далее раствор № 2 исследовали методом ГХ-МС. *Дериватизация:* раствор № 2 (после инструментального исследования) выпаривали досуха, к остатку добавляли 100 мкл трифторуксусного ангидрида и герметично закрывали. Емкость выдерживали 30 минут при 60 °С. После нагрева емкость охлаждали до комнатной температуры, затем содержимое испаряли в токе воздуха при комнатной температуре до сухого остатка. Сухой остаток реконструировали в 100 мкл этилацетата, тщательно перемешивали — (раствор № 2/1). Далее раствор № 2/1 исследовали методом ГХ-МС.

Методика проведения твердофазной экстракции. Выделение веществ приведенных в таблице 2 из исследуемых образцов проводили следующим образом: к 1,0 мл подготовленного образца во флаконе прибавляли 4 мл 1/15 М фосфатного буфера рН 4,8. Флакон плотно закупоривали, помещали в ультразвуковую баню на 5 минут. Далее содержимое флакона центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут (5000 об/мин — 5 мин). 4 мл центрифугата отделяли от осадка и проводили твердофазную экстракцию, по схеме:

Кондиционирование сорбента: последовательно пропускали через картридж 3,0 мл 95 % этанола и 3,0 мл 1/15 М фосфатного буфера рН 4,8.

Загрузка анализируемого объекта: 4,0 мл подготовленного, как описано выше, образца крови (плазмы, сыворотки) загружали в картридж и пропускали через него со скоростью 1 мл/мин.

Промывка: через сорбент последовательно пропускали 1,5 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 4,8 и 1,5 мл 10 % этанола со скоростью 3-4 мл/мин [2].

Сушка сорбента: сушку проводили под вакуумом в течение 20 минут.

Элюирование веществ кислого и нейтрального характера (элюат I): элюат I получали двукратным пропусканием через картридж смеси н-гексан-этилацетат (2:1) по 3,0 мл со скоростью 1 мл/мин.

Элюирование веществ щелочного характера (элюат II): элюат II получали двукратным пропусканием через картридж смеси: дихлорметан - изопропанол — гидроксид аммония 250 г/л (2:1:0,1) по 3,0 мл со скоростью 1 мл/мин.

Элюат I испаряли в токе воздуха при комнатной температуре в емкости для дериватизации. *Метилирование* проводили как описано выше при описании жидкость-жидкостной экстракции. Полученный сухой остаток реконструировали 100 мкл этилацетата, тщательно перемешивали (раствор № 3). Далее раствор № 3

исследовали методом ГХ-МС. К элюату II в выпарительной емкости добавляли 100 мкл 10 г/дм³ раствора уксусной кислоты в этаноле и выпаривали досуха. Полученный сухой остаток реконструировали 100 мкл этилацетата, тщательно перемешивали — раствор № 4). Далее раствор № 4 исследовали методом ГХ-МС. *Дериватизация* проводилась, как описано выше, с получением раствора № 4/1, который тоже исследовали методом ГХ-МС [2].

Обсуждение результатов. После проведения инструментального исследования полученных извлечений из подготовленных объектов методом ГХ-МС были рассчитаны приведенные площади для каждого вещества. Под приведенной площадью подразумевается отношение площади пика внутреннего стандарта (ВС) к площади пика искомого вещества. В таблице 2 представлены опытные данные. При отсутствии данных о веществе на хроматограмме в таблице указывался знак «-».

Таблица 2

Результаты ГХМС исследования биологических жидкостей

| Вещество | Изолирование из крови, приведенная площадь | |
|-----------------------------|--|--------|
| | ТФЭ | ЖЖЭ |
| Амфетамин-ТФА | – | 0,0712 |
| MDMA-ТФА | 0,3432 | 0,2415 |
| Метадон | 0,1195 | – |
| α-PVP | 1,285 | 9,080 |
| Амитриптилин | 0,8186 | 0,3735 |
| Доксиламин | 50,00 | 9,069 |
| Карбамазепин | 3,471 | 0,953 |
| Лидокаин | 0,7668 | 2,334 |
| Натрий этаминал | 1,190 | 0,6254 |
| Прегабалин-Н ₂ О | 1,087 | 0,0651 |
| Прокаин-ТФА | 4,926 | – |
| Промедол | 0,0953 | 0,1894 |
| Тиопентал | 0,1946 | 0,1169 |
| Грамадол | 5,127 | 2,128 |
| Фенобарбитал | 25,78 | 3,942 |

Выводы. На основании опытных данных можно сделать вывод, что методы твердофазной экстракции и метод жидкость-жидкостной экстракции дают достаточно воспроизводимые результаты, нельзя однозначно определить, какой метод дает лучшие результаты, так как для каждой группы веществ и каждого вещества отдельно существуют свои условия для наилучшего изолирования из биологических жидкостей, поэтому выбор метода производится экспертом в индивидуальном порядке, учитывая все свойства выделяемого вещества.

1. Метод твердофазной экстракции в большинстве случаев дает большую эффективность извлечения по сравнению с жидкость-жидкостной экстракцией.

2. Процесс проведения твердофазной экстракции более автоматизирован, затрачивает меньшее количество растворителей, меньше зависит от изменений рН среды и процесс является более экологически чистым.

3. Процесс жидкость-жидкостной экстракции является более рентабельным, простым в исполнении и позволяет извлечь максимальное количество токсикантов и их метаболитов в относительно чистом виде.

4. Несмотря на преимущества твердофазной экстракции, этот метод является более дорогим, существует ограниченная емкость загрузки объектов и существует проблема ввиду разницы между партиями материала для проведения изолирования, что влияет на выход аналита. В свою очередь метод жидкость-жидкостной экстракции длителен, трудоемок и имеет низкий выход при работе с очень полярными аналитами.

Список литературы

1. Карпов, Ю. А., Савостин, А.П. Методы пробоподготовки и пробоотбора. – М. : Бином; Лаборатория знаний, 2003. – 243 с.
2. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах. – М. : Издательство «Перо», 2016. – 326 с.
3. Winek's Drugs and Chemical blood-level data 2001.