РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»

"Қазақстан Республикасы Әділет Министірлігінің
Сот сараптамалары орталығы"
БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 3
«6» қаңтар 2026 ж. хаттамасы
реттік нөмері № 27.1 (3)

МЕТОДИКА

ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЯДОВИТЫХ И СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ, ИЗОЛИРУЕМЫХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПОДКИСЛЕННЫМ СПИРТОМ И ПОДКИСЛЕННОЙ ВОДОЙ

(шифры специальностей – 27.1)

Астана, 2026 г.

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования по определению ядовитых и сильнодействующих веществ, изолируемых из биологического материала подкисленным спиртом и подкисленной водой
2. Шифр специальности методики	27.1(3)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»
4. Сущность методики	Изолирование искомых веществ в условиях области значений pH, находящихся в области максимума экстракции, пользуясь органическими растворителями, обеспечивающими извлечение максимальных количеств этих веществ. Для обнаружения искомых веществ применяют реакции осаждения, цветные реакции, физические, физико-химические методы анализа. При проведении химико-токсикологического анализа эксперт может использовать любые из описанных методик исследования в зависимости от наименований представленных образцов их количества, с учётом фазы распределения искомого вещества
4.1. Объекты исследования	Биологические жидкости и ткани, жидкости не биологического происхождения
4.2. Методы исследования	Химические методы (цветные, осадительные, микрокристаллические реакции), хроматографические, спектральные методы анализа
4.3. Краткое поэтапное описание методики	1. Предварительные пробы; 2. Методы выделения токсических веществ, основанные на изолировании их подкисленным спиртом; 3. Метод выделения алкалоидов и других токсических веществ из биологического материала, основанный на изолировании их водой;

	4. Схема анализа лекарственных и наркотических соединений, подлежащих обязательному химико-токсикологическому исследованию; 5. Обнаружение веществ, экстрагируемых органическими растворителями из кислых вытяжек; 6. Обнаружение веществ, экстрагируемых органическими растворителями из щелочных вытяжек
5. Дата утверждения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол № 3 от 06.10.2026г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……...5
1. Область применения……6
2. Термины и обозначения……...7
3. Исследовательская часть……9
Заключение……70
Список использованных источников…….....71

ВВЕДЕНИЕ

Полярными растворителями изолируют органические вещества разной химической природы: кислоты и их производные, алкалоиды и синтетические лекарственные вещества основного и слабоосновного характера. Номенклатура этих веществ постоянно расширяется в связи с синтезом новых активных веществ.

В данном материале рассматриваются метаболизм, основные методы изолирования, способы очистки, методы обнаружения и количественного определения некоторых целевых веществ. Излагается схема идентификации соединений кислотного, слабоосновного и основного характера с применением ТСХ- скрининга других методик исследования.

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Объекты исследования: Биологические жидкости и ткани органов человека. Образцы крови от живых лиц исследуются только с использованием высокочувствительных аналитических методов, жидкостной и (или) газовой хромато - масс-спектрометрии.

Учитывая тот факт, что исчерпывающего набора методов и тестов, пригодных для всех токсических веществ данной группы во всех образцах, не существует, перечень искомых веществ данной группы зависит от поставленных на разрешение химико-токсикологической экспертизы (исследования) вопросов, состояния и перечня представленных образцов, их количества, обстоятельств дела.

1.1 При направлении биологического материала на наркотические и (или) психотропные вещества химико-токсикологическая экспертиза (исследование) в обязательном порядке проводится на следующие вещества:

1.1.1 Алкалоиды опия, 6- моноацетилморфин, трамадол, промедол, метадон, меперидин, пропоксифен, фентанил, кокаин, эфедрон, тетрагидроканнабинол, амфетамин, метилендиоксиамфетамин, лизергиновую кислоту, *производные фенациламина:* мефедрон *(4-метилметкатинон)* и α-PVP (*1-фенил-2-(1-пирролидинил) пентан-1-он, áльфа-пирролидинопентиофенóн или áльфа-пирролидиновалерофенóн)*.

1.1.2 Из перечня лекарственных веществ:

Снотворные средства: фенобарбитал, барбамил, барбитал, циклобарбитал, этаминал-натрий, секобарбитал, бутобарбитал, апробарбитал, доксиламин, зопиклон, триазолам, темазепам.

Средства для наркоза: тиопентал

Противосудорожные средства: карбамазепин, вальпроевая кислота

Антидепрессанты: имипрамин (имизин), амитриптилин, амоксапин, циталопрам, мапротилин, тразодон, кломипрамин, дезипрамин, доксепин, пароксетин, флуоксетин, венлафаксин

Транквилизаторы (производные бензодиазепина): диазепам, хлордиазепоксид, феназепам, оксазепам, нитразепам, лоразепам, клоназепам, медазепам

Нейролептики: хлорпромазин (аминазин), левомепромазин (тизерцин), тиоридазин (сонапакс), тиопроперазин (мажептил), трифлуоперазин (трифтазин), перициазин (неулептил), клозапин (азалептин), кветнапин, оланзапин, галоперидол, дроперидол, локсапин, хлорпротиксен.

Лекарственные вещества, действующие преимущественно на периферические нейромедиаторные процессы: димедрол, тропикамид.

1.1.3 В лабораториях оснащенных соответствующим аналитическим оборудованием для проведения методов жидкостной и (или) газовой хромато - масс-спектрометрии, при постановке вопроса на определение наркотических, психотропных веществ, их аналогов в перечень целевых соединений дополнительно включаются: синтетические каннабимиметики (включая галогенпроизводные), катиноны, и их метаболиты; производные пирролидина -метилендиоксипировалерон (MDPV), метилендиоксипировалерон

(MDPB); синтетические каннабиноиды – дибензопираны HU-210, циклогексилфенолы (CP 47,497 и его гомологами), нафтоилиндолы (JWH-018, JWH-073, JWH-398), фенилацетилиндолы (JWH-250), олеамид; лекарственные вещества: кетамин, сертралин, прегабалин.

1.2 При направлении биологического материала на лекарственные вещества химико-токсикологическая экспертиза (исследование) проводится на вещества п.п.2.1.2, а также на производные салициловой кислоты, производные пиразолона, производные имидазола, производные изохинолина, производные пурина, анаприлин.

1.3 При направлении биологического материала на неизвестное вещество (отравляющие вещества) химико-токсикологическое исследование в обязательном порядке проводятся на все вышеуказанные вещества.

1.4 Химико-токсикологическое исследование может быть расширено на другие вещества в зависимости от клинической, секционной картины, обстоятельств дела, данных, полученных с места происшествия, особенностей течения химических реакций.

1.5 Методы исследования используются в зависимости от вида представленных образцов их количества, состояния, а при наличии соответствующих данных (обстоятельств дела и т.п.) с учётом метаболизма, особенностей распределения и элиминации целевых веществ.

Виды и количество описанных в данной методике методов должны быть использованы с учётом их структурной информативности и соответствующей чувствительности, необходимых для решения поставленных вопросов и цели исследования.

Для решения экспертных задач по данной группе токсических веществ могут быть использованы специальные экспертные методики, специализированные руководства*, рекомендованные для специалистов, занимающихся анализом и идентификацией наркотиков, с основным акцентом на судебную экспертизу, фармацевтический анализ и токсикологию**, рекомендации управления Организации Объединенных Наций (ООН) по наркотикам и преступности (UNODC) *** *(*«CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS» in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material, London, «THE PHARMACEUTICAL PRESS», 1986.*

***«CLARKE'S ANALYSIS OF DRUGS AND POISONS» in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material, London, Chicago, «THE PHARMACEUTICAL PRESS», 2011.*

**** «Laboratory and scientific Section UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME» MANUAL FOR USE BY NATIONAL DRUG ANALYSIS LABORATORIES, UNITED NATIONS.)*

2. ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Экстракция – процесс извлечения растворителями соответствующих веществ из различных объектов. Объекты, из которых извлекают соответствующие соединения, могут быть твердыми веществами или жидкостями. Поэтому процессы изолирования подразделяют на экстракцию в

системе твердое тело – жидкость (твердожидкостная экстракция) и на экстракцию в системе жидкость-жидкость (жидкостная экстракция).

Экстрагент – органический растворитель, в индивидуальном состоянии или содержащий какие-либо реагенты, извлекающий (экстрагирующий) данное вещество из водной фазы.

В химико-токсикологическом анализе метод твердофазной экстракции применяется для изолирования исследуемых веществ из органов трупов, растений, почвы и других объектов. При экстракции веществ в системе твердое тело–жидкость в качестве экстрагентов применяют органические растворители. Для данной системы в ряде случаев используют выщелачивание.

Выщелачивание – извлечение компонентов из твердых тел с помощью воды.

Жидкостная экстракция – процесс распределения растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, одной из которых в большинстве случаев является вода, а второй – несмешивающийся с водой органический растворитель.

Экстракционный реагент – составная часть экстрагента, взаимодействующая с извлекаемым веществом с образованием экстрагирующегося соединения.

Экстракт – отделенная жидкая органическая фаза, содержащая экстрагированное из водной фазы вещество.

Реэкстракция – процесс обратного извлечения вещества из экстракта в водную фазу.

Реэкстрагент – раствор реагента, используемый для извлечения вещества из экстракта.

Реэкстракт- отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

Разбавитель – относительно инертный органический растворитель, прибавляемый к экстрагенту для улучшения его физических или экстракционных свойств.

Промывка – процесс частичного или полного удаления примесей из экстракта или реэкстракта.

Периодическая экстракция – экстракция вещества из одной и той же фазы, проводимая отдельными порциями экстрагента.

Непрерывная экстракция – экстракция, проводимая при непрерывном перемешивании одной жидкой фазы (другая жидкая фаза остается неподвижной).

Противоточная экстракция – экстракция, осуществляемая при встречном движении обеих фаз.

СКРИНИНГ – это научно обоснованная система поиска неизвестного яда, когда в процессе последовательных операций поэтапно отсеиваются (или определяются) отдельные группы веществ или индивидуальные вещества.

ТСХ- тонкослойная хроматография;

рК- равновесное отношение концентрации элемента в одной фазе к его концентрации в другой фазе, например в системе из двух несмешивающихся жидкостей Р. к. может быть больше или меньше единицы;

D- коэффициент распределения, отношение растворимости вещества в двух фазах;

1,4 –БДП – 1,4 бенздиазепины;

СФ- спектрофотометрия;

ГХ-газовая хроматография;

ГЖХ-газожидкостная хроматография;

ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография;

МС-масс-спектрометрия

ЖЖЭ- жидкость-жидкостная экстракция

ТФЭ-твердофазная экстракция

УФ-ультрафиолетовый спектр

hRf- значение Rf умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель Rf. один из основных показателей в ТСХ - параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения Rf проводят как отношение расстояния, прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя Rf = L/L0. Значение Rf - величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

3. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

3.1 Предварительные пробы.

1.1 Общие указания. Следует сочетать с анализом исследуемого образца:

а) отрицательный контрольный реактив, т.е. соответствующий образец, о котором известно, что он не содержит конкретного соединения (соединений); при анализе мочи должен использоваться контрольный (не содержащий данного соединения) образец мочи либо вода;

б) известный положительный образец соответствующей концентрации. Для анализа следует использовать мочу или воду с добавкой (отрицательный контрольный образец мочи, в который добавлено известное количество данного соединения).

Качественные тесты основаны на простых цветовых реакциях и предназначены для выявления ряда имеющих большое значение лекарственных средств и других ядовитых веществ. Полное описание этих тестов дается в соответствующих разделах вместе с подробной информацией о распространенных источниках помех и данными о пороговой чувствительности тестов. Из числа описанных анализов тест на салицилаты, например, на ацетилсалициловую кислоту (аспирин) (тест Триндера, известный также как тест с хлоридом железа), лучше всего выполняется на образцах мочи и хуже - на содержимом желудка или остатках веществ с места происшествия, так как ацетилсалициловая кислота сама по себе не вступает в реакцию без предварительного гидролиза. Большинство других тестов можно проводить на всех указанных образцах

Можно использовать иммунохроматографические пробы с помощью экспресс-тестов для скрининга (отсеивания) химических соединений, имеющих химико-токсикологическое значение. Отрицательный результат испытаний с помощью экспресс-тестов даёт право делать вывод об отсутствии факта приёма того или иного средства в течение ближайших суток до смерти.

Рекомендуемые качественные цветовые тесты

3.1.1 Салициловая кислота (включая ацетилсалициловую кислоту (аспирин)) - тест Триндера Предпринимается для исследования мочи, содержимого желудка и остатков веществ с места происшествия.

Реактив. Реактив Триндера. Смешать 40 г хлорида ртути, растворенного в 850 мл очищенной воды, с 120 мл водной соляной кислоты (1 моль/л) и 40 г гидратированного нитрата железа и разбавить до 1 л очищенной водой.

Метод: Добавить 0,1 мл реактива Триндера к 2 мл мочи и перемешивать в течение 5 с. Для анализа содержимого желудка или остатков веществ с места происшествия на ацетилсалициловую кислоту или метилсалицилат, а также мочи, содержимого желудка или остатков веществ с места происшествия на салициламид сначала прокипятить 1 мл образца с 1 мл водной соляной кислоты (0,1 моль/л) в течение 10 мин, охладить, отфильтровать (если необходимо) и затем нейтрализовать, добавив 1 мл водного раствора гидроксида натрия (0,1моль/л).

Оценка результата. Интенсивный фиолетовый цвет свидетельствует о присутствии салицилатов. В этом месте активную реакцию дают азидные консерванты, а при исследовании образцов мочи, содержащих высокие концентрации кетонов (кетонные тела), могут быть получены слабые ложноположительные реакции.

Этот тест чувствителен и позволяет обнаружить терапевтические дозы салициловой кислоты, ацетилсалициловой кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, метилсалицилата и салициламида.

Чувствительность Салицилат, 10 мг/л.

3.1.2 Фенотиазины - тест с FPN. Добавить 1 мл реактива FPN (смесь 5 мл водного раствора хлорида железа (50 г/л), 45 мл водной перхлорной кислоты (200 г/кг) и 50 мл водной азотной кислоты (500 мл/л)) к 1 мл образца и перемешивать в течение 5 с.

Оценка результата. Цвета от розового до красного, оранжевый, фиолетовый или синий свидетельствуют о присутствии фенотиазинов.

Положительные результаты должны быть подтверждены с помощью тонкослойной хроматографии.

3.1.3 Парацетамол, фенацетин - о-крезоламмиачный тест. Добавить 0,5 мл концентрированной соляной кислоты к 0,5 мл образца, нагреть в кипящей водяной бане в течение 10 мин и охладить. Добавить 1 мл водного раствора о-крезола (10 г/л) к 0,2 мл гидролизата, добавить 2 мл раствора гидроксида аммиака (4 моль/л) и перемешивать в течение 5с. Мгновенное интенсивное окрашивание в синий или сине-черный цвет свидетельствует о присутствии парацетамола или фенацетина.

Оценка результата. Мгновенное интенсивное окрашивание в синий или сине-черный цвет свидетельствует о присутствии парацетамола или фенацетина.

3.1.4 Для обнаружения барбитуратов: В делительную воронку вносят 50 мл мочи, к которой по каплям прибавляют 10 %-й раствор серной кислоты до pH = 4...5 и 50 мл диэтилового эфира. Содержимое делительной воронки взбалтывают. После разделения фаз отделяют эфирную вытяжку. Водную фазу еще раз взбалтывают с 50 мл диэтилового эфира. Эфирные вытяжки соединяют и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа. К хлороформному раствору прибавляют 2 капли свежеприготовленного 1 %-го раствора ацетата кобальта в метиловом спирте и несколько капель свежеприготовленного 1 %-го раствора гидроксида лития в метиловом спирте. После прибавления каждой капли указанных реактивов жидкость взбалтывают. Появление голубой окраски указывает на наличие барбитуратов в моче.

3.1.5 Тест на присутствие эфедрина и эфедрона: К 1 мл мочи добавляют кристаллический сульфат натрия до насыщения (кристаллы, выпавшие в осадок, не растворяются при встряхивании в течение 30 сек) и, затем, по 0,5 мл сероуглерода в бензоле (5% раствор) и аммиаката меди, встряхивать 30 минут. В этих условиях, эфедрин и эфедрон образуют комплексное соединение с медью, содержащееся в верхнем органическом слое. Органическую фазу отбирают, а водную промывают 1 мл бензола. Объединённые органические экстракты упаривают в токе холодного воздуха до объёма 50-100 мкл. Упаренный экстракт количественно наносят полосой 3 см на линию старта пластинки «Силуфол-254 УФ».

Приготовление аммиаката меди. Раствор А- растворить 20 г ацетата аммония и 0,5 г сульфата меди в 30 мл воды. Раствор Б- 10г едкого натра растворить в 20 мл воды и добавить 20 мл 25% раствора аммиак. Прибавлять к раствору А раствор Б и довести общий объём водой до 100мл.

Хроматографирование проводят в системе хлороформ-ацетон (48:2) - для эфедрина и в системе циклогексан:ацетон:метанол (40:10:2) – для эфедрона, Rf для эфедрина 0,26, для эфедрона 0,27, при длине пробега растворителя 10 и 15 см соответственно. Пластинку просушивают и просматривают в УФ свете.

Оценка результатов. Желто-коричневое окрашивание и совпадение величин Rf служит положительной реакцией и основанием для проведения дополнительного исследования. При отрицательном результате на эфедрин и эфедрон дальнейшее исследование на их обнаружение не проводится.

3.1.6 Проба на наличие хинина в моче. В делительную воронку вносят 2 мл мочи, которую подщелачивают раствором аммиака, а затем прибавляют 4 мл хлороформа и взбалтывают в течение 5 мин. От водной фазы отделяют слой органического растворителя, который взбалтывают с 3 мл 10 %-го раствора серной кислоты. Синяя флуоресценция водной фазы указывает на наличие хинина в моче. Флуоресценция становится более выраженной, если кислую водную вытяжку облучать УФ-светом.

3.1.7 Предварительная проба на наличие кодеина в моче. В делительную воронку вносят 50 мл мочи, подщелачивают раствором аммиака до pH=10, прибавляют 50 мл хлороформа и взбалтывают в течение 5 мин. Хлороформную вытяжку отделяют от водной фазы, вытяжку взбалтывают с 3 мл воды в течение 3 мин. Водную фазу отделяют от хлороформа, фильтруют через безводный сульфат натрия и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл этилового спирта. Полученный спиртовой раствор используют для обнаружения кодеина одним из следующих способов:

а) на фильтровальную бумагу наносят каплю полученного спиртового раствора и прибавляют каплю реактива Марки. При наличии кодеина пятно приобретает красноватую окраску, переходящую в сине-фиолетовую;

б) на фильтровальную бумагу наносят каплю указанного выше спиртового раствора и прибавляют каплю 0,5%-го раствора ванадата аммония и каплю 2 %-го раствора серной кислоты. При наличии кодеина появляется зеленая окраска, переходящая в синюю.

Для подтверждения результатов указанных реакций необходимо произвести обнаружение кодеина в вытяжке методом хроматографии в тонком слое сорбента.

3.2 Методы выделения токсических веществ, основанные на изолировании их подкисленным спиртом.

При изолировании химических веществ из органов (тканей) наилучшие результаты достигаются при измельчении объектов на кусочки размерами около 8 х 8 х 8 миллиметров.

Для извлечения химических веществ из тканей органов следует отдавать предпочтение растворителям с гидрофильными свойствами (спирт, ацетон и другим средствам) в силу их более легкого проникновения через мембрану клетки, в которой вещества находятся в виде водных растворов. Такой подход обеспечит наилучший результат.

Для повышения % выхода искомых веществ экстрагирование из водных вытяжек проводить смесью органического растворителя со спиртами (изопропиловым, пропиловым или бутиловым). Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) основана на различной растворимости веществ в двух несмешивающихся между собой жидких фазах. Количественной характеристикой экстракции является коэффициент распределения (D) - отношение растворимости вещества в двух фазах. Чем больше коэффициент распределения D, тем больше вещества переходит в экстрагент. Вещества кислотного характера чаще экстрагируют эфиром, так как они лучше растворяются в эфире, чем в хлороформе (например, у барбитала D =5,2 для эфир-вода и 0,7 для CHC13 –вода). Коэффициент распределения веществ кислотного характера для систем эфир/вода значительно больше, чем для хлороформ/вода. Для веществ основного характера применение смеси органических растворителей в ряде случаев позволяет повысить степень извлечения определяемого вещества. В этом случае к тому же уменьшается степень сорбции вещества на стекле и объекте. Например, смесью хлороформ-изопропанол (3:2) извлекается около 100% кокаина и его метаболитов. При

изолировании амфотерных соединений (морфин, теобромин), имеющих кислотные и основные центры, оптимальное значение pH водной фазы соответствует изоэлектрической точке, в которой такие соединения не имеют электрического заряда. Применение смеси растворителей (полярный и неполярный) повышает степень экстракции амфотерных соединений. Например, для экстракции морфина применяется смесь хлороформ-изоамиловый спирт (9:1). В этом случае экстрагируется около 80% морфина, а хлороформом – 10-20%.

3.2.1 Метод выделения токсических веществ, основанный на изолировании их этиловым спиртом подкисленным щавелевой кислотой.

Метод изолирования токсических веществ подкисленным этиловым спиртом, является эффективным для выделения ядовитых соединений из гнилостного биологического материала.

3.2.1.1 Метод Стасса-Отто. Ход изолирования. 100 г тщательно измельченного биологического материала вносят в широкогорлую колбу вместимостью 500 мл, заливают этиловым (96°) спиртом до покрытия им твердых частиц исследуемого объекта. Смесь биологического материала и этилового спирта подкисляют 10 %-м спиртовым раствором щавелевой кислоты. Содержимое колбы периодически перемешивают стеклянной палочкой. Через некоторое время проверяют pH содержимого колбы и при необходимости прибавляют 10 %-й спиртовой раствор щавелевой кислоты до pH = 2...3. Колбу слегка закрывают пробкой, оставляют на сутки в теплом месте (25-30 °С) при периодическом перемешивании ее содержимого. После этого кислую спиртовую вытяжку сливают с биологического материала. Настаивание биологического материала с новыми порциями этилового спирта, подкисленного 10%-м раствором щавелевой кислоты до pH = 2...3, производят еще 3 раза (в течение суток каждый раз). Кислые спиртовые вытяжки из биологического материала соединяют и переносят в фарфоровую чашку. Биологический материал переносят на фильтр и промывают этиловым спиртом. Этиловый спирт, которым промывают биологический материал, присоединяют к полученным вытяжкам. Объединенные спиртовые вытяжки упаривают до густоты сиропа на водяной бане, нагретой до 40 °С. К сиропообразной жидкости при перемешивании стеклянной палочкой по каплям прибавляют этиловый спирт (96°) до прекращения выпадания примесей в осадок. Образовавшийся осадок отфильтровывают, фильтр промывают этиловым спиртом. Фильтрат снова упаривают на водяной бане до густоты сиропа, как указано выше. Из сиропообразного остатка примеси осаждают этиловым спиртом. Упаривание спиртовых фильтратов и осаждение примесей этиловым спиртом из сиропообразной жидкости проводят многократно (до прекращения осаждения примесей от прибавления этилового спирта).

К очищенной таким образом сиропообразной жидкости прибавляют 25 мл воды. Если при этом образуется осадок, его отфильтровывают.

Кислую водно-спиртовую жидкость переносят в делительную воронку, прибавляют 15 мл хлороформа и легко взбалтывают в течение 5 мин, а затем

отделяют хлороформную вытяжку. Кислую водно-спиртовую жидкость еще 2-3 раза взбалтывают с новыми порциями хлороформа (по 15 мл). Хлороформные вытяжки из кислой водно-спиртовой жидкости соединяют, доводят до точного объёма в мерных колбах и исследуют на наличие ядовитых соединений, экстрагирующихся органическими растворителями из кислой среды. Оставшуюся в делительной воронке кислую жидкость подщелачивают 25 %-м раствором аммиака до pH = 9...10. Из этой подщелоченной жидкости алкалоиды и другие токсические вещества 4 раза экстрагируют новыми порциями хлороформа (по 15 мл). Хлороформные вытяжки соединяют доводят до точного объёма в мерных колбах и исследуют на наличие алкалоидов и некоторых других токсических веществ основного характера.

3.2.1.2 Методика изолирования, рекомендуемая при определении веществ группы фенотиазина. 100г ткани внутренних органов измельчают, заливают 96градусным этиловым спиртом до покрытия им твердых частиц объектов. Смесь подкисляют 10% спиртовым раствором щавелевой кислоты до реакции среды 2-3 и оставляют на 15 минут, при периодическом перемешивании. Затем проверяют кислотность смесей и оставляют на два часа при периодическом перемешивании. По истечении времени спиртовые вытяжки сливают, и биологический материал вновь заливают новой порцией подкисленного спирта и оставляют еще на два часа. Настаивание с новыми порциями подкисленного спирта, проводят еще два раза. Вытяжки фильтруют и фильтраты, из каждого объекта отдельно, выпаривают на водяной бане (40град.С) до густоты сиропа. Упаривание и обработку сиропа спиртом проводят до прекращения выпадения осадка, после прибавления к сиропу, по каплям, спирта. Освобожденные от примесей спиртовые втяжки выпаривают досуха. К сухим остаткам прибавляют по 100мл воды, нагретой до 60 градС. После охлаждения растворы профильтровывают и собирают в делительную воронку. Фильтры промывают 5% спиртовым раствором кислоты щавелевой и промывные воды присоединяют к основному фильтрату. Далее проводят очистку этиловым эфиром дважды по 50мл. Кислые вытяжки подщелачивают 50% раствором едкого натра до реакции среды 12-13 и экстрагируют 4 раза этиловым эфиром по 15.10.10мл. Далее эфирные вытяжки соединяют и взбалтывают с пятью порциями 0,5М раствора серной кислоты (10.10.10.5.5). Реэкстракты собирают в мерную колбу емкостью 50мл. Колбу нагревали до 50-60град.С на водяной бане в течение 3-х мин для удаления остатков эфира. Объем реэкстракта доводят до 50мл 0,5М раствором серной кислоты в мерной колбе. 40мл реэкстракта вносят в делительную воронку и подщелачивают 50% раствором едкого натра до реакции среды 13 по универсальной индикаторной бумажке. Содержимое воронки взбалтывают с тремя порциями диэтилового эфира по 15мл. Эфирные вытяжки фильтруют через слой безводного сульфата натрия и собирают в выпарительную чашку, наполняя каждый раз чашки только на одну треть их объёма. Полученный сухой остаток, растворяют в органическом растворителе.

Выделение аминазина из крови. В колбу вместимостью 100 мл, снабженную обратным холодильником, вносят 5-10 мл крови и прибавляют

30-50 мл этилового спирта, подкисленного 10 %-м спиртовым раствором щавелевой кислоты до pH = 2...3. Колбу нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, а затем охлаждают. Спиртовую вытяжку сливают и выпаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 50 мл воды, нагретой до 40-60 °С, и взбалтывают. После охлаждения раствора до комнатной температуры его фильтруют, собирая фильтрат в делительную воронку, в которую дважды прибавляют по 20 мл диэтилового эфира, и взбалтывают по 5-10 мин, а затем отделяют эфирный слой. Оставшуюся в делительной воронке кислую водную фазу подщелачивают 50 %-м раствором гидроксида натрия до pH= 13 и взбалтывают с 3-4 порциями диэтилового эфира (по 10 мл). Эфирные вытяжки соединяют и исследуют на наличие аминазина.

Выделение аминазина из мочи. В колбу вносят 50-200 мл мочи, подкисляют 25 %-м раствором серной кислоты до pH = 2...3, нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин, а затем охлаждают до комнатной температуры. Эту жидкость переносят в делительную воронку и взбалтывают в течение 5-10 мин с двумя новыми порциями диэтилового эфира по 50 мл. Оставшуюся в делительной воронке кислую водную фазу исследуют на наличие аминазина, как указано при описании способа выделения этого препарата из биологического материала.

3.3 Методы выделения токсических веществ, основанные на изолировании их подкисленной водой.

Метод выделения алкалоидов и других токсических веществ из биологического материала, основанный на изолировании их водой, подкисленной щавелевой кислотой. При изолировании алкалоидов и других токсических веществ подкисленной водой в несколько раз сокращается время анализа. Для выделения токсических веществ с помощью этого метода не требуется применение этилового спирта. Однако описанный выше метод изолирования токсических веществ непригоден для выделения из биологического материала соединений, нерастворимых в подкисленной воде. Кроме этого, данный метод ограниченно пригоден для выделения токсических веществ из загнившегося биологического материала.

При проведении химико-токсикологического анализа с целью определения наличия лекарственных веществ различных групп рекомендуется использовать метод изолирования с использованием щавелевой кислоты (метод Васильевой).

При направленном анализе, когда целью исследования является обнаружение какого-либо конкретного вещества или группы веществ, рекомендуется выбирать методику изолирования и дальнейшего исследования по частным методикам (некоторые из которых приведены ниже по тексту).

Для установления концентрации обнаруженных веществ при условии достаточности представленных биологических образцов необходимо провести повторное изолирование (выделение токсиканта) из новой порции объекта.

3.3.1 Предварительная обработка образцов

Хотя многие методики изолирования могут выполняться непосредственно на биологических материалах, часто требуется та или иная форма предварительной обработки образцов. В случае плазмы и сыворотки простая форма предварительной обработки предусматривает осаждение белка вихревым перемешиванием, например с водным раствором трихлоруксусной кислоты, с последующим центрифугированием и отделением чистого супернатанта. Применяют также гидролиз некоторых соединений, в том числе конъюгированных метаболитов (сульфаты и глюкурониды), который осуществляется нагреванием с кислотой или обработкой препаратом фермента. Это позволяет либо получить способное реагировать соединение для анализов (как, например, в случае бензодиазепинов и парацетамола), либо повысить чувствительность тестов (в случае слабительных средств и морфина).

Преданалитическая обработка мочи может состоять из различных операций: прямое концентрирование (упаривание некоторого количества мочи до небольшого объема на водяной бане либо роторном испарителе), экстракция растворителями, лиофилизация, хроматографическое разделение или сорбция на твердом сорбенте или комбинация различных операций (концентрирование – экстракция, лиофилизация – экстракция и др.).

Обработке экстракцией может быть подвергнута цельная кровь, плазма или сыворотка. Если для предотвращения свертывания крови использовались антикоагулянты, то необходимо учитывать, что гепарин вытесняет жирные кислоты из мест их связывания с альбумином. Это влияет, с одной стороны, на увеличение связывания токсических веществ с белками, с другой – на переход жирных кислот в органический растворитель при экстракции. Для уменьшения энзиматической активности кровь рекомендуется хранить в холодильнике в замороженном виде. Поскольку стеклянные стенки посуды содержат большое количество свободных гидроксильных групп, возможно связывание полярных токсических соединений стенками посуды за счет образования водородной связи. Это явление особенно важно учитывать при анализе следовых количеств вещества. Предварительное силилирование стенок посуды позволяет свести это явление к минимуму. Альтернативой является использование посуды из полипропилена или тефлона, хотя при этом необходимо считаться с загрязнением пробы мономерами смолы.

Из эндогенных соединений помимо жирных кислот в экстрактах из крови встречаются различные стероидные гормоны (тестостерон и др.), холестерин, которые в крови находятся в связанном состоянии с протеинами плазмы.

Слюна является продуктом секреции желез ротовой полости. Отобранную пробу центрифугируют и для хранения замораживают, чтобы замедлить активность ферментов. Хранить лучше всего слюну в склянках из тефлона или пропилена, чтобы избежать поглощения следовых количеств анализируемого вещества стенками стеклянной посуды. Установлено, что неионизированные формы токсического вещества, находящиеся в водном растворе плазмы, пассивно диффундируют в слюну, так что существует

прямая зависимость между концентрацией анализируемого вещества в слюне и его концентрацией в крови.

Волосы представляют относительно гомогенный (с точки зрения агрегатного состояния) биологический субстрат. Являясь легкодоступным для отбора, они представляют значительный интерес в качестве объекта при проведении химико-токсикологического анализа, как на неорганические, так и на органические вещества. При анализе волос наркотики могут быть обнаружены в отдаленные сроки после окончания их приема и в тех случаях, когда анализ биожидкостей дает отрицательный результат. Использование волос в качестве объекта исследования позволяет проследить динамику поступления наркотического вещества в организм человека. Анализ волос длиной 6-8 см (6-8 месяцев) позволяет судить о степени наркотической зависимости.

По сравнению с биожидкостями, исследование твердых кожных образований имеет целый ряд отличительных особенностей, которые накладывают отпечаток на все этапы проведения работ. Исследование волос включает в себя две принципиально важные с точки зрения интерпретации результатов стадии: предварительное исследование поверхности волос на присутствие анализируемых веществ и проведение очистки указанной поверхности от мешающих дальнейшему исследованию веществ с обязательной проверкой эффективности данной операции. К основным методам разрушения волос относятся следующие: экстракция органическими растворителями; кислотный или щелочной гидролиз; энзиматическое разрушение; экстракция органическими растворителями при сверхкритических условиях; термическое разложение объектов.

Желчь является продуктом секреторной деятельности печени, желчного пузыря и двенадцатиперстной кишки. Эта жидкость содержит большое количество воды, эндогенных веществ, подобных тем, которые находятся в крови, плазме и сыворотке, а также желчные кислоты и пигменты. Желчь различается по величине pH (в пределах 6,7-8,3), что заставляет контролировать pH в ходе подготовки к экстракции, а при необходимости использовать подходящий буфер. Рекомендуется пробу также центрифугировать при низких скоростях (для удаления холестерина) и осадить белки добавлением смеси хлороформ – метанол (2:1) или хлороформ – изопропанол (9:2).

Печень представляет собой центральный орган химического гомеостаза. В печени находится большое разнообразие экзогенных и эндогенных веществ: продукты белкового, углеводного, жирового обменов, продукты биотрансформации экзогенных, в том числе токсических веществ. Учитывая присутствие эндогенных и экзогенных веществ в экстракте из печени, этот объект является самым неудобным вследствие их большого разнообразия. Даже самая длительная и многоэтапная экстракция, например, кислых лекарственных средств дает в хлороформном экстракте до восьми разнообразных эндогенных соединений.

Большинство веществ метаболически связаны с белком или конъюгированы (т.е. биохимически переведены в водорастворимые производные, например, с глюкуроновой кислотой). Поэтому биожидкость перед экстракцией необходимо гидролизовать для того, чтобы разрушить конъюгант перед изолированием.

Трупный материал. Кровь: 80мл крови смешивают с 80мл концентрированной соляной кислоты и нагревают на водяной бане 1час с обратным холодильником. Затем полученную смесь охлаждают до комнатной температуры.

Трупный материал. Ткани и органы (в случае бензодиазепинов и парацетамола): 25 грамм ткани органа помещают в круглодонные колбы, каждый орган отдельно, вносят двойное количество 6н. раствора соляной кислоты и проводили гидролиз на глицериновой бане с обратным холодильником при 120°С в течение часа. По окончании гидролиза холодильник промывают 5 мл 2 н. раствора соляной кислоты, промывные воды присоединяют к гидролизатам из каждого органа отдельно. Горячие гидролизаты фильтруют через ватмановский фильтр (белая лента). Остатки на фильтре трижды промывают 2 н. раствором соляной кислоты. Гидролизаты и промывные воды из каждого органа отдельно объединяют.

3.3.2 Методика изолирования из образцов крови от живых лиц *(применяется для последующего исследования газовой или жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией)*: 5мл крови смешивают с 8мл 40% раствора бисульфита натрия, добавляют 2мл 15% раствора соляной кислоты, смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 30минут, а затем охлаждают. К жидкости добавляют 3мл 50% раствора трихлоруксусной кислоты. Через 10 минут надосадочную жидкость отфильтровывают в делительную воронку, нейтрализуют раствором аммиака 25% до реакции pH 6-7 по универсальному индикатору. Жидкость насыщают кристаллическим бикарбонатом натрия (0,3г на 30мл жидкости) и экстрагируют смесью бутанол-хлороформ (1:9) три раза по 20мл, в течение 5минут каждый раз. Экстракт профильтровывают через слой безводного сульфата натрия и концентрируют.

3.3.3 Метод изолирования с использованием щавелевой кислоты.

100г (*в исключительных случаях при недостаточном количестве биоматериала – 50г)* мелко измельченного трупного материала вносят в колбу вместимостью 500 мл. Трупный материал заливают 200 мл воды, подкисленной насыщенным водным раствором щавелевой кислоты до pH = 2,0...3,0. Смесь биологического материала и подкисленной воды оставляют на 2 ч при периодическом перемешивании содержимого колбы. После указанного времени кислую водную вытяжку сливают с трупного материала, который еще раз в течение часа настаивают с водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH = 2,0...3,0. а затем кислую водную вытяжку сливают с трупного материала.

Процеженную вытяжку подвергают центрифугированию. Надосадочную жидкость из центрифужного стакана переносят в делительную воронку. Эту жидкость 4 раза взбалтывают с новыми порциями органического

растворителя или смеси органических растворителей (по 20 мл). Хлороформные вытяжки из кислой среды соединяют и исследуют на наличие токсических веществ, которые экстрагируются из кислой среды.

Оставшуюся в делительной воронке кислую водную вытяжку подщелачивают 25 %-м раствором аммиака до pH = 10 и 4 раза взбалтывают с органического растворителя или смеси органических растворителей (порциями по 20 мл). Экстракты из щелочной среды соединяют и исследуют на наличие алкалоидов, их синтетических аналогов и других органических веществ основного характера.

Оставшуюся в делительной воронке водную фазу подщелачивают 50 %-м раствором гидроксида натрия до pH= 13 и взбалтывают с 3-4 порциями диэтилового эфира (по 10 мл). Эфирные вытяжки соединяют и исследуют на наличие веществ группы фенотиазина.

3.3.4 Метод изолирования с использованием серной кислоты (Крамаренко).

100г (в исключительных случаях при недостаточном количестве биоматериала – 50г)измельченных органов трупов вносят в стакан вместимостью 500 мл и заливают 0,02 н. раствором серной кислоты с таким расчетом, чтобы твердые частицы биологического материала были покрыты этой жидкостью. Содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой и с помощью универсального индикатора проверяют pH среды. Если pH среды превышает 2,5, то к смеси биологического материала и подкисленной воды по каплям прибавляют 20 %-й раствор серной кислоты до pH-2,5. Содержимое стакана оставляют на 2 ч при периодическом перемешивании, а затем процеживают через марлю. Твердые частицы биологического материала еще дважды настаивают с новыми порциями 0,02 н. раствора серной кислоты, доводя pH до 2,5 и настаивая в течение часа.

Кислые водные вытяжки из биологического материала соединяют, переносят в стакан для центрифугирования вместимостью 200 мл и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают, а остаток в центрифужном стакане перемешивают стеклянной палочкой и заливают 20-30 мл 0,2 н. раствора серной кислоты. Содержимое центрифужного стакана настаивают в течение 2 ч и центрифугируют. Надосадочную жидкость присоединяют к ранее полученной надосадочной жидкости. Объединенные надосадочные жидкости (центрифугат А) подвергают дальнейшему исследованию.

При исследовании загнившегося биологического материала на наличие токсических веществ к центрифугату А прибавляют кристаллический сульфат аммония до насыщения жидкости этим электролитом. Через 1-2 ч образующийся осадок примесей отделяют от жидкости центрифугированием. Надосадочную жидкость сливают с осадка и проверяют степень кислотности этой жидкости. При необходимости жидкость доводят до pH = 2,0...2,5 прибавлением 10 %-го раствора серной кислоты. Подкисленную до pH = 2,0...2,5 жидкость дважды взбалтывают с диэтиловым эфиром (по 40 мл).

Эфирные вытяжки, содержащие примеси, отделяют от кислой водной фазы и в дальнейшем не исследуют.

Кислую водную фазу подщелачивают 20%-м раствором гидроксида натрия до pH = 8,5...9,0 и 3 раза взбалтывают с хлороформом (объем хлороформа, взятый для каждой экстракции, должен быть в три раза меньше объема водной фазы). Хлороформные вытяжки соединяют, профильтровывают и на водяной бане отгоняют хлороформ до небольшого объема (15 мл). Оставшийся хлороформ выпаривают на воздухе досуха. Сухой остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. В полученном растворе определяют наличие алкалоидов.

Если раствор сухого остатка в 0,1 н. растворе соляной кислоты имеет бурую окраску или содержит окрашенные взвешенные частицы, то его 1-2 раза взбалтывают с равным объемом изоамилового спирта. Этот спирт, содержащий примеси, отделяют от кислой водной фазы, в которой определяют наличие алкалоидов и других токсических веществ.

При исследовании незагнившегося биологического материала осаждение примесей из вытяжек сульфатом аммония не производится, Центрифугат А дважды взбалтывают с диэтиловым эфиром по 30 мл. Эфирные вытяжки отделяют и в дальнейшем не исследуют. Кислую водную фазу подщелачивают 20%-м раствором гидроксида натрия до pH = 8,5...9,0 и 3 раза взбалтывают с хлороформом (объем хлороформа для каждой экстракции должен быть в 3 раза меньше, чем объем водной фазы). Хлороформные вытяжки соединяют и хлороформ отгоняют на водяной бане до небольшого объема (5 мл). Оставшийся хлороформ на воздухе выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. В полученном растворе определяют наличие алкалоидов и других токсических веществ.

В тех случаях, когда биологический материал подвергают исследованию на наличие токсических веществ, экстрагирующихся из кислых водных вытяжек, центрифугат А доводят 20 %-м раствором гидроксида натрия до pH = 4...5 и 3 раза взбалтывают с хлороформом (объем хлороформа должен быть в 3 раза меньше, чем объем водной фазы). Хлороформные вытяжки соединяют и отгоняют хлороформ, как указано выше. Сухой остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. В этом растворе определяют наличие токсических веществ, экстрагирующихся из кислой среды.

4.3.5. Изолирование барбитуратов водой, подкисленной щавелевой кислотой. (Швайковой) *Применяется при направленном исследовании на производные барбитуровой кислоты.*

100 г тщательно измельченных органов трупов, прибавляют 200 мл воды, подкисляют насыщенным водным раствором щавелевой кислоты до pH = 2 (по универсальному индикатору) и оставляют на 2 ч при частом перемешивании. Затем содержимое колбы переносят в стакан для центрифугирования вместимостью 500 мл и центрифугируют в течение 30 мин (3000 об/мин). Центрифугат сливают с осадка и процеживают через ватный тампон. Процеженную жидкость собирают в делительную воронку и проверяют pH этой жидкости. В случае необходимости жидкость доводят до

pH = 2. Содержимое делительной воронки взбалтывают с тремя порциями хлороформа (по 20, 15 и 15 мл) в течение 5 мин. Если образуется эмульсия, то ее разрушают центрифугированием.

Хлороформные вытяжки соединяют, доводят хлороформом до 50 мл и переносят в делительную воронку, в которую прибавляют 25 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, и взбалтывают. Водную фазу отделяют от хлороформной вытяжки. Эту вытяжку взбалтывают с двумя порциями воды по 1,5 мл. Первую и вторую порции воды (по 1,5 мл), которыми промывали хлороформные вытяжки, присоединяют к щелочной водной фазе. Потом водную фазу подкисляют соляной кислотой до pH = 2, вносят в делительную воронку и взбалтывают с двумя новыми порциями хлороформа (по 20 мл) в течение 5 мин. Хлороформные вытяжки соединяют и доводят хлороформом до 50 мл. В этих вытяжках определяют наличие и количественное содержание барбитуратов.

3.3.6 Изолирование барбитуратов подщелоченной водой. (П. Валова). ***Применяется при направленном исследовании на производные барбитуровой кислоты.***

Ход изолирования. В стакан или в коническую колбу вносят 100 г измельченного биологического материала, прибавляют 180 мл воды и 20 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия. Содержимое стакана (или колбы) оставляют на 30 мин при частом перемешивании, а затем центрифугируют в течение 30 мин (3000 об/мин). От осадка отделяют надосадочную жидкость (центрифугат), к которой прибавляют 120 мл 10 %-го раствора вольфрамата натрия и 1 н. раствор серной кислоты (до pH = 2). Жидкость нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, а затем подвергают центрифугированию (30 мин). Центрифугат сливают с осадка и процеживают через ватный тампон, смоченный водой. Процеженную жидкость собирают в делительную воронку. Тампон промывают водой (10 мл). Промывную воду тоже выливают в делительную воронку. К процеженной жидкости прибавляют равный объем диэтилового эфира и взбалтывают в течение 15 мин. Эфирный слой отделяют и взбалтывают с 50 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия. Щелочной водный слой отделяют, подкисляют 25 %-м раствором серной кислоты до pH = 2 и взбалтывают с равным объемом диэтилового эфира. Полученную при этом эфирную вытяжку используют для обнаружения барбитуратов.

3.3.7 Выделение бензонала из биологического материала. В стакан вносят 100 г измельченного биологического материала, прибавляют 10 мл раствора соляной кислоты (1 : 1), перемешивают и прибавляют 50 г сульфата аммония. Содержимое стакана хорошо перемешивают и прибавляют 200 мл смеси равных объемов этилового спирта и хлороформа. Смесь биологического материала с указанными растворителями настаивают в течение 2 ч при постоянном перемешивании. Вытяжку сливают с твердых частиц биологического материала и фильтруют через плотный бумажный фильтр, который затем промывают 5-10 мл смеси этилового спирта и хлороформа (1 : 1). Фильтрат и промывную жидкость переносят в делительную воронку и

оставляют для разделения фаз. Водную фазу, насыщенную сульфатом аммония, отделяют и в дальнейшем не исследуют. Слой органических растворителей выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 200 мл горячей воды (порциями по 50 мл), полученную жидкость перемешивают и фильтруют. Фильтрат охлаждают и взбалтывают с тремя порциями хлороформа (20, 15 и 15 мл). Хлороформные вытяжки соединяют и взбалтывают с 10 мл фосфатного буферного раствора (pH = 7,4) в течение 5 мин. Хлороформный слой отделяют от водной фазы (раствор А) и фильтруют через небольшой плотный бумажный фильтр, смоченный хлороформом. Фильтрат собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем хлороформной вытяжки доводят хлороформом до метки. Хлороформную вытяжку используют для идентификации и количественного определения бензонала . Поскольку бензонал частично разлагается в организме на фенобарбитал и бензойную кислоту, наличие последней определяют в водной фазе (в растворе А). С этой целью водную фазу подкисляют раствором соляной кислоты (1 : 1) до pH = 2 и взбалтывают с ом. От водной фазы отделяют хлороформную вытяжку, которую исследуют на наличие бензойной кислоты.

3.3.8 Изолирование дезоморфина из проб мочи.К 10 мл мочи прибавить 2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон плотно закрыть и выдерживать 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения гидролизат экстрагировать 10 мл хлороформа (экстракт отбрасывается). К водной фракции прибавляется 25% водный раствор аммиака до pH 9-10 и дважды экстрагируется смесью хлороформ – бутанол-1 (6:1) порциями по 10 мл. Органические фазы отделяются, объединяются и фильтруются через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия. Экстракт выпаривается до сухого остатка в токе теплого воздуха (60ºС).

3.3.9 Учитывая возможность использования в химико-токсикологических исследованиях небольшой по своей массе биологический материал, чему способствовало то, что используемые инструментальные методы анализа обладают высокой чувствительностью, а также, в некоторых случаях, производится направленный анализ или же эксперт ориентирован на содержание яда в организме.

В таких случаях, обстоятельствах для экстракции токсического вещества рекомендовано следующее количество биоматериала:

1. Концентрация анализируемого вещества около 0,1 мг % - 50 мл мочи или крови, 50 г ткани.

2. Концентрация ядов - около 1 мг % - 3 мл мочи (крови) или 5 г ткани.

3. Концентрация токсического вещества 10 мг % - 1 мл мочи (крови) или 1 г ткани.

Эти количества достаточны при экстракционном методе с 50% эффективностью при чувствительности аналитической методики около 5 мкг.

При анализе неизвестного яда в практике химико-токсикологических экспертиз принято брать для анализа 100 мл мочи (крови) или 50 г биологической ткани.

Модифицированы и внедряются в практику химико-токсикологической экспертизы работы с малой навеской, которые приводим ниже:

3.3.9.1 Модифицированный метод А.А. Васильевой.

К 5 г измельченной ткани печени или почки в пенициллиновом флаконе вместимостью 20 мл прибавляют 10 мл 10 % раствора щавелевой кислоты, тщательно перемешивают, измеряют pH, который должен быть равен 1.0...2,0 при необходимости добавляют насыщенный раствор щавелевой кислоты. Пробу оставляют при комнатной температуре на 1 час, при периодическом встряхивании флакона через 5-10 минут, или пробу помещают в аппарат для встряхивания. Через 1 час центрифугируют при 2,5 тыс. об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость (pH≈1,0...2,0) осторожно сливают в другой пенициллиновый флакон, куда добавляют 10 мл эфира, закрывают пробкой, энергично встряхивают в течение 2 минут и центрифугируют в вышеописанных условиях. Эфирное извлечение отделяют от водной фазы, фильтруют через складчатый фильтр в фарфоровую чашку и выпаривают эфир при комнатной температуре досуха. Водную фазу после извлечения эфиром подщелачивают 25% раствором аммония гидроксида до pH≈10,0, добавляют 10 мл хлороформа и экстрагируют также, как эфиром. Хлороформный экстракт отделяют центрифугированием, фильтруют в фарфоровую чашку, хлороформ выпаривают при температуре не выше 40°С.

3.3.9.2 Модифицированный метод *Стасса - Отто*

К 5 г измельченной ткани печени или почки в пенициллиновом флаконе вместимостью 20 мл прибавляют 8 мл спирта и 2 мл 10% спиртового раствора щавелевой кислоты (pH≈2,0...3,0). Содержимое флакона перемешивают, контролируют значение pH (1,0...2,0), встряхивают ицентрифугируют. Экстракты сливают и операцию извлечения повторяют дважды. Спиртовые извлечения объединяют, выпаривают на водяной бане при 60°С до густоты сиропа и проводят осаждение белков абсолютным этанолом 2 раза. После выпаривания спиртовых извлечений к остаткам прибавляют 5 мл теплой воды, встряхивают и центрифугируют. Водное извлечение сливают (pH≈2,0...3,0) и дважды экстрагируют эфиром, используя каждый раз по 10 мл. Эфирные экстракты отделяют и выпаривают досуха. Сухой остаток в фарфоровой чашке тщательно обрабатывают горячей модой (80-90°С) 2 раза по 5 мл, фильтруя каждую порцию через ватный тампон в пенициллиновый флакон. После охлаждения к жидкости добавляют насыщенный раствор щавелевой кислоты до pH≈1,0...2,0 и экстрагируют 10 мл эфира. Эфирное извлечение отделяют и фильтруют через складчатый фильтр в пенициллиновый флакон с надписью «экстракт из кислого раствора».

4.3.10 Очистка экстрактов от жирных кислот и наполнителей.

а) Перед выпариванием растворителя добавить водного раствора гидроксида натрия к экстракту из кислой вытяжки и водного раствора соляной кислоты к экстракту из щелочной вытяжки.

б) Встряхивать на механической качалке в течение 5 мин, центрифугировать в течение 10 мин и отбросить оба органических слоя.

в) Добавить водного раствора соляной кислоты к водному остатку экстракта из кислой вытяжки и 5 мл буфера и хлорида аммония - к водному остатку экстракта из щелочной вытяжки и повторно экстрагировать.

Для получения надежных результатов необходима очистка исследуемых веществ от соэкстрактивных веществ биоматериала. Очистка может быть проведена при подготовке объекта, в процессе изолирования или после него.

На 1 этапе изолирования возможна только грубая очистка, которая проводится путем:

1 – удаления механических загрязнений (мелких частиц биоматериала) фильтрованием, центрифугированием;

2 – осаждения примесей при добавлении соответствующих реагентов, например, осаждение белков абсолютным спиртом, ацетоном, трихлоруксусной кислотой, вольфрамовой, фосфорно-вольфрамовой, фосфорно-молибденовой кислотами, насыщение электролитами (Na2SO4, (NH4)2SO4, NaCI). При этом возможно соосаждение искомых веществ, что ведет к их частичной потере;

3 – изменения состава фаз, т.е. введения другого органического растворителя (связано с большими потерями веществ).

На 2 этапе изолирования или после него возможна более тонкая очистка, которая может осуществляться путем:

1 – реэкстракции, т.е. переведения веществ из одной жидкой фазы в другую при изменении pH раствора (например, очистка барбитуратов и алкалоидов за счет различной растворимости их солеобразных и молекулярных форм в воде и органических растворителях). При этом примеси отделяются от экстрагируемого вещества за счет нерастворимости в используемом экстрагенте. Либо, наоборот, экстрагирование примесей из раствора подходящим экстрагентом (эфир в методе В.Ф. Крамаренко).

2 – сублимации – для веществ, способных возгоняться без разложения при нагревании (салициловая, бензойная кислоты, барбитураты, жидкие алкалоиды).

3 – хроматографии – ионообменной, гель-хроматографии, адсорбционной хроматографии на колонках, тонкослойной хроматографии. Последний вид хроматографии используется часто, т.к. наряду с очисткой дает возможность разделить вещества (их метаболиты) при комбинированных отравлениях и провести их предварительную идентификацию по величинам Rf (хроматографический скрининг «нелетучих» ядов).

3.4 Твердофазная экстракция

Применении на стадии пробоподготовки метода твердофазной экстракции, позволяет осуществлять одновременное разделение, выделение и концентрирование целевых компонентов из биологических жидкостей и их экстрактов, лекарственных и нативных наркотических средств. Такой подход дает возможность получения веществ в чистом виде, что в дальнейшем позволяет проводить идентификацию методами ИК-, УФ– спектроскопии, ТСХ, ГЖ, ВЭЖХ, методом хромато-масс-спектрометрии.

В основе метода твердофазной экстракции лежит принцип колоночной хроматографии, который основан на специфическом взаимодействии выделяемого из биоматериала компонента с сорбентом, находящимся в небольшом патроне. Патрон–картридж имеет полиэтиленовую оболочку, внутри которой находится сорбент, упакованный между двумя пористыми фильтрами. Патроны могут соединяться друг с другом, представляя более широкие возможности для их использования. Чаще всего для заполнения патронов применяют сорбенты на основе силикагеля и химически модифицированного силикагеля. Для модификации силикагеля используются вещества, содержащие различные функциональные группы (нитрильные, диольные, амино-, карбокси- и сульфогруппы), а также алифатические (С1 – С18) и ароматические (фенильные) группы. Выбор соответствующего типа патрона связан со свойствами определяемого вещества и осуществляется по типу подобия.

3.4.1 Методика подготовки проб мочи твердофазной экстракцией на картриджах «Oasis» HLB 3cc.

К пробам мочи объемом 1 мл прибавляется по 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта (например: этилморфина гидрохлорида 0,02 мг/мл) и проводят подготовку проб одним из двух способов:

а) без гидролиза - к пробе мочи прибавляется 100 мг гидрокарбоната натрия;

б) кислотный гидролиз - К пробам мочи объемом 5 мл прибавляют по 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон герметично закрывают и раствор нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляется1,2 мл 30% раствора гидроксида натрия и 500 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора последнего.

После проведения предварительных процедур образцы мочи центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин и надосадочную жидкость загружают в предварительно кондиционированный (2 мл этанола + 1 мл дистиллированной воды) картридж. Пропускают образец через картридж со скоростью 1 мл/мин и промывают 1 мл 10 % раствора этанола. Патрон сушат под вакуумом не менее 10мин и элюируют 3 мл этанола. Элюат испаряют в потоке воздуха при 40-50^{o}C.

3.4.2 Методика подготовки проб мочи твердофазной экстракцией на картриджах AccuBond EVIDEX (200 мг/3мл). К пробам мочи объемом 5 мл прибавляют по 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, флакон герметично закрывают и раствор нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры к пробе добавляют 1,2 мл 30% раствора гидроксида натрия и 500 мг бикарбоната натрия до образования насыщенного раствора последнего. Пробы центрифугируют при 3000 об/мин 5 мин и надосадочную жидкость загружают в предварительно кондиционированный (3 мл этанола + 2 мл дистиллированной воды) картридж. Пропускают образец через картридж со скоростью 1 мл/мин и промывают 2 мл 10 % раствора этанола. Патрон сушат

под вакуумом не менее 20 мин и элюируют 5 мл этанола. Элюат испаряют в потоке воздуха при 40-50ºС до объема около 100 мкл и переносят в виалы.

Для дальнейшего исследования методом ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии элюаты восстанавливают в соответствующих подвижных фазах. Идентификацию проводят методами ИК-, УФ– спектроскопии, ТСХ, ГЖ, ВЭЖХ, методом хромато-масс-спектрометрии.

3.4.3 При использовании патронов Диапак для большинства веществ проводят следующие операции.

1. Активация – приведение патрона в рабочее состояние путем промывки этиловым или метиловым спиртом (2-10 мл). Скорость пропускания 2,5 мл/мин.

2. Кондиционирование – пропускание буферного раствора (ацетатного или аммиачного) в зависимости от исследуемых веществ. Объем буферного раствора – 10 мл. Скорость пропускания 2,5 мл/мин.

3. Сорбция – пропускание исследуемого раствора через патрон. Объем пробы обычно 100 мл. Скорость пропускания 2,5 мл/мин.

4. Десорбция – удаление исследуемого вещества с сорбента с помощью воздуха шприцем или вакуумным насосом.

5. Элюирование образца осуществляется реагентом, который применялся на стадии активации. Объем элюента – 50-100 мл.

Высокая эффективность патронов позволяет использовать их для пробоподготовки широкого круга объектов – от лекарственных препаратов сложного состава до “уличных наркотиков” и биологических жидкостей (моча, кровь, сыворотка и т.д.), а также экстрактов биологических жидкостей.

Может использоваться изолирование ацетонитрилом или ацетоном.

3.3.10 Изолирование веществ кислотного и основного характера нейтральным ацетоном (метод Карташова В.А.).

К 5 г биологического материала в стеклянном флаконе прибавляют 10 мл ацетона и энергично встряхивают в течение 10 мин, центрифугируют, ацетоновый экстракт отделяют и операцию извлечения повторяют еще дважды, используя каждый раз по 5 мл ацетона и встряхивая по 1-2 мин. Ацетоновые извлечения объединяют, добавляют 20 мл 0,5 н. раствора хлористоводородной кислоты, 10 мл н-гексана, встряхивают и центрифугируют. Органическую фазу, содержащую гидрофобные примеси, отделяют и не исследуют. С целью очистки экстракцию гексаном повторяют. Затем проводят извлечение 10 мл эфира. Эфирный экстракт отделяют во флакон, маркированный «Вещества кислотного характера». Водно-ацетоновую фазу подщелачивают 25 % раствором гидроксида аммония до pH 9-10, добавляют 3 г хлорида натрия (высаливающий агент) и экстрагируют 10 мл эфира, как описано выше. Эфирный экстракт отделяют во флакон, маркированный «Вещества основного характера». Эфирные извлечения из кислого и щелочного растворов сохраняют для дальнейшего исследования.

Выбор методики изолирования зависит от pK соединений (см.Приложение 1), цели исследования, стадии распределения искомого

вещества, количества и характера представленного для исследования биологического материала.

3.5 ОБНАРУЖЕНИЕ ВЕЩЕСТВ

Для обнаружения применяют реакции осаждения, цветные реакции, физические, физико-химические методы анализа, а в ряде случаев проводят фармакологические пробы.

3.5.1 Тонкослойная хроматография.

При выполнении любых исследований методом тонкослойной хроматографии удаляются все органические растворители и воды с поверхности хроматографических пластинок во избежание ложных результатов.

Сущность метода: Назначение описываемой ниже схемы - получить как можно больше информации в кратчайший срок с минимальным объемом образца. Экстракты анализируют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на одной пластинке с использованием одного растворителя. Щелочной экстракт в процессе выпаривания окисляют, чтобы свести к минимуму потери летучих оснований, например амфетаминов. Хотя флюоресцирующие соединения, например хинин, можно обнаружить посредством простого изучения хроматограммы в ультрафиолетовом свете (254 и 366 нм), использование некоторых реактивов для опрыскивания (в целях визуализации) увеличивает диапазон анализа и достоверность идентификации.

Экстракты могут включать жиры, что значительно затрудняет хроматографический анализ, поэтому может потребоваться очистка образца путем повторной экстракции в водную кислоту или щелочь.

Хроматографические пластины:

- с нанесенным слоем силикагеля MERCK 60 F_{254};
- заводские пластины «Сорбфил», «Силуфол», «MERCK»;
- пластины «Сорбфил» и «Силуфол» перед использованием хроматографируются в системе с ацетоном и высушиваются в токе горячего воздуха.

Приготовление и хранение пластин с нанесенным слоем силикагеля:

-на чистую стеклянную пластину 10х12см, дважды обработанную спирто-эфирной составом (1:1), наносится смесь силикагель MERCK 60 F_{254} – медицинский гипс – дистиллированная вода (2,9г – 0,25г – 11мл);

-время высыхания пластины при комнатной температуре – 15 часов;

-время активирования при 120^0С – 1 час;

-хранение в эксикаторе над хлоридом кальция в течение 1 недели.

Растворители для тонкослойной хроматографии

При выборе растворителя для тонкослойной хроматографии руководствуются свойствами сорбента и разделяемых веществ. В адсорбционной хроматографии важное значение имеет соотношение полярностей растворителя, сорбента и веществ разделяемой смеси.

В контакте с полярным сорбентом растворитель адсорбируется на нем и вытесняет разделяемые компоненты тем полнее, чем выше его полярность. В

зависимости от прочности адсорбции на полярных сорбентах все растворители располагают в элюотропный ряд (см.Приложение 5).

Для вытеснения (элюирования) веществ смеси, удерживаемых сорбентом, должен применяться растворитель, адсорбирующийся прочнее, чем эти вещества.

Наиболее сильными элюентами являются вода, метанол, пиридин, сероуглерод, уксусная кислота.

Приготовление и использование хроматографических систем:

- стеклянные камеры с притертыми или завинчивающимися крышками;
- объем подвижной жидкой фазы (ПЖФ) вносить в камеру из расчета погружения пластины в жидкость на глубину не более 0,5см;
- время встряхивания смешивающихся органических растворителей, входящих в состав ПЖФ – 30сек; плохо смешивающихся органических и водных фаз – 15мин;
- при приготовлении системы бензол-диоксан-25% раствор аммиака (60:35:5), после встряхивания растворителей водную фазу отделить в делительной воронке, а органическую – отфильтровать через небольшое количество безводного сульфата натрия в хроматографическую камеру;
- ПЖФ добавлять в камеру за 30мин до погружения хроматографической пластины или использовать для насыщения камеры фильтровальную бумагу размером с пластинку;
- использование ПЖФ производить однократно.

Образцы сравнения:

- все образцы сравнения рекомендуется использовать в виде спиртовых растворов 1-5мг/мл или сухого вещества, находящегося в лунках стрипов или бумажных дисках (перенос веществ на пластину при помощи этанола или метанола);
- количество образца сравнения на пластинах с нанесенным слоем силикагеля – 20-40мкг, в зависимости от искомых концентраций в объекте;
- на заводских пластинах – 5-30мкг, в зависимости от искомых концентраций в объекте;
- диаметр пятна не более 3-5мм;
- расстояние между пятнами – 1,2-1,5см.

Количество исследуемого объекта:

- для пластин с нанесенным слоем силикагеля - эквивалент не менее 5г органа, в зависимости от искомых концентраций в объекте (диаметр пятна – 5-6мм) (см.Приложение 2);
- для заводских пластин - эквивалент от не менее 2 г органа, в зависимости от искомых концентраций в объекте (диаметр пятна – 4-5мм) (см.Приложение 2);
- длина полосы исследуемого образца эквивалентного 10-20г органа – около 1,5-2,0см.

Нанесение образцов

Некоторые выпускаемые промышленностью пластинки покрыты особым слоем адсорбента, который упрощает процедуру нанесения образцов. Однако чаще всего образец наносится непосредственно на слой силикагеля.

Техника нанесения: Пластинку подготавливают, отмечая исходную линию карандашом на расстоянии не менее 1 см от края пластинки, при этом необходимо проследить за тем, чтобы не нарушилась поверхность слоя силикагеля. Затем на пластинке нужно отметить линию на расстоянии 10 см выше стартовой линии, чтобы указать оптимальное положение фронта растворителя; при необходимости можно выбрать и другие расстояния. При использовании пластинок размером 20 х 20 см рекомендуется делать отметки (например, карандашом), разделяющие пластинку по вертикали на колонки шириной 2 см, чтобы свести к минимуму краевые эффекты.

Образцы и любые стандарты следует осторожно наносить микропипеткой или шприцем на стартовой линии в соответствующих колонках, чтобы диаметр пятен был не более 5 мм. Более крупные пятна ухудшат разрешение при проявлении хроматограммы. Объем растворителя должен быть минимальным; как правило, в 5—10 мкл раствора содержится 10 мкг анализируемого вещества. Сначала наносят обработанные экстракты образцов, а затем стандарты или смеси стандартов; такая последовательность сводит к минимуму опасность перекрестного загрязнения. Стеклянные капилляры, обычно применяемые в приборах для определения точек плавления, можно легко вытянуть в пламени микрогорелки и использовать как одноразовые микропипетки с очень тонким кончиком. В идеальном случае растворитель, используемый при нанесении образца, должен быть таким же, как и применяемый для проявления хроматограммы, но это не всегда осуществимо; удовлетворительным в этом плане является метанол. Для ускорения испарения растворителя с образцом пластинку можно слегка нагреть, например феном для сушки волос, но перед началом проявления ее следует охладить, при этом необходимо помнить, что нагревание пластинок сопряжено с опасностью потери летучих анализируемых соединений, например амфетаминов.

3.5.1.2 Схема ТСХ-скрининга на лекарственные и наркотические соединения, подлежащих обязательному судебно-химическому исследованию (см. Приложение 6)

3.5.1.3 ТСХ-скрининга в системе растворителей хлороформ-метанол 9:1(см. Приложение 3)

3.5.1.4 Величины hRf при тонкослойной хроматографии (элюент ЭМА) и цветовые реакции (цвет по краям) с реактивами для опрыскивания (см. Приложение 4).

ТСХ применяется в системе общего и частного скрининга и разработана для многих лекарственных веществ, имеющих токсикологичское значение.

3.5.1.5 В общем скрининге используется множество систем растворителей, из них можно выделить некоторые:

1. Для веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера, извлекаемых органическим растворителем из кислого водного раствора – хлороформ:ацетон (9:1).

2. Для веществ основного характера, извлекаемых органическим растворителем из щелочного водного раствора: диоксан:хлороформ:ацетон:25% раствор аммиака (47,5:45:5:2,5), ацетон:хлорофром:25% раствор аммиака (245:12:1).

3. При анализе наркотических и других одурманивающих веществ, при экспресс-анализе острых отравлений используют универсальную систему толуол:ацетон:этанол:25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5).

Для детектирования веществ на хроматографической пластинке разработана схема последовательного их проявления.

Для веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера:

- УФ-облучение,
- дифенилкарбазон в хлороформе и раствор сульфата ртути: проявляются производные барбитуровой кислоты;
- раствор хлорида железа трехвалентного: проявляются производные пиразолона, салициловой кислоты, фенотиазина;
- реакив Драгендорфа и 0,5 М серная кислота: проявляются азотсодержащие вещества слабоосновного характера.

Для веществ основного характера:

- УФ-облучение,
- раствор хлорида железа трехвалентного: проявляются производные пиразолона, фенотиазина;
- раствор натрия нитрата в кислоте хлорной: проявляются производные фенотиазина, тиоксантены;
- реакив Драгендорфа и 0,5 М серная кислота: проявляются азотсодержащие вещества основного характера.

Отдельная пластинка: реактив Марки (концентрированная кислота серная, содержащая 10% формалина): проявляются, в частности алкалоиды группы опия, дифенгидрамин, некоторые производные фенотиазина и др.

При обнаружении веществ в общих системах переходят к исследованию в частных системах растворителей.

Например:

Для барбитуратов – хлороформ:н-бутанол:25% раствор аммиака (70:40:5).

Для алкалоидов опия – этилацетат:метанол:25% раствор аммиака (17:2:1).

Внимание: Проведение хроматографического исследования в тонком слое сорбента в различных подвижных фазах, разными детектирующими реагентами являются раздельными методами категории В классификации доказательности действующей Инструкции по производству судебно-медицинских экспертиз.

Методы количественного и полуколичественного анализа.

Количественный анализ в тонкослойной хроматографии имеет несколько видов, характеризующий каждый этап развития метода. И хотя некоторые методы можно применять только как полуколичественные, они до сих пор применяются на практике.

Метод визуального сравнения. Как говорилось выше, интенсивность окраски пятна и его размер от количества хроматографируемого вещества. Поэтому визуальное количественное определение построено на нескольких приемах.

Метод разбавления. Этот метод заключается в том, что для каждого вещества определяют предельную концентрацию, при которой вещество не может быть определено хроматографическим методом.

При хроматографировании исследуемого вещества поводят разбавление до тех пор, пока оно перестает проявляться на пластинке.

Содержание вещества С, определенное таким методом находят по формуле:

- $C=an$

где n*-разбавление, а-концентрация вещества, при котором оно не проявляется при хроматографировании.*

Метод определения площади пятна. Если наносить одинаковые объемы исследуемых веществ и свидетелей, то получившиеся после хроматографирования площади пятен пропорциональна логарифму концентрации вещества.

Если пятно разделенного вещества имеет резкие границы, то площадь пятна можно определить весовым методом (вырезать пятно и взвесить), замеряется планиметром. Этот метод дает ошибку до 10-15%.

Необходимость более достоверного результата количественного определения привела к использованию инструментальных методов.

Метод элюирования. Этот метод заключается в том, что разделенное вещество смывают с сорбента растворителем и определяют его концентрацию уже другими методами - фотометрическими, спектрофотометрическим полярографическими и т.д. Это достаточно точный метод, но только при условии количественного выделения разделенного вещества. Из-за высокой трудоемкости метод используется достаточно редко и неприемлем при большом количестве исследуемых образцов.

Фотографический метод определения заключается в фотографировании пластинок с разделенным веществом и дальнейшим определением степени почернения, с использованием десинтометров.

Фотодесинтометрический метод может быть использован без выделения вещества с пластинки и основан на определении не только площади пятна, но и его интенсивности. Это наиболее точный метод определения концентрации веществ, так как позволяет при использовании калибровочных графиков, проводить достаточно точные количественные определения всех разделенных веществ (до 2-10%) непосредственно на пластинке за короткий промежуток времени.

• *применение десинтометров увеличивается, чувствительность и, следовательно, точность определения концентрации разделенных веществ повышается и приближается к точности высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

Радиографический метод аналогичен фотометрическому, только с той разницей, что определяется почернение пластинки, вызванное излучением разделенного вещества. Этот метод используется только при определении веществ с меченными атомами.

3.5.2 Дополнительно могут использоваться ГЖХ, МС, ВЭЖХ исследование

3.5.2.1 Поисковый метод идентификации наиболее распространённых психоактивных средств методом жидкостной масс-спектрометрии. Хромато-масс-спектральный анализ с использованием системы LC/MS/MS Q TRAP 3200 и ВЭЖХ «UltiMate 3000». Система включает: тройной квадрупольный масс-спектрометр с линейной ионной ловушкой, источник ионов Turbo V^{TM}, компьютерную программу Analyst 1.5. Объем вводимой пробы 15мкл. Подвижная фаза смесь фазы А и фазы В соотношении 90:10. Фаза А: 996 мл воды, 2мл 1М раствор ацетата аммония и 2мл муравьиной кислоты; фаза В - 996 мл ацетонитрила, 2мл 1М раствор ацетата аммония и 2мл муравьиной кислоты. В градиентном режиме: от 0-4 мин 10% фазы В, 90% фазы А; от 4 до 7 мин 10% фазы А 90% фазы В (скорость 0,5мл/мин); от 7 до 7,5мин 10% фазы В, 90% фазы А (скорость 0,5мл/мин); от 7,5. до 10мин 10% фазы В, 90% фазы А. Сканирование проводится в режиме «Positive» MRM (мультиреактивный мониторинг) - ион фрагментируется для образования иона продукта с определенной массой при CE (энергии столкновения) 35. CAD (параметр давления инертного газа в столкновительной камере) -4; DP (параметр фрагментации кластера) -20, EP (потенциал входа) -10, CXP (потенциал выхода из столкновительной камеры)-2,5; температура турбо газа пробоввода 400°C, Gas 1- 50,0 и Gas 2- 55,0. В режиме EPI (эффективное сканирование ионов-продуктов) - ионы продукты получают в столкновительной камере Q2 в результате столкновения родительских ионов при CE (энергии столкновения) 35 поступающих из Q1, Затем ионы продукты передаются и накапливаются в Q3 где они сканируются, образуя улучшенный спектр ионов-продуктов. Хроматографическая колонка: X Terra® MS C8, 3,3µm. Скорость ввода пробы 0,35 мкл/мин. Режим сканирования от 50 до 700 Дальтон.

Подтверждающие исследования проводятся с учетом свойств искомого вещества с предварительной оптимизацией необходимых условий анализа. Определение количественного содержания вещества проводится с использованием внутреннего стандарта и серии стандартных растворов соответствующего вещества в диапазоне искомых концентраций.

3.5.2.2 ВЭЖХ исследование: колонка размером 2х75 мм, с обращенной фазой «Prontosil 120-5-C18), зернением 5 мкм. Детектирование при 200, 220, 250, 300 нм. Подвижная фаза: элюент «А» – раствор кислоты трифторуксусной (ТФУ) 0,1%, элюент «Б» – ацетонитрил 100%. Градиент от 5 до 50% при

скорости потока 150 мкл/мин и температуре колонки 35 °С. Идентификацию ведут по времени удерживания и характерного для данного вещества спектра.

Количественное определение проводится методом ВЭЖХ по калибровочным графикам с использованием не менее трех спиртовых растворов веществ в диапазоне искомых концентраций.

3.5.2.3 Для ГЖХ анализа подтверждающие исследования проводятся с учетом свойств искомого вещества с предварительной оптимизацией необходимых условий анализа. Определение количественного содержания вещества проводится с использованием внутреннего стандарта и серии растворов соответствующего вещества в диапазоне искомых концентраций, либо методом добавок.

3.6 Частные методы исследования для веществ списка.

3.6.1 Обнаружение веществ, экстрагируемых органическими растворителями из кислых водных вытяжек.

К этой группе токсических веществ относятся барбитураты, производные ксантина, отдельные алкалоиды и некоторые другие токсические соединения.

При проведении химико-токсикологического анализа эксперт может использовать любые из описанных методик исследования в зависимости от наименований представленных образцов их количества, с учётом фазы распределения искомого вещества.

3.6.1.1 Обнаружение барбитуратов

Применяемые в медицине барбитураты являются 5,5-замещенными (барбамил, барбитал, фенобарбитал и др.) и 1,5,5-замещенными (гексенал, гексабарбитал, бензонал и др.) барбитуровой кислоты.

Для обнаружения барбитуратов применяются микрокристаллоскопические реакции, методы хроматографии, УФ- и ИК-спектроскопии. Для объектов не биологического происхождения, содержимого желудка, промывных вод желудка, рвотных масс, смывов и т.п. могут быть использованы цветные реакции, реакции осаждения описанные в специализированной литературе.

Обнаружение барбитуратов по спектрам поглощения в УФ-области.

Сущность метода. Описанный ниже метод позволяет обнаружить отдельные барбитураты и определить принадлежность их к соответствующим группам барбитуратов.

К сухому остатку, полученному при выпаривании вытяжек из биологического материала или лекарственных форм, прибавляют 5 мл воды. После растворения сухого остатка полученный раствор фильтруют, затем к фильтрату прибавляют 1 каплю 2 н. раствора аммиака (pH~10) и снимают спектр поглощения. При этом 5,5-замещенные (барбамил, барбитал, бутобарбитал, фенобарбитал, циклобарбитал, этаминал) и 1,5,5-замещенные (гексенал, гексобарбитал) барбитуровой кислоты имеют максимум поглощения при длине волны около 240 нм, а производные тиобарбитуровой кислоты имеют 2 максимума (при 305 и при 255 нм). Если к этому раствору прибавить 1-2 капли 2 н. раствора серной кислоты (pH~2), то максимум

поглощения 1,5,5- и 5,5-замещенных барбитуровой кислоты исчезает. В этих условиях для тиобарбитуратов максимумы поглощения смещаются до 290 и 239 нм. После прибавления к указанным растворам 1-2 капель 4 н. раствора гидроксида натрия (pH~13) появляется максимум поглощения 1,5, 5-замещенных барбитуровой кислоты при 240 нм, а для 5,5-производных этой кислоты — при 255 нм. Для тиобарбитуратов появляется максимум при 305 нм, а второй максимум исчезает.

БАРБАМИЛ

Метаболизм. Часть барбамила выделяется из организма с мочой в неизмененном виде. Около 45 % барбамила подвергается различным превращениям. В качестве метаболита барбамила является 5-этил-5-(3-гидрокси-3-метилбутил)-барбитуровая кислота, которая выделяется с мочой. В моче обнаружено еще 2 метаболита барбамила, состав которых не установлен.

При действии серной кислоты на барбамил выделяется кислотная форма этого препарата, образуется осадок, частицы которого имеют форму пластинок или призм, сгруппированных в виде сфероидов. Предел обнаружения: 21 мкг барбамила в пробе.

Хлорцинкиод с барбамилом образует темно-красные или золотистые прямоугольные пластинки или сростки из них. Предел обнаружения: 7 мкг барбамила в пробе.

Барбамил со смесью, растворов хлорида железа (III) и иодида калия образует кристаллический осадок (призмы или сростки из них) оранжево-коричневого или коричневого цвета. Предел обнаружения: 1,8 мкг барбамила в пробе.

Дииодокупрат калия в растворе иода с барбамилом образуют призматической формы кристаллы или сростки из них. Предел обнаружения: 2,1 мкг барбамила в пробе.

В ИК-области спектра барбамил (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1716, 1689 и 1745 $см^{-1}$.

БАРБИТАЛ

Барбитал по сравнению с другими барбитуратами медленно всасывается из пищевого канала и еще медленнее выделяется из организма. Его можно обнаружить в организме даже через 10 суток после приема.

Метаболизм. Большая часть дозы принятого барбитала выделяется с мочой в неизмененном виде. Незначительная часть дозы этого препарата выделяется с мочой в виде метаболитов, к числу которых относятся: 5-этил-5-β-оксиэтилбарбитуровая кислота, ее глюкуронид и 5-этил-барбитуровая кислота.

Обнаружение барбитала

После прибавления серной кислоты к барбиталу образуется кислотная форма этого препарата. Под микроскопом наблюдается появление бесцветных прозрачных прямоугольных призм. Предел обнаружения: 80 мкг барбитала в пробе.

При взаимодействии барбитала с раствором хлорцинкиода образуются темно-красные, фиолетовые или серовато-розовые прямоугольные пластинки. Предел обнаружения: 4 мкг барбитала в пробе.

Барбитал с солями меди и пиридином образует фиолетовые кристаллы, имеющие форму прямоугольников, друз или звездочек. Предел обнаружения: 14 мкг барбитала в пробе.

Обнаружение барбитала по УФ- и ИК-спектрам. Способ обнаружения барбитала и других барбитуратов по УФ-спектрам описан выше.

В ИК-области спектра барбитал (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1674, 1754, 1380 и 1707 см $^{-1}$.

ФЕНОБАРБИТАЛ

Фенобарбитал, по сравнению с другими барбитуратами, относительно медленно всасывается из пищевого канала и имеет продолжительное действие.

Метаболизм. Фенобарбитал метаболизируется несколькими путями. Основными метаболитами фенобарбитала являются 5-этил-5- п -гидроксифенилбарбитуровая кислота, п -оксифенилбарбитал. Эти метаболиты частично выделяются с мочой в виде глюкуронидов. Некоторое количество фенобарбитала превращается в о -оксифенобарбитал. Обнаружены еще 3 метаболита фенобарбитала, состав которых не изучен. Часть принятой дозы фенобарбитала выделяется с мочой в неизмененном виде.

Обнаружение фенобарбитала

От прибавления концентрированной серной кислоты к фенобарбиталу образуется кристаллический осадок кислотной формы этого препарата (бесцветные игольчатые кристаллы, сростки из них, сфероиды). Предел обнаружения: 41 мкг фенобарбитала в пробе.

Фенобарбитал со смесью соли железа (III) и иодида калия образует оранжево-коричневые или коричневые кристаллы (призмы и их сростки). Предел обнаружения: 4 мкг фенобарбитала в пробе.

Обнаружение фенобарбитала по УФ- и ИК-спектрам. Обнаружение фенобарбитала по УФ-спектрам производится так, как и обнаружение других барбитуратов. В ИК-области спектра фенобарбитал (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1703, 1756 и 1406 см $^{-1}$.

БУТОБАРБИТАЛ

Метаболизм. Метаболитом бутобарбитала является 5-(3'-гидроксибутил) -5-этилбарбитуровая кислота.

Обнаружение бутобарбитала

При взаимодействии бутобарбитала с пиридином и солями меди образуются фиолетовые сростки в виде сфероидов. Предел обнаружения: 16 мкг бутобарбитала в пробе.

От прибавления к бутобарбиталу концентрированной серной кислоты образуются кристаллы в виде прозрачных призм и сростков из них. Предел обнаружения: 16 мкг бутобарбитала в пробе.

Хлорцинкиод с бутобарбиталом дает ромбической формы кристаллы или сростки из них, имеющие темно-коричневую окраску. Предел обнаружения: 6 мкг бутобарбитала в пробе.

При взаимодействии бутобарбитала со смесью хлорида железа (III) и иодида калия образуются призматические кристаллы, имеющие коричневую или оранжевую окраску. Предел обнаружения: 6 мкг бутобарбитала в пробе.

Бутобарбитал с дииодокупратом калия в растворе иода образует осадок, частицы которого напоминают форму чечевицы. Предел обнаружения: 6 мкг бутобарбитала в пробе.

Обнаружение бутобарбитала по УФ- и ИК-спектрам. Обнаружение барбитуратов, в том числе и бутобарбитала, по спектрам поглощения в УФ-области описано выше). В ИК-области спектра бутобарбитал (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1683, 1712 и 1745 см- ^{1}.

ЭТАМИНАЛ-НАТРИЙ

Метаболизм. Этаминал-натрий быстро всасывается из пищевого канала и подвергается метаболизму. Основными метаболитами этаминал-натрия являются: этил-5-(окси-3-метил-1-бутил)--5-барбитуровая кислота, метил-5-(окси-3-метил-1-бутил)-5-барбитуровая кислота, этил-5-(карбокси-3-метил-1-пропил)-5-барбитуровая кислота. Одним из метаболитов этаминал-натрия является мочевина.

Обнаружение этаминал-натрия

После прибавления концентрированной серной кислоты к этаминал-натрию через 10-15 мин образуется осадок (сростки из призматических кристаллов). Предел обнаружения: 5 мкг этаминал-натрия в пробе.

При взаимодействии этаминал-натрия с хлорцинкиодом образуется коричневый или оранжево-коричневый кристаллический осадок (призмы или сростки из них). Предел обнаружения: 4 мкг этаминал-натрия в пробе.

Этаминал-натрий со смесью хлорида железа (III) и иодида калия дает кристаллический осадок коричневого или оранжево-коричневого цвета (призмы и сростки из них). Предел обнаружения: 0,5 мкг этаминал-натрия в пробе.

Обнаружение этаминала-натрия по УФ- и ИК-спектрам.

Этаминал, как и некоторые другие барбитураты, являющиеся производными 5,5-барбитуровой кислоты, определяют по светопоглощению в УФ-области спектра так, как описано выше; в ИК-области спектра этаминал (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1685, 1719 и 1744 см $^{-1}$.

Обнаружение этаминала методом хроматографии. На хроматографической пластинке, покрытой закрепленным тонким слоем силикагеля, подвижная фаза (хлороформ — бензол — ацетон в соотношении 70 : 15 : 15) с предварительным насыщением камеры. Детектирующий реагент: смесь, состоящая из 0,25 г безводного сульфата меди, 1,5 мл диэтиламина и 48,5 мл метилового спирта. Пластинку дополнительно опрыскивают насыщенным раствором нитрата ртути (I).

При наличии этаминала в пробе на желтом фоне хроматографической пластинки появляются черные пятна (Rf = 0,58...0,62).

БЕНЗОНАЛ

Метаболизм. Метаболитами бензонала являются бензойная кислота и фенобарбитал, который, в свою очередь, подвергается метаболизму). Бензонал и его метаболиты в основном выделяются с мочой.

Обнаружение бензонала

Бензонал можно обнаружить по форме кристаллов, которые образуются после прибавления к нему метилового спирта и концентрированной соляной кислоты. С этой целью на предметное стекло, на котором находится сухой остаток этого препарата, наносят каплю смеси равных объемов метилового спирта и концентрированной соляной кислоты. Жидкость на предметном стекле накрывают покровным стеклом. Через несколько минут в поле зрения под микроскопом появляются ромбической формы кристаллы или сростки из них.

ГЕКСЕНАЛ

Метаболизм. Гексенал относится к барбитуратам короткого периода действия. В организме он подвергается метаболизму несколькими путями. При метаболизме может гидроксилироваться циклогексильная группа гексенала. Образовавшийся при этом продукт гидроксилирования может подвергаться окислению с образованием 3'-кетогексабарбитала. Этот метаболит, в свою очередь, может подвергаться N-деметилированию. Некоторая часть гексенала подвергается метаболизму путем N-деметилирования при атоме азота в третьем положении. В результате этого образуется норгексабарбитал. Определенное количество гексенала, поступившего в организм, метаболизируется путем разрыва цикла барбитуровой кислоты.

Обнаружение гексенала

От прибавления концентрированной серной кислоты к гексеналу образуется осадок, состоящий из сростков игольчатых кристаллов.

Гексенал с подкисленным спиртовым раствором иодида калия образует кристаллический осадок.

Обнаружение гексенала по УФ-спектрам. Гексенал в ходе химико-токсикологического анализа выделяется из биологического материала в виде гексобарбитала, который можно обнаружить по спектрам поглощения.

В ИК-области спектра гексенал (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1712, 1660, 1390, 1358 см $^{-1}$.

4.6.1.2.1 Для количественного определения барбитуратов, изолированных из биологического материала животного происхождения (кровь, моча, внутренние органы трупа), наиболее перспективным является спектрофотометрический метод.

Спектрофотометрический метод требует сравнительно высокой чистоты исследуемого вещества. Такую степень чистоты обеспечивает хроматография в тонком слое силикагеля КСК.

Спектрофотометрическое определение барбитуратов основано на способности барбитуратов к кетоэнольной или амидоимидольной таутометрии: при pH 2,0 барбитурат находится в растворе в виде кетонной (неионизированной) формы, не обладающей в пределах длин волн (λ) 200-300

нм специфической абсорбцией. При pH 10,0 образуется моноимидольная форма, в гетероциклическом ядре возникает двойная связь, способная к поглощению в ультрафиолетовой области спектра. Поглощение наблюдается при λ = 240 нм. При pH 13,0 и выше в растворе присутствует диимидольная форма с двумя двойными связями в кольце. Максимум абсорбции наблюдается при λ =255-260 нм.

Для определения барбитуратов рекомендованы: методы прямого спектрофотометрирования при pH 10,0 и λ = 240 нм и два варианта дифференциального метода: при pH 10,0-pH 2,0 и λ =239 нм при исследовании внутренних органов трупа и при pH 13,0-pH 10,0 и λ = 260 нм при исследованиях крови и мочи. Дифференциальные варианты спектрофотометрического определения дают более надежные результаты, так как здесь в значительной степени исключается влияние посторонних веществ, экстрагируемых хлороформом из кислого раствора вместе с барбитуратами.

Для расчета содержания барбитурата пользуются калибровочным графиком или, что лучше, значениями удельного показателя поглощения. Удельный показатель поглощения $E_1^{1\%}{}_{\text{см}}$ вычисляется по формуле:

$$E_{1\ \text{см}}^{1\%} = \frac{\Delta D}{c \cdot l},$$

где *D*-оптическая плотность; ΔD>=ДрН10-ДрН2 или ДрН13-ДрН10; *C* – концентрация вещества в процентах; *l* - толщина поглощающего слоя в сантиметрах. Отсюда

$$C = \frac{\Delta D}{E_{1\ \text{см}}^{1\%} \cdot l}.$$

В сочетании с хроматографией спектрофотометрический метод является достаточно специфичным, быстрым, чувствительным. Определяются микрограммовые количества барбитуратов.

3.6.1.2 Производные ксантина.

К числу производных ксантина, применяемых в медицине, относятся кофеин, теобромин и теофиллин, которые являются алкалоидами:

Для обнаружения кофеина, теобромина и теофиллина применяют реакции группового осаждения алкалоидов, некоторые физико-химические методы и др.

Индивидуальные реакции обнаружения отдельных производных ксантина приведены ниже при описании способов идентификации кофеина, теобромина и теофиллина.

КОФЕИН

В щелочной среде кофеин разлагается с образованием физиологически неактивного кофеидина:

Кофеин экстрагируется органическими растворителями из кислых и щелочных растворов. Однако максимальные количества кофеина экстрагируются хлороформом при pH = 4,0—5,5 (А. И. Шкадова).

Метаболизм. Кофеин быстро всасывается из пищевого канала. По токсичности кофеин слабее теофиллина, но сильнее теобромина. Кофеин

быстро разлагается в организме (примерно 15 % принятой дозы разлагается за 1 ч) путем N-деметилирования и окисления. В результате разложения кофеина образуется ряд метаболитов (1-метилксантин, 7-метилксантин, 1,7-диметилксантин, 1-метилмочевая кислота, 1,3-метилмочевая кислота), которые выделяются с мочой. Только незначительное количество поступившего в организм кофеина выделяется с мочой в неизмененном виде.

Обнаружение кофеина

Для обнаружения кофеина используется хлороформная вытяжка из кислых водных растворов.

Обнаружение кофеина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор кофеина в этиловом спирте имеет максимум поглощения при длине волны, равной 273 нм. В 0,1 н. растворе соляной кислоты кофеин имеет максимум поглощения при длине волны, равной 272 нм. В ИК-области спектра основание кофеина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1695, 1658 и 745 см $^{-1}$.

Обнаружение кофеина методом хроматографии. На хроматографической пластинке отмечают линию старта, на которую наносят исследуемый образец, а правее на расстоянии 2 см от нее — каплю раствора «свидетеля» (0,01 %-й раствор кофеина в хлороформе). Пятна на пластинке подсушивают на воздухе, а затем пластинку помещают в камеру для хроматографирования, пространство которой насыщено парами растворителей (эфир - ацетон - 25 %-й раствор аммиака (40:20:1). Камеру плотно закрывают крышкой. Пластинку вынимают из камеры после того, как фронт растворителей поднимается на 10 см выше линии старта. Пластинку подсушивают на воздухе и опрыскивают 0,1 н. раствором иода, а затем через несколько минут пластинку опрыскивают смесью равных объемов 96° этилового спирта и 25 %-го раствора соляной кислоты. При этом пятна кофеина на хроматограммах приобретают фиолетовую окраску.

3.6.1.3 НАРКОТИН

Наркотин (гноскапин, носкапин) является одним из алкалоидов опия, в котором содержится 0,75-9 % этого вещества. Наркотин легко рацемизируется. При кипячении уксусно-кислых растворов наркотина образуется его рацемат (гноскапин). Природный наркотин является левовращающим.

Наркотин экстрагируется органическими растворителями как из кислых, так и из щелочных водных растворов. Максимум экстракции наркотина органическими растворителями достигается при pH = 5...7.

Метаболизм. После введения наркотина в организм он быстро исчезает из крови и переходит в ткани. В течение первых шести часов после поступления наркотина в организм он выделяется с мочой в неизмененном виде, а после указанного времени наркотин выделяется из организма в виде конъюгатов.

Обнаружение наркотина

Исследование на наличие наркотина производят в тех случаях, если в вытяжках из биологического материала обнаружен морфин и в связи с этим возникает вопрос о возможности отравления опием.

Ввиду того что наркотин и морфин с некоторыми реактивами-дают подобные продукты реакций, перед идентификацией наркотина его отделяют от морфина. Способ разделения этих алкалоидов основан на том, что морфин, содержащий фенольную группу, растворяется в щелочах и после этого не экстрагируется органическими растворителями из щелочных растворов. Наркотин в этих условиях экстрагируется органическими растворителями.

Для разделения наркотина и морфина берут хлороформную вытяжку и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 - 2 мл разбавленной соляной кислоты, прибавляют 2-3 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и взбалтывают с двумя порциями хлороформа (по 5 мл). Хлороформные вытяжки соединяют и выпаривают досуха. В сухом остатке определяют наличие наркотина.

Обнаружение наркотина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор основания наркотина в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 291 и 310 нм. Водный раствор гидрохлорида наркотина имеет максимум поглощения при 313 нм и минимум - при 268 нм; основание наркотина (диск с бромидом калия) в ИК-области спектра имеет основные пики при 1745, 1276 и 1038 см $^{-1}$.

3.6.1.4 МЕКОНОВАЯ КИСЛОТА

Меконовая кислота содержится в опии в связанном виде с алкалоидами.

Кроме меконовой кислоты алкалоиды опия в растениях могут быть связаны и с другими кислотами.

Исследование объектов биологического происхождения на наличие меконовой кислоты производится тогда, когда в биологическом материале обнаружены морфин, кодеин и другие алкалоиды опия. Наличие в биологическом материале морфина, кодеина, наркотина, меконовой кислоты, а в ряде случаев и меконина указывает на отравление опием.

Выделение меконовой кислоты из биологического материала. Из биологического материала меконовую кислоту изолируют подкисленным спиртом. Для подкисления биологического материала лучше применять соляную кислоту, а не слабые органические кислоты. Исследуемый биологический материал настаивают с этиловым спиртом, подкисленным соляной кислотой. Вытяжку сливают с твердых частиц биологического материала и фильтруют, а затем фильтрат на водяной бане выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в воде и фильтруют. Полученный фильтрат нагревают до кипения и взбалтывают с избытком оксида магния. Раствор, содержащий меконат магния, еще горячим фильтруют и упаривают до небольшого объема, а затем подкисляют разбавленной соляной кислотой. В этом растворе определяют наличие меконовой кислоты.

Обнаружение меконовой кислоты

Реакция с хлоридом железа (III). К 1-2 мл указанного выше раствора прибавляют 2-3 капли 1 %-го раствора хлорида железа (III). Появление кроваво-красной окраски указывает на наличие меконовой кислоты в растворе. Эта окраска не должна исчезать при нагревании.

Обнаружение меконовой кислоты по УФ-спектрам. Меконовая кислота в водном растворе имеет максимумы поглощения при 210, 284 и 303 нм.

Описанные выше способы выделения меконовой кислоты из биологического материала и обнаружения ее в вытяжках также пригодны для исследования остатков пищи, мочи, рвотных масс и других объектов на наличие указанной кислоты.

3.6.1.5 МЕКОНИН

Меконин содержится в опии, получаемом из снотворного мака и в желтокорне канадском.

Меконин экстрагируется органическими растворителями из кислых растворов.

Меконин не имеет токсикологического значения, но обнаружение его в трупном материале указывает на отравление опием.

Выделение меконина из биологического материала. Измельченный биологический материал настаивают с этиловым спиртом, подкисленным серной кислотой. Полученную вытяжку сливают с твердых частиц объекта, фильтруют и упаривают до небольшого объема. Затем эту жидкость взбалтывают с бензолом. Бензольную вытяжку выпаривают досуха. Сухой остаток исследуют на наличие меконина.

Обнаружение меконина. От прибавления нескольких капель концентрированной серной кислоты к полученному выше сухому остатку появляется зеленая окраска, которая в течение двух суток переходит в красную. При слабом нагревании раствора, имеющего зеленую окраску, появляется изумрудно-зеленая окраска, переходящая в фиолетовую, а затем в красную.

3.6.2 Обнаружение веществ, экстрагируемых органическими растворителями из подщелоченных водных вытяжек.

Общие указания. В химико-токсикологическом анализе наиболее многочисленную группу токсических соединений составляют вещества, которые экстрагируются органическими растворителями из подщелоченных водных вытяжек. Ниже приводится описание свойств, применения и методов анализа только некоторых из этих веществ, которые неоднократно были причиной отравлений. К числу рассматриваемых ниже веществ относятся алкалоиды, синтетические соединения, полученные на основе алкалоидов, и ряд других препаратов.

3.6.2.1 ХИНИН

Хинин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества хинина экстрагируются хлороформом при pH = 9...10.

Метаболизм. В организме хинин подвергается метаболизму путем окисления хинолинового и хинуклидинового циклов. При этом образуются 2-оксихинин, 2'-оксихинин, диоксихинин. При метаболизме может окисляться винильная группа в молекуле хинина с образованием хинетина. Также может окисляться хинуклидиновый цикл с образованием гемохинной кислоты (6-метокси-хинолин-4-кетокарбоновой кислоты). Метаболиты и незначительная часть несвязанного хинина выводится из организма с мочой.

Обнаружение хинина

Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов. Хинин дает осадки с реактивами группового осаждения алкалоидов: реактивами Бушарда, Драгендорфа, Майера, Зонненшейна.

Реактив Бушарда. В 10-15 мл воды растворяют 2 г иодида калия. К полученному раствору

Талейохинная реакция. Выполнение реакции. Раствор исследуемого вещества выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 мл воды. К полученному раствору по каплям прибавляют бромную воду (избегая ее избытка) до слабо-желтой окраски. От прибавления нескольких капель раствора аммиака к слабо-желтому раствору появляется ярко-зеленая окраска, которая при нейтральной реакции становится синей, а при добавлении кислоты переходит в красную или фиолетовую. При взбалтывании жидкости, имеющей зеленую окраску, с хлороформом последний приобретает зеленую окраску.

На воспроизводимость реакции влияет концентрация исследуемого вещества, объемы прибавляемых реактивов и т. д. Реакции мешают амидопирин, антипирин, кофеин и др.

Обнаружение хинина методом хроматографии. Для обнаружения хинина применяют метод хроматографии в тонком слое сорбента.

Обнаружение хинина по УФ- и ИК-спектрам. Основание хинина в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 236, 278 и 332 нм, а хинин в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 250, 316 и 346 нм. В ИК-области спектра основание хинина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1235, 1510, 1030 и 1619 см $^{-1}$.

3.6.2.2 ОПИЙ И ОМНОПОН

Обнаружение морфина, кодеина, наркотина и меконовой кислоты является доказательством наличия опия в исследуемых объектах. Для доказательства отравлений опием кроме обнаружения указанных выше веществ исследуемые объекты необходимо дополнительно проверить на наличие меконина. Это мотивируется тем, что реакции обнаружения меконовой кислоты малочувствительны и что она относительно быстро разлагается в биологическом материале. Для обнаружения меконовой кислоты необходимо, чтобы в исследуемом материале содержалось не меньше 0,05 г опия.

Обнаружение меконовой кислоты (способ описанн выше) позволяет отличить опий от омнопона при исследовании вытяжек из биологического материала, поступившего на химико-токсикологический анализ. Опий содержит меконовую кислоту, а в омнопоне она отсутствует.

При химико-токсикологических исследованиях алкалоидов опия в биологическом материале их экстрагируют органическими растворителями из подщелоченных вытяжек. Морфин, кодеин, папаверин и тебаин хорошо экстрагируются органическими растворителями из щелочной среды. Однако значительное количество тебаина может экстрагироваться и из кислой среды. Наркотин начинает экстрагироваться хлороформом, 1,2-дихлорэтаном при pH

выше единицы. При pH = 5...7 теми же органическими растворителями экстрагируется свыше 90 % наркотина.

Омнопон (пантопон) представляет собой смесь гидрохлоридов алкалоидов опия. В состав омнопона входят около 50 % морфина и 32-35 % других алкалоидов. Выпускается промышленностью в виде порошка и ампул. В 1 мл 1 %-го раствора омнопона содержится 6,7 морфина гидрохлорида, 2,7 наркотина, 0,72 кодеина, 0,36 папаверина гидрохлорида и 0,05 мг тебаина.

В химико-токсикологическом анализе при исследовании биологического материала на наличие омнопона в вытяжках определяют наличие морфина, кодеина и наркотина, а при исследовании биологического материала на наличие опия определяют те же алкалоиды и дополнительно проводят реакции идентификации на меконовую кислоту и по возможности на меконин. В омнопоне меконовая кислота и меконин отсутствуют.

3.6.2.2.1 МОРФИН

Морфин является одним из главных алкалоидов опия, в котором содержится 3-20 % этого алкалоида. В молекуле морфина содержится атом азота, ОН-группа фенольного-и ОН-группа спиртового характера. Наличие атома азота и указанных ОН-групп обусловливает химические свойства морфина, используемые для аналитических целей.

Морфин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества морфина экстрагируются при pH = 8,6...10,2. Действие на организм. В медицине применяется гидрохлорид морфина. Этот препарат является основным представителем группы наркотических анальгетиков.

Метаболизм. В организме основное количество морфина связывается с глюкуроновой кислотой и в виде глюкуронида выделяется с мочой. За первые 8 ч после введения морфина 50 % его выделяется с мочой в виде глюкуронида, а за 24 ч выделяется из организма примерно 90 % глюкуронида морфина. В организме незначительная часть морфина подвергается N-деметилированию (образуется норморфин) и О-метилированию (образуется кодеин).

В органах трупов морфин постепенно превращается в псевдоморфин (оксидиморфин, дегидроморфин), по которому определяют отравление морфином.

Выделение морфина из биологического материала. Для выделения морфина из биологического материала рекомендованы методы, основанные на изолировании этого алкалоида спиртом, подкисленным щавелевой кислотой, или водой, подкисленной щавелевой или серной кислотой. Большие количества морфина выделяются с помощью метода, основанного на изолировании его водой, подкисленной серной кислотой.

Обнаружение морфина

Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Морфин дает осадки с реактивами группового осаждения алкалоидов (реактивы Бушарда, Драгендорфа, Майера, Зонненшейна).

Цветные реакции. Морфин дает окраску с концентрированной азотной кислотой, реактивами Манделина, Марки, Фреде и Эрдмана.

Реакция Пеллагри. Выполнение реакции. К сухому остатку исследуемого экстракта прибавляют 1-2 капли концентрированной соляной кислоты. После растворения сухого остатка в этой кислоте в пробирку вносят 1-2 капли концентрированной серной кислоты и смесь нагревают на водяной бане до полного выпаривания соляной кислоты. После этого жидкость еще нагревают в течение 15 мин, потом охлаждают и прибавляют 2-3 мл воды. Если при этом образуется осадок, то его растворяют в нескольких миллилитрах разбавленной соляной кислоты. Полученный раствор нейтрализуют 10 %-м раствором карбоната натрия и прибавляют 2-3 капли спиртового раствора иода. При этом появляется зеленая окраска. После прибавления 0,5-1,0 мл диэтилового эфира и взбалтывания водный слой сохраняет зеленую окраску, а зфирный приобретает пурпурно-красную. Избыток иода мешает этой реакции, так как его окраска маскирует окраску конечного продукта реакции. Реакцию Пеллагри дают и другие вещества (кодеин, этилморфин, диацетил морфин, апоморфин и др.).

Реакция с хлоридом железа (Ш). В фарфоровую чашку вносят исследуемый экстракт, который при комнатной температуре выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1-2 капли свежеприготовленного 2 %-го раствора хлорида железа (Ш). При наличии морфина появляется синяя окраска.

Реакция с йодноватой кислотой (HIO_3). При взбалтывании раствора морфина, слабо подкисленного серной кислотой, с раствором йодноватой кислоты или раствором иодата калия (KIO_3), не содержащего иодидов, выделяется свободный иод, который при взбалтывании с хлороформом переходит в хлороформный слой, окрашивая его в фиолетовый цвет.

Эту реакцию дают и некоторые примеси, которые переходят в исследуемый экстракт, при выделении морфина из биологического материала. Поэтому реакцию с HIO_3 можно применить для обнаружения морфина в препарате и смесях лекарственных веществ, а также в хорошо очищенных вытяжках из биологического материала.

Реакция с гексацианоферратом (Ш) калия и хлоридом железа (Ш). К водному раствору исследуемого вещества прибавляют несколько капель смеси растворов гексацианоферрата (III) калия и хлорида железа (III). При наличии морфина появляется синяя окраска или такого же цвета осадок.

Эту реакцию дают и некоторые примеси, которые из биологического материала переходят в алкалоидные вытяжки. Поэтому реакцию с гексацианоферратом (III) калия применяют для обнаружения морфина в лекарственных смесях и в хорошо очищенных вытяжках из биологического материала.

Обнаружение морфина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор морфина в этиловом спирте имеет максимум поглощения при 287 нм. В 0,1 н. растворе гидроксида натрия максимумы поглощения морфина наблюдаются при длинах волн, равных 250 и 296 нм. В 0,1 н. растворе серной кислоты морфин имеет максимум поглощения при 284 нм. Водные растворы гидрохлорида и сульфата морфина имеют максимум поглощения при 285 нм.

В ИК-области спектра основание морфина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 805, 1243, 1448, и 945 см $^{-1}$.

Фотоколориметрический метод определения морфина (по В. Ф. Крамаренко).

Техника определения. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 3 мл 0,11 %-го раствора силиката калия K_2SiO_3, 4 мл воды, 2 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты и 2 мл 5 %-го раствора молибдата аммония. Через 3 мин прибавляют 2 мл исследуемого раствора и 5 мл 6 %-го раствора аммиака. Через 10 мин объем жидкости доводят водой до метки и измеряют оптическую плотность окрашенного в синий цвет раствора с помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-М (светофильтр красный, кювета 3 мм). В качестве раствора сравнения берут смесь, состоящую из 3 мл 0,11 %-го раствора силиката калия, 2 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты, 2 мл 5 %-го раствора молибдата аммония, 5 мл 6 %-го раствора аммиака и 13 мл воды.

Расчет содержания морфина в пробах производят по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика в 6 мерных колб вместимостью по 25 мл каждая вносят по 3 мл 0,11 %-го раствора силиката калия, 4 мл воды, 2 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты и 2 мл 5 %-го раствора молибдата аммония. Через 3 мин в колбы вносят соответственно по 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 и 2,0 мл стандартного раствора (в 1 мл стандартного раствора содержится 2 мг гидрохлорида морфина), а далее поступают, как указано выше. Этот метод позволяет определять от 0,2 до 4 мг морфина в пробе.

Количественное определение морфина при исследовании трупного материала.

Методика. В пробирку вместимостью 25 мл заносят 2,5 мл раствора кремнекислого калия, содержащего в 1 мл 0,4 мг кремния, 6,5 мл воды, 2 мл 0,5 н раствора соляной кислоты, 2,0 мл 5% раствора молибдата аммония, взбалтывают и через 3 мин добавляют 5 мл солянокислого реэкстракта и перемешивают, добавляют 5 мл 6% раствора гидроксида аммония и оставляют на 10 мин, доводят водой до объёма 25 мл и проводят измерение на спектрофотометре в кювете с L=1см при длине волны 737 нм против контроля реактивов. Количество морфина рассчитывают по калибровочному графику для интервала искомых концентраций основания морфина на 25 мл фотометрируемого раствора.

В случае превышения оптической плотности в анализируемом растворе величины 0,5-0,55 следует повторить количественное определение, используя для проведения реакции наименьшее количество солянокислого реэкстракта, разбавив его 0,1 н веществом соляной кислоты до 5 мл.

При проведении анализа следует строго соблюдать рекомендованные соотношения объёмов мочи, желчи, навесок органов и концентрированной соляной кислоты.

Заключение об не обнаружении морфина в печени и почках следует давать по результатам более чувствительных реакций и способов его обнаружения вследствие его наименьшей концентрации в этих органах.

3.6.2.2.2 КОДЕИН

Кодеин экстрагируется органическими растворителями из подщелоченных водных вытяжек. Максимальные количества кодеина экстрагируются при pH = 8,0.

Метаболизм. Кодеин подвергается метаболизму тремя путями. Часть кодеина связывается с глюкуроновой кислотой и выделяется из организма с мочой в виде глюкуронида. Некоторое количество кодеина подвергается О-деметилированию (образуется морфин) и N-деметилированию (образуется норкодеин). Образовавшиеся метаболиты (морфин и норкодеин) выделяется с мочой в виде глюкуронидов. Незначительная часть кодеина выделяется с мочой в несвязанном виде. Через 6 ч после поступления кодеина в кровь из организма выделяется около двух третих дозы этого алкалоида, а через 24 ч он почти полностью исчезает из организма.

Обнаружение кодеина

Реакция с реактивами группового осаждения алкалоидов. При взаимодействии кодеина с реактивами Драгендорфа, Бушарда, Майера и другими образуются осадки. Цветные реакции. Кодеин с реактивами Манделина, Марки и Фреде дает окрашенные продукты реакции, которые описаны выше.

Реакция Пеллагри. При нагревании кодеина с концентрированной соляной кислотой, а затем с концентрированной серной кислотой происходит деметоксилирование этого алкалоида и образуется апоморфин, который дает реакцию со спиртовым раствором иода. Выполнение реакции Пеллагри описано выше.

Обнаружение кодеина по УФ- и ИК-спектрам. Основание кодеина в растворе этилового спирта имеет максимум поглощения при 286 нм; в ИК-области спектра основание кодеина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1052 1268, 1500 см $^{-1}$.

Способы идентификации, позволяющие отличить кодеин от морфина. Ввиду того что морфин и кодеин являются близкими по строению алкалоидами, они дают ряд реакций с одними и теми же реактивами. Однако кодеин не дает реакций с хлоридом железа (III), с HIO_3, с гексацианоферратом (III) калия и хлоридом железа (III), которые дает морфин. Кодеин можно отличить от морфина и по светопоглощению в ИК-области спектра. Кодеин отличается от морфина и тем, что морфин не экстрагируется диэтиловым эфиром из щелочных растворов (образуется морфинат). Это свойство указанных алкалоидов используется для разделения их в ходе анализа.

Экстракционно-фотоколориметрический метод определения кодеина

Метод фотоколориметрического определения кодеина основан на реакции с тропеолином 00, при которой образуется ионный ассоциат, экстрагирующийся хлороформом:

Техника определения. 1 мл исследуемого раствора вносят в делительную воронку, прибавляют 9 мл ацетатной буферной смеси (pH = 4,6), 5 мл 0,1 %-го водного раствора тропеолина 00 и 5 мл хлороформа. Содержимое делительной воронки взбалтывают в течение 5 мин. Через 3 мин от водного слоя отделяют хлороформную вытяжку. Водный слой взбалтывают с новыми порциями

хлороформа (по 5 мл) до тех пор, пока 3-4 капли последней хлороформной вытяжки не перестанут давать окраску с 1-2 каплями 1 %-го раствора концентрированной серной кислоты в метиловом спирте. Хлороформные вытяжки соединяют и доводят хлороформом до 50 мл. К 5 мл полученного хлороформного раствора прибавляют 20 мл хлороформа и 2,5 мл 1 %-го раствора концентрированной серной кислоты в метиловом спирте. Затем измеряют оптическую плотность полученного фиолетово-красного раствора с помощью фотоэлектроколориметра (светофильтр зеленый, кювета 10 мм). В качестве раствора сравнения берут хлороформную вытяжку из смеси, совтоящей из 5 мл 0,1 %-го раствора тропеолина 00, 9 мл ацетатной буферной смеси (pH = 4,6) и 1 мл воды. К полученной хлороформной вытяжке прибавляют 2,5 мл 1 %-го раствора концентрированной серной кислоты в метиловом спирте.

Расчет содержания кодеина в пробе производят по калибровочному графику. Для построения калибровочного графика берут делительные воронки, в которые вносят по 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1 мл стандартного раствора (в 1 мл содержится 2 мг фосфата кодеина). В первые 5 делительных воронок прибавляют воду до 1 мл. Затем во все делительные воронки вносят по 9 мл ацетатной буферной смеси (pH = 4,6), по 5 мл 0,1 %-го раствора тропеолина 00 и поступают, как указано выше.

С помощью этого метода можно определить от 0,2 до 2,0 мг кодеина в пробе.

3.6.2.2.3 ПАПАВЕРИН

Метаболизм. Метаболизм папаверина происходит главным образом путем деметилирования. При этом образуются фенольные соединения, которые выделяются с мочой в виде глюкуронидов.

Обнаружение папаверина Реакции с реактивами группового осаждения. Папаверин образует осадки с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Цветные реакции. Папаверин дает реакции с реактивами Манделина, Марки, Фреде и Эрдмана.

Реакция с хлоридом кадмия. На предметное стекло наносят несколько капель исследуемого раствора и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю 0,1 н. раствора соляной кислоты. Рядом наносят каплю 10 %-го раствора хлорида кадмия, а затем соединяют эти растворы. При наличии папаверина появляются сростки из тонких пластинок, имеющих форму куба.

Обнаружение папаверина по УФ- и ИК-спектрам. Основание папаверина в 1 и. растворе соляной кислоты имеет максимум поглощения при 250, 284 и 310 нм. Раствор папаверина в 1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 250. 254 и 310 нм. В ИК-области спектра основание папаверина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1507, 1068 и 1273 см- [1].

3.6.2.2.4 АТРОПИН

Атропин является алкалоидом, содержащимся в белладонне, скополии и в некоторых других растениях. Атропин представляет собой сложный эфир тропина и троповой кислоты. Стереоизомером атропина является гиосциамин,

вращающий плоскость поляризации влево. Под влиянием щелочей и температуры левовращающий гиосциамин превращается в атропин, который оптически неактивен. Он состоит из активного левовращающего и малоактивного правовращающего изомеров. В растениях в основном содержится гиосциамин, а при выделении его из растительного материала он превращается в рацемическую форму - атропин.

Атропин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества атропина экстрагируются при pH = 9...11 (О. А. Акопян).

Атропин быстро всасывается через слизистые оболочки, кожу, кишки (но не через желудок). Принятая доза атропина почти полностью всасывается в тонкой кишке в течение двух часов. Примерно половина поступившего в организм атропина циркулирует в крови, а вторая - связывается с белками плазмы.

Метаболизм. Атропин разлагается в организме на тропин и троповую кислоту. Однако это разложение не является основным путем метаболизма атропина. Об этом свидетельствует то, что только около 2 % троповой кислоты выделяется с мочой. В моче обнаружено 3, а в печени 4 метаболита атропина, которые не идентифицированы. Около 50 % введенного в организм атропина выделяется с мочой в неизмененном виде. Обнаружение атропина

Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Атропин дает осадки с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Майера.

Реакция Витали - Морена. Выполнение реакции. В фарфоровую чашку вносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества и при комнатной температуре выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты, жидкость на кипящей водяной бане выпаривают досуха. При этом сухой остаток приобретает желтую окраску. К сухому остатку с одной стороны помещают 3-5 капель ацетона, а с другой - 1-2 капли 10 %-го спиртового раствора гидроксида калия. При соприкосновении указанных растворов с сухим остатком появляется быстроисчезающая фиолетовая окраска. Появление этой окраски указывает на наличие атропина в исследуемом растворе. Предел обнаружения: 1 мкг атропина в пробе.

Кроме атропина эту реакцию дают: гиосциамин, скополамин, вератрин, стрихнин и другие вещества. При наличии перечисленных веществ окраска имеет несколько иной оттенок и исчезает быстрее, чем окраска атропина.

Реакция с п -диметиламинобензальдегидом и серной кислотой используется главным образом для обнаружения атропина в лекарственных смесях и для отличия этого алкалоида от кокаина.

К 2-3 каплям исследуемого раствора прибавляют 3-5 капель 0,5 %-го раствора п -диметиламинобензальдегида в концентрированной серной кислоте. Жидкость взбалтывают, а затем нагревают на кипящей водяной бане 5-10 мин. При наличии атропина появляется красная окраска, которая переходит в вишнево-красную, а затем в фиолетовую. Эту реакцию дают гиосциамин и скополамин. При наличии морфина и кодеина появляется

красная окраска, которая не переходит в фиолетовую. Кокаин не дает окраски с п -диметиламинобензальдегидом.

Реакция с солью Рейнеке. Сухой остаток исследуемого вещества растворяют в капле 0,1 н. раствора соляной кислоты. Рядом с полученным раствором помещают каплю свежеприготовленного 1 %-го раствора соли Рейнеке (Аммоний тетратиоцианатодиамминхромат (III), 1-водный). При соединении этих растворов образуется сиреневого цвета аморфный осадок, быстро переходящий в кристаллический. Образование сростков кристаллов с ромбовидными концами указывает на наличие атропина в пробе. Предел обнаружения: 0,1 мкг атропина в пробе.

Реакция с пикриновой кислотой. Атропин с 0,5 %-м раствором пикриновой кислоты дает светло-желтый кристаллический осадок в виде пластинок или сростков из них. Этот осадок появляется через 15—20 мин. Реакцию с пикриновой кислотой выполняют так, как и с солью Рейнеке. Предел обнаружения: 5 мкг атропина в пробе.

Обнаружение атропина по УФ- и ИК-спектрам. Атропин в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 252, 258 и 264 нм; в ИК-области спектра основание атропина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1720, 1035 и 1153 см $^{-1}$.

3.6.2.2.5 СКОПОЛАМИН

Скополамин (гиосцин) является алкалоидом, содержащимся в отдельных видах дурмана, скополии и др. Скополамин является сложным эфиром скопина и троповой кислоты. Этот алкалоид оптически активен (левовращающий). В медицине применяется гидробромид скополамина.

Скополамин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества скополамина экстрагируются при pH = 8...10.

Метаболизм. Скополамин легко всасывается через пищеварительный тракт. Поступивший в организм скополамин связывается с белками плазмы крови, а небольшое количество принятой дозы подвергается гидролизу. Основное количество скополамина разлагается в печени и выводится из организма с мочой.

Обнаружение скополамина

Скополамин дает большинство реакций, которые используются для обнаружения атропина (реакция Витали - Морена, реакция с п -диметиламинобензальдегидом и солью Рейнеке).

Скополамин и атропин можно отличить друг от друга при, помощи реакции образования бромаурата скополамина, а также при помощи метода хроматографии и на основании спектров в ИК-области.

Обнаружение скополамина по УФ- и ИК-спектрам. Основание скополамина в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 251, 257 и 263 нм; в ИК-области спектра основание скополамина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1725, 1041, 1165 и 1060 см $^{-1}$.

3.6.2.2.6 КОКАИН

Кокаин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества кокаина экстрагируются хлороформом при pH = 7,0...8,5. Этот алкалоид в меньших количествах экстрагируется и из слабокислых растворов.

Метаболизм. Кокаин в основном метаболизируется в печени. Образующиеся при этом метаболиты выделяются с мочой. При гидролизе кокаина образуется метиловый спирт и бензоилэкгонин, который превращается в экгонин и бензойную кислоту. Экгонин быстро разлагается в организме, поэтому его трудно обнаружить в моче.

Обнаружение кокаина

Реакция с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Кокаин дает осадки с реактивами Майера, Бушарда, Драгендорфа, пикриновой кислотой.

Реакция с перманганатом калия. Несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества наносят на предметное стекло и при комнатной температуре выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в одной капле 10%-го раствора соляной кислоты. Этот раствор тоже выпаривают досуха. К сухому остатку снова прибавляют каплю 10%-го раствора соляной кислоты и выпаривают досуха. Затем к сухому остатку прибавляют каплю 1 %-го раствора перманганата калия. При наличии кокаина через 10-20 мин появляются красно-фиолетовые кристаллы, имеющие форму прямоугольных пластинок и сростков из них. Если вместо указанной формы кристаллов образуются кристаллы, имеющие форму розеток или другую форму, то жидкость с кристаллами осторожно перемешивают концом оплавленного стеклянного капилляра, а затем снова прибавляют каплю 1 %-го раствора перманганата калия и через 15-20 мин форму кристаллов рассматривают под микроскопом. Предел обнаружения: 4 мкг кокаина в пробе.

С перманганатом калия кристаллические осадки дают скополамин, аконитин, тропакокаин, котарнин, берберин и гидрастин. Однако форма кристаллов этих веществ с перманганатом калия отличается от формы кристаллов кокаина с указанным реактивом.

Обнаружение кокаина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор кокаина в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 230, 274 и 281 нм. Кокаин в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 233 и 275 нм, а также изгиб при 281 нм. В ИК-области спектра основание кокаина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1275, 1700, 1106 и 1728 см $^{-1}$.

3.6.2.2.7 СТРИХНИН

Стрихнин принадлежит к числу алкалоидов, являющихся производными индола.

Стрихнин экстрагируется органическими растворителями как из кислых, так и из щелочных водных растворов. Однако большее количество этого алкалоида экстрагируется из щелочных водных растворов.

Стрихнин оказывает сильное ядовитое действие на организм. После поступления в организм токсических доз стрихнина быстро появляются

признаки отравления этим алкалоидом. Наступают часто повторяющиеся судороги, а затем наступает смерть (при явлениях асфиксии). Особенно опасен стрихнин для лиц, страдающих сердечными заболеваниями, заболеваниями печени, почек, а также для детей.

Метаболизм. Стрихнин быстро всасывается из пищевого канала, легко проникает в кровь через слизистые оболочки и неповрежденную кожу. Около 80 % дозы стрихнина метаболизируется в печени. Остальное количество этого алкалоида медленно выделяется с мочой в неизмененном виде. Из-за медленного выделения неизмененного стрихнина из организма может наступить кумулятивное действие этого алкалоида.

Метаболиты стрихнина изучены недостаточно. Однако установлено, что в организме образуется 4 метаболита стрихнина, один из которых имеет фенольный характер. Все метаболиты стрихнина не идентифицированы. Неподвергшийся метаболизму стрихнин, оставшийся в трупе после смерти, является стойким. Его можно обнаружить в эксгумированных трупах через несколько лет после смерти.

Обнаружение стрихнина

Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов.

Стрихнин дает осадки с реактивом Драгендорфа, Майера, Шейблера, Зонненшейна, пикриновой кислотой.

Реакция с дихроматом калия и серной кислотой. В фарфоровую чашку вносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю концентрированной серной кислоты. Во избежание обугливания сухого остатка концентрированной серной кислотой вместо нее к остатку прибавляют каплю смеси концентрированной серной кислоты и воды (5 : 1). Содержимое фарфоровой чашки хорошо перемешивают стеклянной палочкой, а затем прибавляют кристаллик дихромата калия, который передвигают в растворе стеклянной палочкой. При наличии стрихнина появляется синяя окраска в виде струек. Через некоторое время эта окраска переходит в фиолетовую, красную, а затем окраска исчезает. Предел обнаружения: 1 мкг стрихнина в пробе.

Этой реакции мешают морфин, бруцин, хинин, азотная кислота и др.

Реакция с ванадатом аммония и серной кислотой. Реактив Манделина (раствор ванадата аммония в концентрированной серной кислоте) со стрихнином дает сине-фиолетовую окраску, которая переходит в красную. Этой реакции мешает большой избыток кислоты.

Реакция Витали - Морена. Стрихнин дает реакцию Витали - Морена, выполнение которой описано выше. При этой реакции стрихнин дает красно-фиолетовую окраску, а атропин - фиолетовую.

Обнаружение стрихнина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор стрихнина в этиловом спирте имеет максимум поглощения при 255 нм. При такой же длине волны стрихнин имеет максимум поглощения и в 0,1 н. растворе серной кислоты. В ИК-области спектра основание стрихнина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1664, 764, 1392 и 1480 см $^{-1}$.

Обнаружение стрихнина в присутствии бруцина. Выполнению реакции на стрихнин с концентрированной серной кислотой и дихроматом калия мешает бруцин. Разделить эти алкалоиды методом экстракции очень трудно. Поэтому при наличии смеси стрихнина и бруцина последний разрушают серной и азотной кислотами, затем стрихнин экстрагируют эфиром и проводят реакцию с концентрированной серной кислотой и дихроматом калия. Исследуемый раствор выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл разбавленной серной кислоты. К полученному раствору прибавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и оставляют на несколько часов. После этого жидкость подщелачивают раствором гидроксида натрия и взбалтывают с диэтиловым эфиром (2 раза по 5 мл). Эфирные вытяжки соединяют, выпаривают досуха, а затем в полученном остатке определяют наличие стрихнина при помощи реакции с дихроматом калия и серной кислотой.

3.6.2.2.7 ПАХИКАРПИН

Пахикарпин - алкалоид, содержится в надземных частях софоры толстоплодной. В меньших количествах пахикарпин содержится в листьях термопсиса ланцетовидного и в некоторых других растениях. В указанных растениях кроме пахикарпина содержится спартеин, являющийся стереоизомером пахикарпина. Спартеин является лево-вращающим, а пахикарпин - правовращающим алкалоидом.

Пахикарпин и спартеин представляют собой почти бесцветные густые маслообразные жидкости, быстро темнеющие и осмоляющиеся на воздухе. В медицине применяется гидроиодид пахикарпина.

Пахикарпин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества этого алкалоида экстрагируются хлороформом при pH = 9,8...10,8. Однако меньшие количества пахикарпина экстрагируются органическими растворителями и из кислых растворов.

Пахикарпин не кумулируется в организме. Уже через 6 ч после приема пахикарпина его можно обнаружить в неизмененном виде в моче. За сутки пахикарпин почти полностью выводится из организма. В результате приема больших доз пахикарпина могут быть отравления, признаки которых появляются через 1-3 ч. Наступает тошнота, рвота, головокружение, затрудненное дыхание, помрачнение сознания. Отмечается расширение зрачков, цианоз, могут появиться судороги и др. Смерть наступает от асфиксии. Обнаружение пахикарпина.

Реакция с реактивом Бушарда. На предметное стекло наносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества, который при комнатной температуре выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1-2 каплях 0,1 н. раствора соляной кислоты. К полученному раствору прибавляют 1-2 капли реактива Бушарда. При наличии пахикарпина в растворе через 5- 10 мин (при малых количествах этого препарата через 30 - 40 мин) по краям жидкости появляются сростки из золотисто-желтых или золотисто-зеленых кристаллов, по форме напоминающих дубовые листья. Предел обнаружения: 3,5 мкг пахикарпина в пробе.

Реакция с роданидом кобальта. Пахикарпин с роданидом кобальта дает кристаллический осадок.

Выполнение реакции. На предметное стекло наносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества, который выпаривают при комнатной температуре. К сухому остатку прибавляют 1-2 капли 0,1 н. раствора соляной кислоты и такой же объем реактива. В присутствии пахикарпина образуются сростки из голубых призматических кристаллов. При стоянии эти кристаллы становятся более крупными и приобретают вид ветвистых дендритов. Предел обнаружения: 1,5 мкг пахикарпина в пробе.

Приготовление реактива. Роданид кобальта (раствор). Смешивают 1 г нитрата кобальта (II) и 4 г роданида калия. Смесь этих веществ растворяют в 20 мл воды.

Реакция с пикриновой кислотой. Пахикарпин с 0,5 %-м раствором пикриновой кислоты образует кристаллический осадок (сростки из желто-зеленых призматических кристаллов). Предел обнаружения: 5 мкг пахикарпина в пробе. Эта реакция выполняется так, как и предыдущая.

3.6.2.2.7 ЭФЕДРИН

Эфедрин (1-фенил-2-метиламинопропанола-1-гидрохлорид) относится к ациклическим алкалоидам, в молекуле которых аминогруппа находится в боковой цепи. Эфедрин и его стереоизомер псевдоэфедрин находится в некоторых видах эфедры. Однако имеются виды эфедры, не содержащие ни эфедрина, ни псевдоэфедрина. Эфедрин также содержится в тиссе ягодном и в некоторых других растениях.

Учитывая большую потребность в эфедрине, его получают и синтетическим путем. Находящийся в растениях эфедрин является левовращающим, а синтетический - правовращающим. К числу синтетических препаратов относится эфетонин, являющийся рацематом эфедрина.

Эфедрин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Метаболизм. Эфедрин быстро всасывается из пищевого канала и накапливается в печени, почках, легких и мозге. Через 24 ч 80 % принятой дозы эфедрина выделяется из организма с мочой в неизмененном виде. Незначительная часть дозы эфедрина подвергается N-деметилированию с образованием фенилпропанол-амина. Этот метаболит эфедрина выделяется из организма с мочой.

Обнаружение эфедрина

Реакция с солями меди и сероуглеродом. Выполнение реакции. В микропробирку вносят каплю раствора исследуемого вещества, подкисленного уксусной кислотой, прибавляют каплю 5 %-го раствора сульфата меди, а затем аммиак до щелочной реакции. К полученному раствору прибавляют 2 капли смеси сероуглерода и бензола (1:3) и взбалтывают. При наличии эфедрина бензольный слой приобретает коричневую или желтую окраску. Предел обнаружения: 2 мкг эфедрина в пробе. Эту реакцию дает и кониин.

Реакция с 2,4-Динитрохлорбензолом. Выполнение реакции, В микропробирку вносят каплю эфирного раствора исследуемого вещества,

прибавляют каплю 5 н. раствора гидроксида натрия и каплю 5 %-го спиртового раствора 2,4-динитрохлорбензола. Жидкость нагревают на водяной бане в течение 5 мин. При наличии эфедрина в растворе появляется желто-коричневая окраска. Если к охлажденному раствору прибавить 1-2 капли хлороформа и несколько капель разбавленной уксусной кислоты, а затем взболтать, то хлороформный слой приобретает желтую окраску. Предел обнаружения: 5 мкг эфедрина в пробе.

Реакция с реактивом Драгендорфа

Сухой остаток на предметном стекле растворяют в 1 капле 0,1 моль/л раствора хлороводородной кислоты и добавляют 1 каплю реактива Драгендорфа. Через 10 – 15 мин под микроскопом наблюдают пучки из тонких игольчатых кристаллов и пластинки неправильной формы тёмно–коричневого цвета. Открываемый минимум 15,6 мкг.

Обнаружение эфедрина по УФ- и ИК-спектрам. Основание эфедрина, растворенное в 0,1 н. растворе серной кислоты, имеет максимумы поглощения при 251, 256 и 262 нм; в ИК-области спектра основание эфедрина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 703, 1455 и 745 см $^{-1}$.

3.6.2.2.8 АМИНАЗИН

Аминазин экстрагируется органическими растворителями из щелочных растворов. Метаболизм. Метаболизм аминазина довольно сложный. При метаболизме происходит гидроксилирование, сульфоокисление, N-деметилирование, разрыв боковой цепи и другие изменения в молекулах аминазина. По данным литературы, до настоящего времени выделено около 20 метаболитов аминазина. Главными метаболитами аминазина у человека являются: 7-оксипроизводное этого препарата, десмонометиламиназин и соответствующие сульфоксиды указанных метаболитов. Перечисленные выше метаболиты выделяются с мочой. Некоторое количество этих метаболитов выделяется с мочой в виде конъюгатов с сульфатами и глюкуроновой кислотой. С мочой выделяется и часть неизмененного аминазина. В моче был найден еще ряд метаболитов, которые до сих пор не идентифицированы.

Обнаружение аминазина

Реакция с концентрированной серной кислотой. Аминазин с концентрированной серной кислотой дает пурпурно-красную окраску.

Реакция с концентрированной азотной кислотой. При взаимодействии аминазина с концентрированной азотной кислотой возникает пурпурно-фиолетовая окраска.

Реакция с концентрированной соляной кислотой. Аминазин с концентрированной соляной кислотой дает розовато-фиолетовую, переходящую в красно-фиолетовую окраску.

Реакция с реактивом Марки. Аминазин под влиянием реактива Марки приобретает пурпурную окраску.

Реакция с реактивом Манделина. Аминазин с этим реактивом дает зеленую окраску, переходящую в пурпурную.

Обнаружение аминазина по УФ- и ИК-спектрам. Аминазин в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 255 и 307 нм. Сульфоксид аминазина, являющийся метаболитом этого препарата, в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 239, 274, 300 и 341 нм.

В ИК-области спектра основание аминазина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1561, 1455, 1402, 1240, 747 см $^{-1}$.

Количественное определение аминазина и его метаболитов. Спектрофотометрическое обнаружение. Ультрафиолетовый спектр снимается в диапазоне длин волн 220-400 нм при концентрации 10 мкг/мл в пересчете на основание.

Максимумы абсорбции неизмененного аминазина при λ = 254- 255 нм (макс.) и λ = 300-305 нм (мин). Неизмененный аминазин обычно обнаруживается в желудке и желудочно-кишечном тракте и их содержимом. Основной метаболит - сульфоксид - имеет максимумы абсорбции при длинах волн 238-240, 273; 298 и 340 нм. Химико-токсикологическим анализом по описанной методике обнаруживается 53-60% аминазина, добавленного к органам.

Расчет содержания аминазина и его метаболитов производится по калибровочному графику.

Граница обнаружения 0,2 мг, граница определения 0,5 мг аминазина в 100 г органов.

Производные фенотиазина обладают кумулятивными свойствами н длительно выводятся из организма. Терапевтическая доза 50 мг выводится в течение 14-20 дней. Смертельные случаи могут наблюдаться при приемах обычных терапевтических доз.

В трупном материале аминазин сохраняется (при температуре -2°+13°) до 3 месяцев. Консервирование этиловым спиртом пролонгирует сохраняемость аминазина в трупном материале.

3.6.2.2.9 ДИПРАЗИН

Дипразин экстрагируется органическими растворителями из щелочной среды.

Метаболизм. Главным метаболитом дипразина является сульфоксид этого препарата. Часть дипразина в неизмененном виде выделяется е мочой. Кроме этого, с мочой выделяется и сульфоксид дипразина, который можно обнаружить в моче даже через 14 суток после приема указанного препарата.

Обнаружение дипразина по УФ- и ИК-спектрам. Дипразин, растворенный в смеси воды и этилового спирта (1:1), имеет максимумы поглощения при длинах волн, равных 252 и 301 нм; в 0,01 н. растворе соляной кислоты имеет максимум поглощения при 249 и около 300 нм; в ИК-области спектра дипразин (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1459, 1222 и 757 см $^{-1}$.

3.6.2.2.10 ТИЗЕРЦИН

Тизерцин (левомепромазин. левопромазин, метотримепразин и др.)

Тизерцин экстрагируется органическими растворителями из щелочных растворов.

Метаболизм. Часть принятой дозы тизерцина выделяется из организма с мочой в неизмененном виде. Около 10 % тизерцина выделяется с мочой в виде сульфоксида или глюкуронида. Некоторое количество тизерцина выделяется с калом в неизмененном виде.

Выделение тизерцина из биологического материала. Тизерцин выделяется из биологического материала так, как и аминазин.

Обнаружение тизерцина методом хроматографии. Хроматографирование в насыщенной парами системы растворителей (смесь раствора аммиака и этилового спирта (1 : 1), этилацетата и ацетона (4:90:45). После хроматографирования пятна тизерцина на пластинках проявляют 50 %-м раствором серной кислоты в этиловом спирте. Затем пластинку на 3-5 мин помещают в сушильный шкаф, нагретый до 100 °С.

Обнаружение тизерцина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор тизерцина в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 255 и 310 нм; тизерцин в 0,1 н. растворе соляной кислоты имеет максимумы поглощения при 251 и 302 нм. В ИК-области спектра основание тизерцина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1587, 1460, 1269 и 1446 см $^{-1}$.

3.6.2.2.11 ДИОНИН

Дионин (гидрохлорид этилморфина) получают синтетическим путем из морфина.

Дионин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Обнаружение дионина Для обнаружения дионина применяют цветные и микрокристаллоскопические реакции, а также метод спектроскопии.

Обнаружение этилморфина по УФ-спектру. Этилморфин в 0,2 н. растворе серной кислоты имеет максимум поглощения при 285 нм и изгиб при 277 нм.

Отличие этилморфина от морфина. Этилморфин не дает реак ции с хлоридом железа (III), иодноватой кислотой (HIO_3) и гексацианоферратом (III) калия, которые дает морфин.

3.6.2.2.12 ПРОМЕДОЛ

Промедол (тримеперидин) - 1,2,5-триметил-4-пропионилокси-4-фенилпиперидина гидрохлорид.

Промедол экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимум экстракции промедола органическими растворителями достигается при pH = 6,9...8,5. Однако этот препарат в меньших количествах экстрагируется и из кислых растворов.

Обнаружение промедола

Для обнаружения промедола в химико-токсикологическом анализе применяется ограниченное число реакций и методов. Однако сочетание этих методов позволяет обнаружить промедол в вытяжке из биологического материала.

Обнаружение героина и 6-ацетилморфина

Диаморфин (героин, 3,6-О-диацетилморфин)

Диаморфин быстро гидролизуется *in vivo* с образованием 6-ацетилморфина и затем морфина. Морфин, кроме того, является метаболитом кодеина. Приблизительно 5 % дозы морфина метаболизируется с образованием норморфина, но основной метаболический путь представляет собой конъюгацию с глюкуроновой кислотой. Основным продуктом является морфин-3-глюкуронид, но образуется также и морфин-6-глюкуронид. Свободный морфин в моче составляет примерно 10 % принятой дозы, тогда как на долю морфин-3-глюкуронида приходится 75 %.

3.6.2.2.13 Тропикамид. Химическое название: N-Этил-2-фенил-N-(4-пиридилметил) гидракриламид. Синонимы: Мидриацил, Мидрум.

Тропикамид подобен по действию другим м-холинолитическим препаратам, например, таким как атропин. При передозировке тропикамида возникают клинические симптомы, которые проявляются в течение часа после приема: возбуждение, атаксия, спутанность сознания, делирий, галлюцинации, возможны сонливость, угнетение дыхания и кома, иногда отравления могут сопровождаться эпилептическими припадками. Тропикамид наркотическим эффектом не обладает, но способен пролонгировать действие опиатов. В последнее время тропикамид стали применять как самостоятельное средство для одурманивания. У наркоманов, употребляющих тропикамид, кожа в течение считанных недель становится цвета жёлтого воска, гемоглобин падает до 32 г/л.

Лучшим органическим растворителем для извлечения тропикамида методом жидкость-жидкостной экстракции является хлороформ.

Отравления тропикамидом зачастую происходят в сочетании с другими веществами (в том числе с алкалоидами опия), поэтому необходимо использовать общие методы изолирования. Выход тропикамида при изолировании подкисленной водой (Швайкова М.Д., 1975) в среднем составляет 26,4%, изолирование нейтральным ацетоном (Карташов В.А. и соавт.1988) до 60% и методом кислотного гидролиза, применяемого для изолирования алкалоидов опия, лишь 18%. Однако, этот метод дает возможность использования его в случае комбинированных отравлений с алкалоидами опия.

Оптимальным элюентом при очистке экстрактов в тонком слое сорбента для тропикамида является 0,1 н. раствор соляной кислоты и спирт этиловый 96%. Использование этих растворителей позволяет элюировать тропикамид до 69,8 и 86,8% соответственно.

Для идентификации тропикамида использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ), спектрофотометрию (СФМ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), газо-жидкостную хроматографию с масс-селективным детектором (ГЖХ-МС).

Рекомендуемые подвижные фазы для ТСХ исследование: В эксперименте использовали следующие системы:

Ацетон – 25% аммиак (9:1); ацетон – хлороформ (9:1); ацетон – гексан – диэтиламин (10:10:1); хлороформ – ацетон – 25% аммиак (15:15:1);

диэтиловый эфир – ацетон – 25% аммиак (10:1:0,1); бензол –96% этанол – диэтиламин (9:1:1); хлороформ – 96% этанол – 25% аммиак (80:20:4); ацетон (100%) без насыщения; этилацетат-метанол- 25% аммиак (85:10:5).

Детектирующий реагент реактив Драгендорфа.

В случае комбинированных отравлений тропикамидом с алкалоидами опия для разделения веществ целесообразно использовать подвижную фазу этилацетат - метанол – 25% раствор аммиака (17:2:1), где значение Rf для тропикамида составляет 0,74; морфин 0,33кодеин 0,47, а также систему бензол-этанол-диэтиламин (9:1:1) 0,67; 0,39; 0,53 соответственно.

Спектрофотометрическое исследование в диапазоне от 200 до 400 нм. Спектральные характеристики снимаются в нейтральной, кислой и щелочной средах, с добавлением к спиртовому раствору тропикамида 6н. соляной кислоты или 10% спиртового раствора гидроксида натрия.

Тропикамид имеет максимумы поглощения при длинах волн 210 нм, 255-258 нм. В спектрах поглощения тропикамида в нейтральной, кислой и щелочной средах наблюдаются незначительные изменения: сдвиг в длинноволновую область (212, 258 нм) – в щелочной среде и незначительный гипсохромный сдвиг в кислой среде – 204, 254 нм. Удельный показатель поглощения тропикамида в 0,1н. соляной кислоте Е 1% в 1 см=180. (Аляутдин Р.Н. и соавт., 2007).

3.6.2.2.14 АНАПРИЛИН (Anaprilin). Активное действующее вещество Пропранолол.

Химическое название: 1 -[(1 -метилэтил)амино]-3-(1 -нафталенилокси)-2-пропанол (и в виде гидрохлорида). Брутто-формула: C16H21NO2. Биодоступность 3-40%. Связывание с белка-ми 90-95%. В печени связывается с глюкуранидами, выводится почками в неизменном виде около 1%, период полувыведения T½ 2-5 часов.

Изолирование проводится при pH среды 9-10. Наилучшими растворителями являются хлороформ, ацетон и метиленхлорид.

Метод хроматографирования в тонком слое сорбента на пластинках

Рекомендуемые подвижные фазы:

1. эфир:ацетон:25% аммиак=40:20:1 (0,7)
2. толуол:изопропиловый спирт:25% аммиак=5:4:1(0,8)
3. толуол:этанол:диэтиламин=9:1:1(0,6)
4. хлороформ:метанол=8,5:1,5 (0,4)
5. н-бутанол:этанол:25% аммиак=5:1:5 (0,4)
6. этилацетат:ацетон:25% аммиак=50:45:5 (0,5)
7. бензол:диоксан:25% аммиак=60:35:5 (0,8)
8. н-бутанол:уксусная кислота конц.:вода=4:1:1. (0,8)

Детектирующие реагенты:

1) реактивом Драгендорфа, оранжевое (также и для атенолола, бисопролола, метопролола);

2) H_2SO_4 конц., (оранжевое с зеленым ободком, переходящее в зеленое);

3) HNO_3 конц., (зеленое, переходящее в желтое);

4) реактивом Манделина, зеленое (атенолол- проявляется со временем серо-сиреневое, бисопролол- малиновое, метопролол проявляется со временем сиреневое;

5) реактивом Либермана, зеленое (атенолол-проявляется со временем серо-сиреневое; бисопролол- малиновое; метопролол-проявляется со временем сиреневое);

6) реактивом Фреде, коричневое, переходящее в зеленое (бисопролол-сиреневое);

7) реактивом Марки, коричневое, переходящее в зеленое (бисопролол-сиреневое);

8) 0,3 М раствором $CuSO_4$, подкисленным H_2SO_4, затем 0,3 М раствор KI, коричневое (также и для атенолола, бисопролола, метопролола);

9) 2% раствор $KMnO_4$ (желтое на розовом фоне) (также и для атенолола, бисопролола, метопролола).

Метопролол и бисопролол можно дифференцировать по проявлению реактивами Манделина и Либермана, в которых бисопролол дает пятно малинового цвета, метопролол проявляется со временем пятном сиреневого цвета.

3.6.2.2.15 Амфетамин и его структурные аналоги.

Терапевтическими концетрациями амфетамина и метамфетамина в плазме крови считаются 0,05-0,15 мг/л и 0,01-0,05 мг/л, токсическими –0,2-1,0 мг/л и 0,2-1,0 мг/л соответственно.

В организме человека амфетамин подвергается гидроксилированию и деметилированию с образованием п-гидроксиамфетамина, норэфедрина, п-гидроксинорэфедрина; деаминированию с образованием фенилацетона (МБК) и гиппуровой кислоты, а также коньюгации конечных продуктов окисления с глицином и глюкуроновой кислотой (рис.1).

Метаболизм метамфетамина сводится прежде всего к деметилированию с образованием амфетамина с последующим окислением

Метилендиоксипроизводные амфетамина:

МДА (тенам-фетамин)- 3,4-метилендиоксиамфетамин;

МДМА- D,L-3,4-метилендиокси-N-альфа-диметилфенилэтиламин;

N-ЭТИЛ-МДА- D,L-N-этил-альфаметил- 3,4- (метилендиокси)-фенетиламин;

N-гидрокси-МДА-N-гидрокси-3,4-метилендиоксиамфетамин;

БДБ - L-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин;

МБДБ N-метил-1-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин;

ММДА 2-метокси-а-4-метил-4,5-(метилендиокси)-фенетиламин;

Терапевтические концентации МДМА в плазме крови составляют от 0,1-до 0,35 мг/л, токсические – 0,5 мг/л и более.

Для проведения химико-токсикологического (судебно-химического) исследования изымаются кровь, моча, промывные воды и рвотные массы больного, а в случае летального исхода – биожидкости и биоткани трупа.

Наиболее ценным объектом, с точки зрения эксперта-химика, является моча.

Наряду с этим на химическое исследование доставляются объекты небиологического происхождения, так называемые вещественные доказательства, к числу которых относятся порошки, таблетки, ампулированные растворы, шприцы с остатками жидкости, растительное сырье и другие, которые нередко обнаруживаются на месте происшествия оперативно-следственными работниками, врачами скорой помощи или родственниками пострадавшего.

Выделение. *Биожидкости (кровь, моча, промывные воды желудка, содержимое желудка).*

Кровь.10-20 мл крови центрифугируют. Центрифугат переносят в делительную воронку вместимостью 50 мл, добавляют 25% раствор гидроксида аммония до pH=10-11 и трижды экстрагируют смесью хлороформ-н-бутанол (9:1) по 10 мл 10 минут. Органическую фазу отделяют, фильтруя через бумажный фильтр, на который помещен 1 г безводного сульфата натрия. Фильтраты объединяют, добавляют 100 мкл 5% раствора соляной кислоты (для предотвращения потери летучих оснований на стадии выпаривании) и смесь испаряют до объема 0,5-1,0 мл.

Моча. 50 мл мочи переносят в делительную воронку, добавляют 25% раствор гидроксида аммония до pH=10-11 и далее проводят экстракцию смесью хлороформ:н-бутанол (9:1) и далее поступают как и при исследовании крови.

Промывные воды желудка и содержимое желудка.10-100 мл объекта исследования отделяют от остатков пищи фильтрованием. Фильтрат переносят в делительную воронку, добавляют раствор соляной кислоты до pH=1-2 и трижды экстрагируют диэтиловым эфиром по 5-20 мл. Эфирные извлечения отделяют и, если требуется, исследуют на присутствие веществ кислого и нейтрального характера (барбитураты, ноксирон и др.). Водный раствор в делительной воронке и подщелачивают 25% раствором гидроксида аммония до pH=10-11 и далее поступают, как и при исследовании крови.

*Биоткани.*Для выделения амфетаминов из биотканей применяются методы изолирования подкисленной водой или подкисленным спиртом.

Оптимальными условиями жидко-жидкостной экстракции амфетаминов из биосред и биотканей являются – щелочная реакция среды (pH=9-12) и использование в качестве экстрагента хлорированных углеводородов (хлороформа, н-бутилхлорида, дихлорметана, дихлорэтана), диэтилового эфира, этилацетата, бутилацетата, циклогексана, бензола и др.

Хроматография в тонком слое сорбента.

5-10 мкл извлечения исследуют методом одномерной восходящей хроматографии на пластинках «Силуфол УФ254» или «Сорбфил ПТСХ-ПА-УФ». Детекция амфетаминов на пластинках осуществляется реактивом Марки (метод пипетирования), 1% раствором нингидрина в ацетоне или реактивом Драгендорфа в модификации по Мунье и 0,5% раствором йодплатината калия (для пластинок «Сорбфил»).

Для разделения и идентификации амфетаминов чаще всего применяются многокомпонентные системы растворителей:

1) метанол-25% раствор гидроксида аммония (100:1,5),

2) бензол-этанол-диэтиламин ((9:1:1),

3) этанол-этилацетат-25% раствор гидроксида аммония (40:10:5),

4) хлороформ-ацетон-25% раствор гидроксида аммония (50:50:1),

5) метилэтилкетон-диметилформамид-25% раствор гидроксида аммония - изопропанол (130:19:1:30),

6) этилацетат-изопропанол-25% раствор гидроксида аммония (5:5:1),

7) гексан-ацетон-25% раствор гидроксида аммония (2:2:0,2).

В таблице 1 Приложения 7 представлены значения Rf и Rs некоторых амфетаминов в двух системах растворителей (№ 6 и № 7) на пластинках «Силуфол УФ 254».

Ультрафиолетовая спектроскопия.

0,1-0,2 мл извлечения испаряют досуха, остаток растворяют в 4 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и снимают УФ спектр поглощения полученного раствора в кварцевой кювете с толщиной измеряемого слоя 10 мм на спектрофотометре в пределах 200-340 нм. В Приложении 7 представлены спектральные характеристики некоторых амфетаминов. В таблице 2 Приложения 7 представлены спектральные характеристики некоторых амфетаминов.

Газожидкостная хроматография.

Газовая хроматография применяется разделения смеси амфетаминов, а также для их идентификации и количественного определения. Газохроматографическое исследование извлечений из биообъектов можно проводить как по нативной молекуле, так и после получения их различных производных на набивных и капиллярных колонках.

В качестве жидкой фазы используются апиезон L, силиконы SE-30, OV-1, OV-101, OV-17, SE-54, DB-1, DB-5, карбовакс 1500 и другие. Хроматографирование ведут как в изотермическом режиме, так и в режиме программирования от 130°С до 260°С с применением в качестве детектора ПИД, ТИД. Для повышения чувствительности метода проводят дериватизацию амфетаминов, используя в качестве реагентов трифторуксусный и уксусный ангидриды и другие соединения.

Еремин С.К. с соавторами (1993) приводят следующие условия газохроматографического определения амфетаминов в моче.

Стеклянная колонка длиной 1 м и внутренним диаметром 3 мм, заполненная 10% карбовакс-1500 на инертоне N-AW-HDMS (0,16-0,20 мм). Скорость газа-носителя-гелия -75 мл/мин., воздуха-400 мл/мин., водорода-30 мл/мин.

Изотермический режтим температуры для анализа эфедрона, эфедрина и ноэфедрина-170°С, а для амфетамина и метамфетамина – 130°С.

Режим программирования температуры - от 130°С до 200°С (12 мин), скорость подъема температуры 15° С /мин. Температура испарителя и детектора 200°С.

Предел обнаружения по предлагаемой методике составляет: для метамфетамина - 0,08 мкг/мл, амфетамина - 0,10 мкг/мл, эфедрона - 0,15 мкг/мл, эфедрина - 0,50 мкг/мл при анализе 10 мл мочи.

Газохроматографический анализ на наркотические средства и психотропные вещества проводится нами при следующих условиях: - газовый хроматограф «Цвет-560», капиллярная кварцевая колонка длиной 10 м, диаметром 0,25 мм со стационарной фазой PDMS. Детектор ТИД (N). Скорость газа-носителя - азота-30 мл/мин; расходы водорода – 15мл/мин, воздуха – 180мл/мин.

Температура колонки от 100°С (60секунд) до 260°С (600 секунд), скорость подъёма температуры 20°С/мин.

3.6.2.2.16 Лекарственные вещества группы 1,4-бенздиазепина

Большая часть бензодиазепинов экстенсивно метаболизируется в организме, и многие представители этой группы являются, по существу, метаболитами других соединений. Так, в результате метаболических преобразований диазепама образуются нордазепам, оксазепам (3-гидроксинордазепам) и темазепам (3-гидроксидиазепам), которые выводятся с мочой в виде глюкуронидных и сульфатных конъюгатов.

Надежного цветового теста для идентификации этих соединений не существует. Однако после гидролиза большинства бензодиазепинов и их конъюгатов образуются аминобензофеноны, которые можно экстрагировать и анализировать методом тонкослойной хроматографии. Для повышения дифференцирующей способности метода применяют два разных аэрозольных реактива - n-диметиламиноциннамальдегид и реактив, включающий азотистую кислоту и N-(1-нафтил) этилендиамин (реакция Bratton - Marshall).

Помехи со стороны других продуктов гидролиза можно свести к минимуму, экстрагируя петролейно-эфирный экстракт с водным раствором гидроксида натрия (2 моль/л) на роторной мешалке в течение 5 мин. Затем посредством центрифугирования в течение 5 мин разделяют фазы и выпаривают петролейноэфирный экстракт досуха в соответствии с вышеописанной процедурой.

Интерпретация результатов может быть затруднена в связи с тем, что многие соединения в процессе гидролиза мочи превращаются в метиламино-хлорбензофенон и/или аминохлорбензофенон (см. таблицу 1, Приложения 8). Например, может оказаться невозможным провести разграничение между темазепамом или оксазепамом и диазепамом или нордазепамом, поскольку эти соединения образуют бензофеноны сходного типа.

Медазепам, триазолам, клобазам, норклобазам и мидазолам сами по себе не образуют бензофеноны в процессе гидролиза.

Выделение производных 1,4 –бенздиазепина из биологического материала.

25 г измельченного биологического материала (средняя проба) из 100 грамм каждого органа, помещают в круглодонные колбы с притертой пробкой ёмкостью 250 мл вносят по 50 мл 6н раствора соляной кислоты и гидролизуют на глицериновой бане с обратным холодильником при 125-135 °С в течение

часа. По окончании гидролиза холодильник промывают 5 мл 2 н раствора соляной кислоты и промывные воды присоединяют к гидролизату. Горячий гидролизат фильтруют через ватмановский фильтр (белая лента). Остаток на фильтре трижды промывают 2 н раствором соляной кислоты и добавляют гранулированный гидроксид натрия, не допуская при этом сильного разогревания гидролизата. Устанавливают реакцию среды 6-8 по универсальному индикатору (при значении pH выше 9 образуется стойкая эмульсия). Гидролизат экстрагируют смесью хлорформа и изопропилового спирта 8:2 трижды (по 25, 15 и 15 мл) в течение 5 минут каждой порцией. Полученные экстракты соединяют, фильтруют через слой безводного сулфата натрия (1,5 г). Объем экстракта доводят в мерной колбе до 50 мл (V_1) и используют для обнаружения и количественного определения.

Хроматографическое разделение. 2 аликвоты (1,5 и 2/5 части экстракта (V_2) выпаривают под током теплого воздуха или на роторном испарителе. Остатки преносят с помощью хлороформа на стартовую линию хроматографической пластинки в виде двух полос длинной 1 и 3-4 см на расстоянии 1,5 см друг от друга. На ту же стартовую линию наносят метчик, состоящий из смеси 0,1 % спиртовых растворов бензофенонов (см. Приложение 8), в количестве 10-15 мкг каждого. Подвижная фаза-бензол. Пробег фронта растворителя -10см. Органический растворитель удаляют с хроматограммы под током теплого воздуха в течение 3-5 минут. При концентрации бензофенонов в пятне более 5 мкг их можно обнаружить по собственной желтой окраске. Часть хроматограммы, содержащею 2/5 экстракта, предназначенную для элюирования, закрывают стеклянной пластинкой. На открытой части хроматограммы с пятном метчика и второй полосой исследуемого экстракта (1/5 часть экстракта) проводят реакцию образования азокрасителя. С этой целью хроматографическую пластинку обрабатывают последовательно 2н раствором соляной кислоты, 0,1% раствором нитрита натрия и через 5 минут 0,5% раствором сульфамата аммония или насыщенным раствором мочевины, далее 0,1% раствором b-нафтола в 10 % растворе едкого натра или N- l-нафтилэтилендиаминдихлорида. Величины Rf бензофенонов приведены в таблице 2, Приложениия 8. Чувствительность 1 мкг препарата в пятне (при использовании N- l- нафтилэтилендиаминдихлорида 2 мкг в пятне).

Необработанную реагентом зону сорбента, содержащею бензофеноны вырезают и проводят элюирование используя этиловый спирт (V_3). Далее снимают спектр в диапазоне волн 200-500нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 7 см.

Количественное обнаружение.

В зависимости, от концентрации которую орентировочно считают после снятия спектра в УФ, отбирают аликвоту этанолового элюата (V_4) и переносят в стеклянные бюксы. Этанол удаляют под током теплого воздуха, сухой остаток растворяют в 0,2-0,5 мл этанола и добавляют до 3 мл 2н раствора соляной кислоты. Далее последовательно-0,5 мл 0,5% раствора сульфамата аммония. После добавления каждого реагента раствор интенсивно

взбалтывают. Азокраситель сиреневого цвета образуется через 15 минут после добавления 1 мл 0,1% раствора N- L-нафтилэтилендиаминдихлорида. Окраска устойчива в течение суток.

Оптическую плотность окрашенного раствора измеряют на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при 500 нм в кювете толщенной поглощающего слоя 1 см. Концентрацию в органах определяют по формуле:

$X = A \cdot (V_1) \cdot (V_3) \cdot 1000 \cdot 4 / E^{1\%}_{1см} \cdot V \cdot 100 \cdot V_4$;

где X- количество выделенного соединения в мг на 100 г органа;

A- оптическая плотность измеряемого раствора;

$E^{1\%}_{1см}$ - удельный показатель поглощения (220)

Другие буквенные обозначения указаны в тексте.

Определение удельного показателя поглощения.

В три мерные калибровочные пробирки (для трех повторных определений) на 5 мл вносят по 0,1 мл (100мкг) стандартного спиртового раствора препарата (1мг/мл), добавляют по 3 мл 2н раствора соляной кислоты и гидролизуют в течение 30 минут на глицериновой бане при 125-135°С с обратным холодильником. По окончании гидролиза холодильник промывают 1 мл 2н раствора соляной кислоты и после охлождения гидролизата доводят последний до 5 мл.

Из каждого гидролизата в мерные пробирки вносят по 0,1; 0,25; 0,5% 0,75; 1 мл (2,5, 10, 15, 10 мкг вещества), доводят 2 н раствором соляной кислоты до 3 мл и проводят реакцию образования азокрасителя как указано выше. После определения плотности окрашенного раствора при 550 нм удельный показатель поглощения вычисляют по формуле;

$E^{1\%}_{1см} = A/C \cdot L$;

где A-оптическая плотность раствора;

C-концентрация раствора в весовых процентах;

L-толщина поглощающего слоя в см.

В качестве раствора сравнения используют смесь реактивов. Подчинение закону Бугера наблюдается в пределах концентраций 5+ 20 мкг в исследуемой пробе (определение содержание по бензофенону, основанное на получении азокрасителя с бета-нафтолом, проводить нельзя ввиду отсутствия характерного спектра поглощения).

Исследование по нативному соединению с метаболитами.

Методика анализа.

Изолирование. 25 г мелкоизмельченных органов (средняя проба из 100г) заливают в стакане емкостью 200мл 0,5 н раствором соляной кислоты (pH 1) и оставляют при комнатной температуре в течение час, периодически перемешивая и проверяя значение pH среды. Настаивание повторяют 2 раза при тех же условиях. Извлечения объединяют, процеживают через тонкий тампон в делительную воронку на 250 мл и устанавливают pH 3 по универсальному индикатору. Экстрагируют хлороформом трижды по 15 мл. В случае образования эмульсии разделение фаз достигалось центрифугированием извлечения в течение 10 минут при 5000 об/мин.

Органическую фазу переносят в мерную колбу на 50 мл, пропуская через воронку с безводным сульфатом натрия, доводят хлороформом до метки и перемешивают. Извлечение исследуют на содержание вещества и его метаболитов.

Выделение оксазепама из биологического материала (по Л. Ф. Фартушному с сотрудниками). К 25 г исследуемого объекта (желудок и тонкая кишка с содержимым, печень, почки) прибавляют 3 мл насыщенного водного раствора гидрофосфата натрия и эту смесь подвергают гомогенизированию. Гомогенат переносят в колбу с притертой пробкой вместимостью 500 мл, прибавляют 100 мл диэтилового эфира, содержимое колбы взбалтывают с помощью аппарата для встряхивания жидкостей в течение 10 мин, а затем отделяют эфирную вытяжку. Оставшийся в колбе гомогенат еще дважды взбалтывают с новыми порциями диэтилового эфира (по 100 и 50 мл) в течение 10 мин. Эфирные вытяжки соединяют, фильтруют через бумажный фильтр. Объединенные профильтрованные эфирные вытяжки используют для обнаружения и количественного определения оксазепама, выделенного из биологического материада.

Выделение оксазепама из крови и мочи. В колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл вносят 10 мл крови или мочи, а затем прибавляют 100 мл диэтилового эфира. Содержимое колбы взбалтывают при помощи аппарата для встряхивания жидкостей в течение 10 мин. Затем отделяют эфирную вытяжку. Оставшуюся в колбе жидкость еще раз взбалтывают со 100 мл диэтилового эфира. Эфирные вытяжки соединяют и фильтруют через бумажный фильтр. Объединенные эфирные вытяжки используют для идентификации и количественного определения оксазепама.

Хроматографическое исследование. На стартовую линию хроматографической пластинки наносят остаток 1/5 части извлечения, растворенный в минимальном количестве хлороформа. На расстоянии 2 см от первой точки наносят в виде полос 1 см этанольные растворы (1мг/мл) препарата и его метаболитов. Хроматографируют в системе, насыщенной парами этилацетат - абсолютный этиловый спирт 9:1. Пробег растворителей 10 см. По удалении растворителей пластинку обрабатывают концентрированной соляной кислотой до полного увлажнения слоя силикагеля. Накрывают покровным стеклом, избегая, прилипания влажного слоя силикагеля и термостатируют при 135-140 °С. По истечении 20 минут покровной стекло снимают, а хроматограмму оставляют в термостате еще на 5 минут. После охлаждения пластинки слой сорбента обрабатывают последовательно реагентами для образования азокрасителя.

Одновременно с первой пластинкой в эту же хроматографическую камеру помещают вторую, на стартовую линию которой наносят полосой 1,5 см остатки из 2/5 и 1/5 части экстрактов. В третью полосу, длиной 1 см, наносят метчик, смесь стандартных растворов (1мг/мл). После поднятия растворителя на 10 см и удаления его со слоя сорбента в токе воздуха, для дополнительной очистки эту пластинку хроматографируют в метаноле с предварительным насыщением камеры в течение 15 минут. После поднятия

растворителя на 10 см и удаления его со слоя сорбента в токе воздуха зону, соответствующею 2/5 экстракта, прикрывают стеклом. Остальную часть хроматографической пластинки обрабатывают последовательно реактивом Драгендорфа (модифицированным) и 10 % раствором серной кислоты. При наличии препаратов 1,4бенздиазепина наблюдаются оранжево-красного цвета пятна. Слой сорбента из зоны соответствующею 2/5 экстракта, параллельно пятнам снимают, и элюируют ацетоном дважды по 5 мл в мерную пробирку.

Фотометрия в УФ-области.

В полученных элюентах удаляют органический растворитель, сухие остатки растворяют в 5 мл этанола и снимают спектры поглощения в УФ-области в диапазоне волн от 200-400нм, раствор сравнения 96° этанол. Измерение в тех же условиях повторяют после добавления в кювету, включая и раствор сравнения, по 3 капли насыщенного раствора гидроокиси натрия. После снятия спектра в щелочной среде в те же кюветы добавляют по 5 капель концентрированной серной кислоты и получают спектр в кислой среде. Характер полос поглощения для хлордиазепоксида и его метаболитов представлен в таблице 3, Приложения 8.

При исследовании бензофенонам определяется 60,5 ± 4,3% - 70,0 ± 1,2% от введённого количества. Такой интервал определяемых концентраций зависит от характера анализируемого объекта: степень извлечения значительно снижается при наличии эндогенных соединений липоидной структуры.

При исследовании по неизменному соединению и метаболитам степень извлечения находится в интервале от 55 ± 2,2% до 62 ± 2,8%.

Следует упомянуть, что метаболиты оксазепама (в основном глюкурониды) не экстрагируются хлороформом из водного извлечения, переходит в органическую фазу только нативное соединение. Отсюда следует, что при наличии оксазепама, в отличие от хлордиазепоксида, на хроматограмме появляется лишь окрашенное пятно, Rf которого 0,7 – 0,72. В данном случае это немаловажный факт, т.к. селективность анализа при исследовании хлордиазепоксида по бензофенону отсутствует в отношении оксазепама.

Обнаружение, например, хлордиазепоксида в объектах, подвергшихся различной степени гнилостного разложения, при исследовании по продукту гидролиза (АХБ) не вызывает затруднений. 70 - 85% хлордиазепоксида удаётся обнаружить при хранении объектов в течение года.

Обнаружение хлордиазепоксида по УФ- и ИК-спектрам. Хлордиазепоксид в 0,1 н. растворе гидроксида натрия имеет максимумы поглощения при 243 и 260 нм; в 0,1 н. растворе серной кислоты хлордиазепоксид имеет максимумы поглощения при 245 и 306 нм.

Хлордиазепоксид в 0,1 н. растворе соляной кислоты имеет максимумы поглощения при 246 и 308 нм. В ИК-области спектра основание хлордиазепоксида (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1625, 1458 и 760 см $^{-1}$.

Обнаружение диазепама по УФ- и ИК-спектрам. Диазепам в 2 н. растворе соляной кислоты имеет максимумы поглощения при 242 и 287 нм, в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 241, 284 и 359 нм; в ИК-области спектра диазепам (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1681, 1484 и 1313 см $^{-1}$.

Обнаружение нитразепама по УФ- и ИК-спектрам. Раствор нитразепама в этиловом спирте имеет максимумы поглощения при 218 и 260 нм, в 0,1 и. растворе серной кислоты имеет максимум поглощения при 277 нм и изгиб около 340 нм; нитразепам в ИК-области спектра (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1692, 1615, 1352 и 702 см $^{-1}$.

Цветная реакция на оксазепам. 25—50 мл объединенной эфирной вытяжки, полученной после изолирования исследуемого вещества из биологического материала (см. выше), выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл 6 н. раствора соляной кислоты и фильтруют. 1 мл фильтрата вносят в колбу вместимостью 25 мл и кипятят 5-10 мин. Жидкость охлаждают и помещают в холодильник на 15 мин. К охлажденной жидкости прибавляют 1 мл смеси (0,3 г бромида калия, 0,3 г нитрита натрия в 6 мл воды). Жидкость взбалтывают и помещают в холодильник на 30 мин. Затем к охлажденной жидкости прибавляют 0,5 мл 10%-го раствора мочевины. Через 15 мин прибавляют 1 мл 1 %-го спиртового раствора α-нафтола и 1 мл 40 %-го водного раствора гидроксида натрия. При наличии оксазепама появляется красная окраска, которую дает и хлордиазепоксид.

Приведенная выше реакция может быть использована для фотоколориметрического определения оксазепама (А. Ф. Фартушный с сотр.).

Обнаружение оксазепама методом хроматографии. 5—10 мл объединенной эфирной вытяжки (см. выше) выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл этилового спирта. Каплю полученного раствора наносят на линию старта на пластинке «силуфол». Правее через 2—3 см на линию старта наносят каплю раствора «свидетеля» (0,5 %-й спиртовой раствор оксазепама). Пятна нанесенных растворов подсушивают на воздухе, а затем пластинку вносят в камеру для хроматографирования, насыщенную парами системы растворителей (хлороформ — пропиловый спирт — ацетон (9:0,4:1). Пластинку вынимают из камеры после того, как система растворителей поднимется на пластинке на 10 см выше линии старта, подсушивают на воздухе и опрыскивают насыщенным раствором тиосульфата натрия. При наличках оксазепама на пластинке появляются оранжевые или желтоватые пятна.

Обнаружение оксазепама по УФ- и ИК-спектрам. Растворы оксазепама в этиловом спирте имеют максимумы полос поглощения при 230 и 315 нм. В ИК-области спектра оксазепам (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1687, 1706, 693 и 830 см $^{-1}$.

Мефедрон – наркотическое вещество психостимулирующего действия. Относится к классу синтетических катионов, является структурным аналогом амфетаминов. Входит в состав экстази, «солей» и курительных смесей.

Продолжительность присутствия наркотика в организме сопоставима с амфетамином.

Мефедрон поступает в кровоток постепенно или единовременно в зависимости от способа употребления. Он воздействует на головной мозг, вызывая характерные симптомы опьянения (эйфорию, повышение двигательной активности), а также влияет на вегетативный отдел нервной системы, стимулируя работу сердца, дыхательной системы, мышц и других внутренних органов.

90% вещества выводятся через почки в неизмененном виде. Незначительная часть накапливается и сохраняется в жировой ткани, волоса, ногтях.

Анализ мочи - наиболее информативный метод для определения факта употребления наркотика.

Пластины ТСХ (неподвижные фазы) Покрытие: слой силикагеля G толщиной 0,25 мм, содержащий инертный инди катор, флюоресцирующий при УФ-излучении с длиной волны 254 нм (Silica gel GF254). Стандартные размеры пластин: 20 × 20 см; 20 × 10 см; 10 × 5 см (последние следует использовать, расположив 10-сантиметровую сторону вертикально к камере для ТСХ). Элюирующие системы подготовить элюирующие системы проявления с максимально возможной точно стью, используя пипетки, дозаторы и мензурки. Ввести элюирующую систему в стеклянную камеру ТСХ на время, достаточное для насыщения парами подвиж ной фазы перед выполнением анализа. Этилацетат, метанол и (25%) аммиак – (85:10:5 v/v/v).

МДПВ Светло-синее пятно 0,39 Мефедрон Черное пятно 0,17 Меткатинон Черное пятно 0,17.

Пластина изучается в УФ-свете (254 нм), и все обнаруженные на ней пятна отмечаются до распыления нингидринового реактива (2%). Затем пластину помещают в печь при температуре 80ºС до проявления всех пятен (приблизительно на 40 минут).

Мефедрон не вступает в реакцию с большинством наборов для тестирования реактивов[англ.]. Исключение составляет реактив Либермана[англ.], дающий ярко-жёлтую реакцию

Сертралин, (Altruline; Serad; Zoloft; Асентра; Серлифт; Стимулотон) - лекарственное средство. Белый или почти белый кристаллический порошок [1, 2]. Сертралин(C17H17Cl2N) - это антидепрессант. Несмотря на широкое применение сертралина в медицинской практике, не исключены случаи проявления их токсического действия (при передозировке и индивидуальной непереносимости), о чем свидетельствуют описанные в литературе случаи острых и хронических отравлений данным препаратам [8, 9]. Для сертралина характерен повышенный суицидальный риск у разных возрастных категорий: у молодёжи, у подростков и у взрослых. В связи с этим изучение сертралина в химико-токсикологическом отношении является актуальной задачей.

0,29-0,5 0,29-1.6 ЛЕТАЛ ТАЙФТ

в коническую колбу вместимостью 50 мл вносили 5 мл крови, добавляли 10 мл воды и 0,1 мл этанольного раствора сертралина, содержащего 0,15 мг

препарата. Содержимое колбы оставляли на 2 часа при периодическом перемешивании. Затем разбавленную кровь подкисляли 2 М раствором хлористоводородной кислоты до pH 2,0 по универсальной индикаторной бумажке. Колбу с содержимым герметично закрывали и помещали на водяную баню при температуре 50-60ºС (для осаждения белков) на 15-20 мин. Затем колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, фильтровали, осадок на фильтре промывали тем же щелочным растворов.

Полученный объединенный фильтрат подщелачивали раствором натрия гидроксида до pH 9,0-9,5 и производили трехкратную экстракцию оптимальным для сертралина органическим растворителем (10, 10, 5 мл). Объединенный слой органического растворителя центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут и, отделив от слоя воды, фильтровали в сухую фарфоровую чашку через бумажный фильтр, содержащий 5 г безводного натрия сульфата. Содержимое чашки упаривали до сухого остатка, который затем растворяли в 2 мл хлороформа, использовали для идентификации сертралина, Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1-2. Результаты: Для разделения сертралина наиболее оптимальной является система: эталнолхлороформ-бензол (2:1:2) и самым подходящим проявителем оказался раствор бромфенолового синего и реактив Драгендорфа.

Для этой цели были использованы хроматографические готовые пластинки с закрепленным слоем силикагеля фирмы Merck, а также пластинки марки Силикагель, Sorbfil и Silufol UV 254. Для хроматографирования препарата были применены следующие системы растворителей: эталнол-хлороформ-бензол (2:1:2),

Этанол-хлороформ-бензол (2:1:2)

Цветные реакции зон локализации сертралина методом ТСХ

Бромфенол синий Голубой (чувствительность 4,0 мкг)

Пары йода Коричневое (2,5)

Реактив Бушарда Коричневое (1,5)

Драгендорфа модиф. по Мунье Оранжевое (0,75)

Хроматографические пластинки Сорбфил Сертралин 0,58-0,62

DETERMINATION OF SERTRALINE FROM BLOOD BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY Jalilov F.S.1, Zokirova G.R.2, Mustafayev U.G.3, Bekchanov B.S.4, Jalilova F.S.5, Pulatova L.T.6.

В период лечения необходимо соблюдать осторожность при вождении автотранспорта и занятии др. потенциально опасными видами деятельности, требующими повышенной концентрации внимания и быстроты психомоторных реакций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология химико-токсикологического исследования должна базироваться на использовании комплекса методов, включающего последовательно выполняемые этапы химико-токсикологического анализа от проведения выделения искомых веществ из биологических объектов и предварительного скрининга до идентификации и количественного определения веществ с применением специфичных методов.

Выбор того или иного метода при проведении химико-токсикологического анализа зависит от свойств искомого вещества, состояния и количества представленных объектов, задач исследования, экономических возможностей и оснащенности лаборатории.

Описанная процедура является сводом методик, используемых в химико-токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации и количественного определения соответствующих веществ в биологических объектах и объектов не биологического происхождения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Материалы издания Всемирной организации здравоохранения «Basic analytical toxicology» Женева 1997 год., CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS London THE PHARMACEUTICAL PRESS 1986.

2. Группа веществ, изолируемых экстракцией полярными растворителями. Учебно-методическая разработка (составители: Изотов Б.Н., Волкова И.В., Зинакова Е.Д.). Москва. 1987.

3. Л.И. Поваляева, О.Ю.Хансевярова и др. «Внедрение метода изолирования наркотических и лекарственных веществ после кислотного гидролиза». Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. Новосибирск 2004г. Выпуск 9. А.Б. Мелентьев.

4. Практическое руководство по скринигу лекарственных. наркотических веществ и их метаболитов методом газовой хроматографии с МС детектором для целей судебной токсикологии. Челябинск 2001 год.

5. И.В.Маркова, Э.К.Цыбулькин, В.В.Афанасьев, М.В.Неженцев. Клиническая токсикология детей и подростков. С.-Петербург. 1998. С.

6. Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики, Новосибирск 2009 Вып. 15 Н. О. Кокорина г. Новосибирск.

7. Разработки Алтайского Государственного медицинского института на кафедре токсикологической химии В. А.Карташова и его сотрудников.

8. Е.С.Бушуев, Р.В.Бабанян, В.Н.Куклин Современные проблемы химико-токсикологического анализа токсических веществ. Санкт-Петербург, 2002.