

ЭКСТРАКЦИОННОЕ ВЫМОРАЖИВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОВОГО ПОДХОДА К РАЗВИТИЮ МЕТОДОВ ПРОБОПОДГОТОВКИ В СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

¹ кафедра инженерной экологии и ландшафтного дизайна ФГБОУ ВО
Сочинский государственный университет,

² ГБУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы № 2 министерства
здравоохранения Краснодарского края г. Сочи

Методики судебно-химического анализа биологических объектов включают этап предварительной подготовки пробы (извлечение целевых и удаление мешающих компонентов) перед физико-химическим исследованием. Несмотря на очевидные успехи в развитии хроматографической техники, необходимость удаления ряда коэкстрактивных веществ биологической матрицы остается и связана с их негативным воздействием на разделительные системы (сокращение срока службы ГХ- и ВЭЖХ-колонок, ухудшение эффективности разделения и т.д.). Кроме того, цель разработки новых способов извлечения целевых компонентов из биологических проб обусловлена также актуальностью поиска менее трудоемких, более эффективных, экспрессных и безопасных процедур пробоподготовки [1]. Последнее особенно важно для специалистов, работающих в области судебно-медицинской экспертизы, поскольку, именно, непосредственный контакт с весьма опасным биоматериалом часто является причиной их профессиональных заболеваний.

Многими своими параметрами предложенный в настоящей работе новый подход к извлечению аналитов из биологических проб отвечает поставленным задачам. Экстракционное вымораживание (ЭВ), *extractive freezing-out* [2, 3] это способ криоконцентрирования аналитов из водосодержащих сред, сочетающий вымораживание с экстракцией в водорастворимую органическую жидкость. В исследуемый образец добавляют смешивающийся с водой растворитель, например ацетонитрил, ацетон, или ограниченно растворимую органическую жидкость, например этоксиэтан, бутанол, с последующим охлаждением и замораживанием водной части пробы. В итоге в выделяющийся отдельной жидкой фазой незамерзающий органический растворитель переходят извлекаемые органические вещества. Селективностью ЭВ можно управлять, варьируя экстрагент и pH-среды.

Способ экстракционного вымораживания [2] в отличие от кристаллизационных методов концентрирования [4, 5] обладает избирательностью [3, 6], а также возможностью устранения ионного фона и растворенных неорганических веществ. Существенным преимуществом ЭВ над сорбцией [7] и твердофазной экстракцией [8] является отсутствие затруднений при исследовании дисперсных систем [9]. К настоящему моменту уже созданы научные основы метода [9].

Материал и методы исследования. Определяли бензодиазепины, кофеин в биологических объектах (моча, кровь) и одноосновные карбоновые кислоты в модельных водных растворах методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии.

Результаты исследования. Разработанная методика определения 1,4-бензодиазепинов в моче основана на перераспределении бензодиазепинов в органическую часть образца во время процедуры ЭВ и последующем определении их с помощью ВЭЖХ [10]. Селективность метода обеспечена оптимальными условиями экстракции, ВЭЖХ-разделения и УФ-детекции. Степень извлечения из мочи оксазепам равен $70 \pm 7\%$ в диапазоне содержания препарата 5–10 мкг/мл, феназепам – $80 \pm 2\%$ при содержании 16–32 мкг/мл. Предел обнаружения метода при объеме пробы мочи 8 мл и детекции на длине волны 230 нм, дозируемом объеме в инжектор хроматографа «Милихром-4» 10 мкл составляет 0,06 мкг/мл по оксазепаму и 0,25 мкг/мл по феназепаму. Относительная погрешность определения оксазепам в диапазоне концентраций до 1 мкг/мл не превышает 30 %, феназепам в диапазоне концентраций до 2 мкг/мл – 20 % ($n = 10$ и $P = 0.95$). Предложенная методика в 2009 г. опробована и внедрена в деятельность химико-токсикологической лаборатории СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе для диагностики острых отравлений 1,4-бензодиазепинами.

В предложенной методике определения кофеина в крови [11] при ЭВ используется иной подход в способе изолирования аналита, чем был применен при определении 1,4-бензодиазепинов в моче. Он учитывает значительную гидрофильность кофеина. Во время процедуры ЭВ из биологической пробы в жидкий органический экстракт ацетонитрила извлекают мешающие ВЭЖХ-анализу компоненты. Кофеин из сыворотки крови (1,5 мл) концентрируют в водной части пробы (твердая фаза), добавляя в пробу смесь воды с ацетонитрилом и осуществляя ЭВ. Органический экстракт отбрасывают, а содержащий кофеин лед после размораживания и центрифугирования подвергают ВЭЖХ-исследованию. Предел обнаружения кофеина при объеме про-

бы, вводимом в инжектор хроматографа, 10 мкл составляет 5 мкг препарата в аналитической пробе. Относительная погрешность в концентрационном диапазоне 50–150 мкг/мл кофеина в сыворотке не превышает 10 %. Процедура проведения подготовки пробы проста, выполняется в одну стадию и не предъявляет особых требований к квалификации исследователя, что позволяет отнести предлагаемую методику определения кофеина в крови к разряду экспресс-методов.

Обсуждение результатов. В сравнении с существующими аналогами [12,13] предлагаемые методики определения 1,4-бензодиазепинов и кофеина на основе ЭВ позволяют значительно сократить время анализа, контакта с анализируемым биоматериалом и используемыми химическими реактивами. Замораживание – размораживание при ЭВ стимулируют коагуляцию белков мочи и крови, что также повышает эффективность этапа подготовки пробы. Проведение экстракции в режиме отрицательных температур снижает риск протекания побочных химических превращений и термодеструкции определяемых веществ, уменьшает летучесть применяемых органических растворителей, улучшает условия труда. Технология такой экстракции не требует специальной лабораторной посуды и расходных материалов: делительных и фильтровальных воронок, колб, пробирок, штативов, бумажных фильтров, сорбентов для ТФЭ и т.п.

Вместе с тем, осталась нерешенной задача сокращения захвата значительной части получаемого ацетонитрильного экстракта во время процедуры ЭВ объемом твердой фазы льда. Он имел мало управляемый характер и зависел от целого ряда факторов, в т. ч. скорости охлаждения образца, наличия дисперсных частиц и т.д. Поэтому, несмотря на хорошую воспроизводимость величины концентрации определяемых веществ в экстрактах, их объем существенно варьировал в параллельных определениях при выполнении процедуры ЭВ [3]. В качестве причин значительного варьирования объема (массы) жидкого экстракта, получаемого при ЭВ, указывался известный факт наличия жидких микровключений в твердой фазе льда при замораживании водных растворов [14], а также и то обстоятельство, что образующаяся твердая фаза имеет поликристаллическую структуру с множеством трещин. В них за счет капиллярных сил [6] втягивается незамерзающая жидкая органическая фаза, т.е. экстракт. В итоге, с уменьшением доли ацетонитрила в исходном образце его смеси с водой, начиная с объемного соотношения ацетонитрил : вода = 1 : 3,3 по объему, уже почти вся масса экстракта оказывалась включенной в объем льда [3]. Это не позволяло его отделить для дальнейших этапов

исследования. И, как следствие, не смотря на высокую степень извлечения аналитов, не удалось достичь степени концентрирования более 3–4 карт.

В настоящей работе, в модельных условиях, с целью сокращения потерь экстракта в виде включений в объеме твердой фазы экспериментально проверена возможность осуществления процесса экстракционного вымораживания в условиях действия поля центробежных сил (ЭВЦ). Опыты проводили с использованием специально созданной нами лабораторной установки на базе морозильной камеры Ardo CFR 110 A (Италия), в которой применены конструкционные элементы и детали серийно выпускаемой центрифуги ОПн-8 (Киргизия). Модельными системами служили растворы одноосновных карбоновых кислот в водно-ацетонитрильных смесях.

Таблица 1

**Результаты сравнения степени концентрирования $c_{орг}/c_{вод}$ карбоновых кислот C_2-C_8 из воды в ацетонитрил при ЭВЦ с ранее предложенным способом ЭВ [2, 6],
 $T_{зам.} = -23 \pm 1,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ ($n \geq 5$, $P = 0,95$)**

Кислота	ЭВ [6]		ЭВ с центрифугированием при 5000 об./мин	
	АН:Н ₂ O=1:4 ^{а)}	АН:Н ₂ O=1:8 ^{а)}	АН:Н ₂ O=1:9 ^{а)}	АН:Н ₂ O=0,4:10 ^{а)}
	$m_{орг}=0,05 \pm 0,03$ ^{б)}	$m_{орг}=0,14 \pm 0,013$ ^{б)}	$m_{орг}=0,13 \pm 0,022$ ^{б)}	$m_{орг}=0,05 \pm 0,02$ ^{б)}
Уксусная	3,1 ± 0,34	5 ± 0,9	6 ± 1,5	22 ± 3,1
Пропионовая	3,2 ± 0,36	6,3 ± 0,8	7 ± 1,2	24 ± 3,1
Масляная	3,4 ± 0,37	7,7 ± 0,6	8,4 ± 0,5	26 ± 1,7
Валерьяновая	3,9 ± 0,35	9,2 ± 0,7	10,1 ± 0,4	29 ± 2,0
Капроновая	4,1 ± 0,38	10,3 ± 0,8	12 ± 1,2	29 ± 4,7
Энантовая	–	11 ± 1,0	13 ± 1,5	37 ± 3,9
Каприловая	–	12 ± 1,1	14 ± 2,0	34 ± 4,6

Примечание: а) соотношение ацетонитрила и воды в исходном образце перед ЭВ, мл
 б) масса получаемого экстракта в результате ЭВ, г
 в) исходную концентрацию кислот в воде $c_{исх}$ варьировали от 10 до 600 мг/мл

В результате проведенного эксперимента по извлечению карбоновых кислот C_2-C_8 из воды методом экстракционного вымораживания в условиях одновременного центрифугирования (ЭВЦ) образца при 5000 об./мин, как видно из табл. 1, была достигнута 22–37-кратная

степень концентрирования кислот уже при однократной процедуре экстракции.

Удалось существенно снизить и долю экстрагента ацетонитрила в исходной смеси в сравнении с применяемым ранее вариантом ЭВ [2]. Обращает на себя внимание и факт высокой воспроизводимости массы (объема) экстракта, получаемого в результате процедуры ЭВЦ во время замораживания при восьми-, девятикратном превышении объема водного раствора над объемом экстрагента. При этом, как в случае ЭВ [6], сохранилась и хорошая воспроизводимость результатов определения содержания аналитов в экстрактах ($c_{орг.}$). Кроме того, следует отметить, что большая часть замерзшей водной фазы образца в данных условиях имеет вид прозрачного монокристаллического льда. Лишь в центральной его части остается небольшая поликристаллическая область с некоторым количеством вмерзших шарообразных пузырьков воздуха и, возможно, экстракта.

Кроме того, как видно из табл. 2, применение центрифугирования при экстракционном вымораживании органических кислот C_4-C_8 немного увеличивает угловой коэффициент $*K_{eq}$ зависимости $c_{орг.}$ от $M_o / V_{extr.}$ в состав которого согласно модели ЭВ входит константа распределения аналита между жидкой фазой экстракта и поверхностью льда, а также параметры, характеризующие адсорбционные свойства аналита и физико-химическую природу экстрагента [15].

Таблица 2

Влияние условий ЭВ карбоновых кислот C_2-C_8 из воды в ацетонитрил на угловой коэффициент $*K_{eq}$ линейной зависимости $c_{орг} = *K_{eq} \times M_o / V_{extr.}$ минимально определяемая концентрация аналита при ЭВЦ, $T_{зам.} = -23 \pm 1,5^\circ C$

Кислота	ЭВ [6]	ЭВЦ при 4000 об./мин	
	$*K_{eq}$	$*K_{eq}$	$C_{акт, мин. мг/л, АН:Н_2O=1:9}$
Уксусная	0,79	0,74	0,1
Пропионовая	0,82	0,86	0,1
Масляная	0,90	1,05	0,05
Валерьяновая	0,92	1,22	0,05
Капроновая	0,90	1,37	0,05
Энантовая	1,09	1,50	0,05
Каприловая	1,22	1,59	0,05

Следовательно, при переходе к режиму экстракционного вымораживания с центрифугированием увеличение $*K_{\text{эк}}$ приводит к росту степени концентрирования целевого компонента $c_{\text{орг}}/c_{\text{вод}}$. Если предположить, что механизм экстракции остался прежним, то в соответствии с моделью это, по-видимому, связано, как минимум, с изменением адсорбционных свойств поверхности образующейся кристаллической фазы льда, поскольку он, как отмечалось выше, получается более прозрачным, без трещин, следовательно, с менее развитой поверхностью.

Из табл. 2 видно также, что минимально определяемые концентрации указанных карбоновых кислот составили: уксусная и пропионовая кислота – 0,1 мг/л, масляная, валерьяновая, капроновая, энантовая и каприловая соответственно 0,05 мг/л. Это свидетельствует о том, что по пределу обнаружения предлагаемый способ определения данных кислот в воде существенно превосходит применяемый в настоящее время за рубежом метод EPA USA «5560 D. Gas Chromatographic Method» [16], использующий прямой ввод анализируемой воды в хроматограф, согласно которому предел определения уксусной кислоты составляет 3 мг/л, а для остальных – 1 мг/л. Кроме того, необходимо отметить, что инъекция водных растворов в испаритель газового хроматографа существенно сокращает срок службы неподвижной жидкой фазы хроматографической колонки.

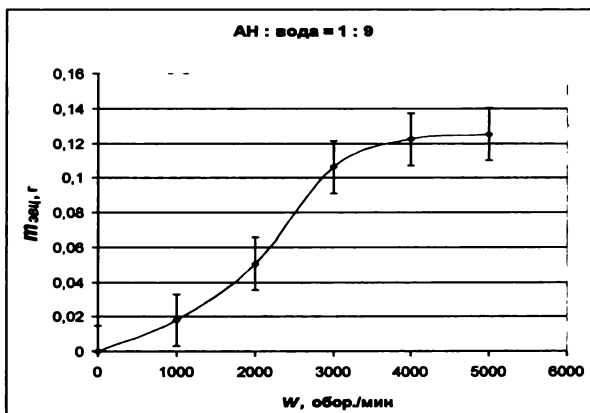


Рис. 1. Зависимость массы экстракта, получаемого в результате ЭВЦ от скорости вращения ротора центрифуги: объем ацетонитрила составлял 1 мл и воды 9 мл, $T_{\text{зам}} = -23^{\circ}\text{C}$.

В эксперименте установлено также, что масса получаемого экстракта зависит от числа оборотов центрифуги (рис. 1). Для образца состава АН : Н₂О = 1 : 9 на начальном участке увеличение скорости вращения ротора центрифуги от 0 до 3000 об/мин сопровождается довольно резким возрастанием массы (соответственно и объема) экстракта.

В диапазоне 4000–5000 об/мин, достигнув максимального значения, масса экстракта практически потоянна. Зависимость вышла на плато. Согласно техническим характеристикам используемого ротора РУ180Л при частоте вращения 4000 об/мин величина развиваемого ускорения центробежного поля в данном случае больше ускорения гравитационного поля в 1650 раз. Очевидно, при таких «перегрузках» уже нельзя исключить его влияния на формирование твердой фазы льда во время ЭВЦ. По крайней мере, в настоящее время для твердой воды в зависимости от температуры и давления установлено существование 13 кристаллических и 3 аморфных форм [17].

С учетом полученных данных в целях оптимизации и практической точки зрения в случае анализа водных растворов можно ограничиться проведением экстракционного вымораживания при оборотах центрифуги порядка 4000 об/мин. Однако, принимая во внимание, что в реальных условиях объектами исследования будут сложные водосодержащие биологические системы, в т. ч. дисперсные, параметр варьирования скорости вращения ротора центрифуги во время ЭВЦ будет важным дополнительным инструментом в поиске наиболее выгодных условий сепарации и экстракции.

Выводы. Таким образом, предложен новый способ выделения органических веществ из водных сред. Проведение процесса экстракционного вымораживания в условиях действия поля центробежных сил позволило существенно уменьшить долю используемого экстрагента ацетонитрила при определении одноосновных карбоновых кислот в воде, повысить их степень концентрирования. Благодаря такому сочетанию ЭВ и центрифугирования на этапе пробоподготовки на примере определения кислот в воде продемонстрирована возможность значительного снижения минимального предела их обнаружения, не прибегая к дериватизации. Наряду с дополнительным фактором регулирования эффективности экстракции путем изменения степени сепарации варьированием скорости центрифугирования экономятся материальные ресурсы за счет сокращения расхода экстрагента, отсутствия необходимости использования фильтрации, соответствующих приспособлений и химической посуды. Сокращено количество

операций, в т.ч. связанных с контактом исследователя с анализируемой пробой, а также время подготовки пробы к физико-химической стадии исследования.

Для использования в пробоподготовке метод ЭВ весьма прост, не требует применения сложного лабораторного оборудования, контроля степени кристаллизации образца. Его эффективностью и избирательностью можно управлять, варьируя условия (рН среды, температуру) и полярность экстрагента. Кроме того, способ ЭВ дает возможность применять гидрофильные экстрагенты без дополнительной химической модификации пробы, в частности, без высаливания. А экстракты, получаемые при использовании ацетонитрила, совместимы с обращено-фазовым вариантом ВЭЖХ. Следует добавить, что разъединение отдающей и принимающей фаз при ЭВ и ЭВЦ в отличие от традиционной жидкость–жидкостной экстракции (ЖЖЭ) [18], а также низкотемпературной жидкость–жидкостной экстракции (НТЖЖЭ) [19] необычайно просто и заключается лишь в декантации полученного экстракта с поверхности застывшей водной фазы.

Использованная литература

1. Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических веществ : Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств. / Под ред. Б. Н. Изотова. – М. : Мысль, 1993, – 271с.
2. Бехтерев В. Н. Патент РФ на изобретение № 2303476 // Б. И. № 21, 2007.
3. Bekhterev V. N. // Mendeleev Communications. 2007. V. 17. P. 241–243.
4. Бланк А. Б., Афанасиади Л. И. // Журн. аналит. химии. 1970. Т. 25. № 11. С. 2085–2093.
5. Эксперандова Л. П. // Украинский хим. журнал. 2005. Т. 71. № 9. С. 31–38.
6. Бехтерев В. Н. // Журнал аналитической химии, 2011, Т. 66, № 6, С. 608–613.
7. Когановский А. М., Клименко Н. А., Левченко Т. М., Рода И. Г. Адсорбция органических веществ из воды. Л. : Химия, 1990. 256 с.
8. Poole S. F., Wilson I. D. // J. of Chromatography A. 2000. № 1–2. P.1–465.
9. Бехтерев В. Н. Экстракционное вымораживание и парофазная экстракция – новые методы извлечения гидрофильных органических

- веществ из водных сред. Дис. докт. хим. наук. – Москва : Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 2011. 271с.
10. Бехтерев В. Н., Гаврилова С. Н., Маслаков И. В. // Судебно-медицинская экспертиза. 2007. № 2. С. 32–3.
11. Бехтерев В. Н., Гаврилова С. Н., Козина Е. П., Маслаков И. В. // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. № 5. С. 22–24.
12. Краснова Р. Р. Методы обнаружения и определения бензодиазепинов в биологическом материале. Практическое пособие. М. : МЗ РФ, РЦ судебно-медицинской экспертизы, 2000, 119с.
13. Швайкова М. Д. Токсикологическая химия. – М. : Медицина, 1975. – 376с.
14. Сергеев Г. Б. Криохимия / Г. Б. Сергеев, В. А. Батюк. М. : Химия, 1978. 296 с.
15. Бехтерев В. Н. // Журнал аналитической химии. 2008. Т.63. № 10. С. 1045–1049.
16. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 5560 D. Gas Chromatographic Method / 21-ad., USA-EPA. P. 5-59 – 5-61.
17. Вода: структура, состояние, сольватация. Достижения последних лет. / (Кесслер М. Ю., Петренко В. Е., Лященко А. К. и др.). Отв. ред. А. М. Кутепов. М. : Наука, 2003. 404 с.
18. Коренман И. М. Экстракция в анализе органических веществ. М. : Химия, 1977. 200 с.
19. Yoshida M., Akane A. // Anal. Chem. 1999, V. 71, p. 1918–1921.

Р. С. Голубев, Е. Н. Люст

ВЫБОР УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕГАБАЛИНА МЕТОДОМ ГХ-МС ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

*кафедра токсикологической химии ГБОУ ВПО
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Минздрава России, г. Пермь*

Введение. Прегабалин («Лирика®») – (3S)-3-(аминометил)-5-метилгексановая кислота, молекулярная масса – 159,2; противоспазматическое средство, выпускается в капсулах по 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 мг.