

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ
Кафедра клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації

І.О.Журавель, О.В.Чубенко, Н.В.Гузенко, В.В.Альхуссейн

**Використання методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту в
судово-токсикологічних дослідженнях**

(навчальний посібник для самостійної роботи слухачів циклів спеціальності
«Судово-медична токсикологія»)

Харків – 2017

Заклад-розробник

Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

Укладачі:

Журавель І.О. - д.хім.н., професор, завідувач кафедри;

Чубенко О.В. – к.фарм.н., доцент;

Гузенко Н.В. – к.фарм.н., асистент;

Альхуссейн В.В. – к.фарм.н., ст. викладач

Рецензенти:

Завідувач кафедри аналітичної та лікарської токсикології
Національного фармацевтичного університету,
д.ф.н., доцент **Баюрка С.В.**

Завідувач кафедри судово-медичної експертизи
Харківської медичної академії післядипломної освіти,
д.ф.н., професор **Гуров О.М.**

Використання методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту в судово-токсикологічних дослідженнях (навчальний посібник для самостійної роботи слухачів) / [І.О.Журавель, О.В.Чубенко, Н.В.Гузенко, В.В.Альхуссейн] – Харків: Харківська медична академія післядипломної освіти, 2017. – 35 с.

© Харківська медична академія післядипломної освіти, 2017

ЗМІСТ

ТЕРМІНИ ТА УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ	4
Початковий контроль знань.....	5
ВСТУП.....	6
1. Основи метода хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШС).....	7
2. Рухома фаза.....	11
3. Інтерпретація отриманих результатів.....	16
4. «ТШХ» – скринінг.....	19
5. Ідентифікація методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.....	27
Заключний контроль знань.....	30
Вірні відповіді.....	34
ЛІТЕРАТУРА.....	35

ТЕРМІНИ ТА УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

Адсорбція – (від лат. *Ad* – на, при і лат. *Sorbeo* – поглинаю) – вибіркове поглинання речовини з газового чи рідкого середовища поверхневим шаром твердого тіла (адсорбенту) чи рідини

Аналіт – речовина чи інша складова системи, яка підлягає хімічному аналізу

Біоматеріал – біологічний матеріал (сеча, кров, трупні органи), який використовується для судово-токсикологічних досліджень

Наркотик (від грец. *Narkoticos*) – той, що призводить до заціпеніння, одурманюючий) – субстанції природних чи синтетичних речовин, здатні викликати психічну чи фізичну залежність

Прекурсор (лат. *Prae* – попереду, перед + *cursus* – напрямок) – речовини та їх солі, класифіковані в міжнародних конвенціях як хімічні матеріали, що використовуються для приготування наркотичних і психотропних речовин, а також хімічні речовини та їх солі, що використовуються з аналогічною метою і віднесені Комітетом з контролю за наркотиками при МОЗ України до зазначеної категорії

Метаболіти (грец. *Metabole* – перетворення, зміна) – продукти перетворення речовин в організмі в процесі проміжного обміну речовин (метаболізму)

Скринінг (англ. *Screen* – просіювати, відбирати) – це експериментальне виявлення та відбір нових методів дослідження

ГХ – газова хроматографія

ГХ-МС – газова хроматографія з маспектрометричним детектором

ВЄРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ІФА – імуно-ферментний аналіз

ТШХ – тонкошарова хроматографія

hRf – помножене на 100 відношення довжини хроматографічного шляху речовини до довжини фронту розчинників

Початковий контроль знань

1. Визначення хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ) [8; 16]
2. Загальні властивості сорбентів в ТШХ [8; 16]
3. Недоліки методу ТШХ [8; 16]
4. Переваги методу ТШХ [8; 16]
5. Що таке рухома фаза в ТШХ? [14]
6. Основні принципи вибору рухомої фази в ТШХ [16]
7. Типи сорбентів використовуються в ТШХ? [16]
8. Характеристичні величини в ТШХ [14]
9. Як оцінюються результати, одержані при ТШХ? [16]
10. Як використовується метод ТШХ в токсикології? [14]

ВСТУП

Метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) є одним з найпоширеніших методів хроматографії, який знайшов своє застосування в лабораторній практиці по визначенню токсикантів різної хімічної природи. Це барвники, пестициди, токсини біологічного походження, нафтопродукти, а також наркотичні та лікарські засоби. Аналіз останніх має деякі особливості, що пов'язані з великою кількістю об'єктів досліджень, які поповнюються з кожним днем, важливістю вирішення питання про віднесення аналіту до заборонених наркотиків чи прекурсорів або близьких до них по будові лікарських засобів.

Слід зауважити, що виконання цих досліджень ускладнюється присутністю в матриці метаболітів які можуть утворювати як заборонені речовини так і ліки; а також те що об'єктом досліджень можуть бути багатокomпонентні лікарські засоби.

Завдяки своїй доступності, високій чутливості, широким можливостям, простоті проведення досліджень та низькою вартістю реактивів, хроматографія в тонких шарах сорбенту стала найпоширенішим скринінговим методом виявлення токсичних речовин.

1. Загальні питання по застосуванню метода хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ)

В токсикологічному аналізі, виняткові риси ТШХ використовуються для широкомасштабного скринінгу при аналізі наркотиків та отрутих речовин в сечі та іншому біоматеріалі. У ідеалі для цього повинно бути відповідне обладнання, додатки в вигляді спеціалізованого програмного забезпечення і довідкових бібліотек, які випускаються закордонними виробниками.

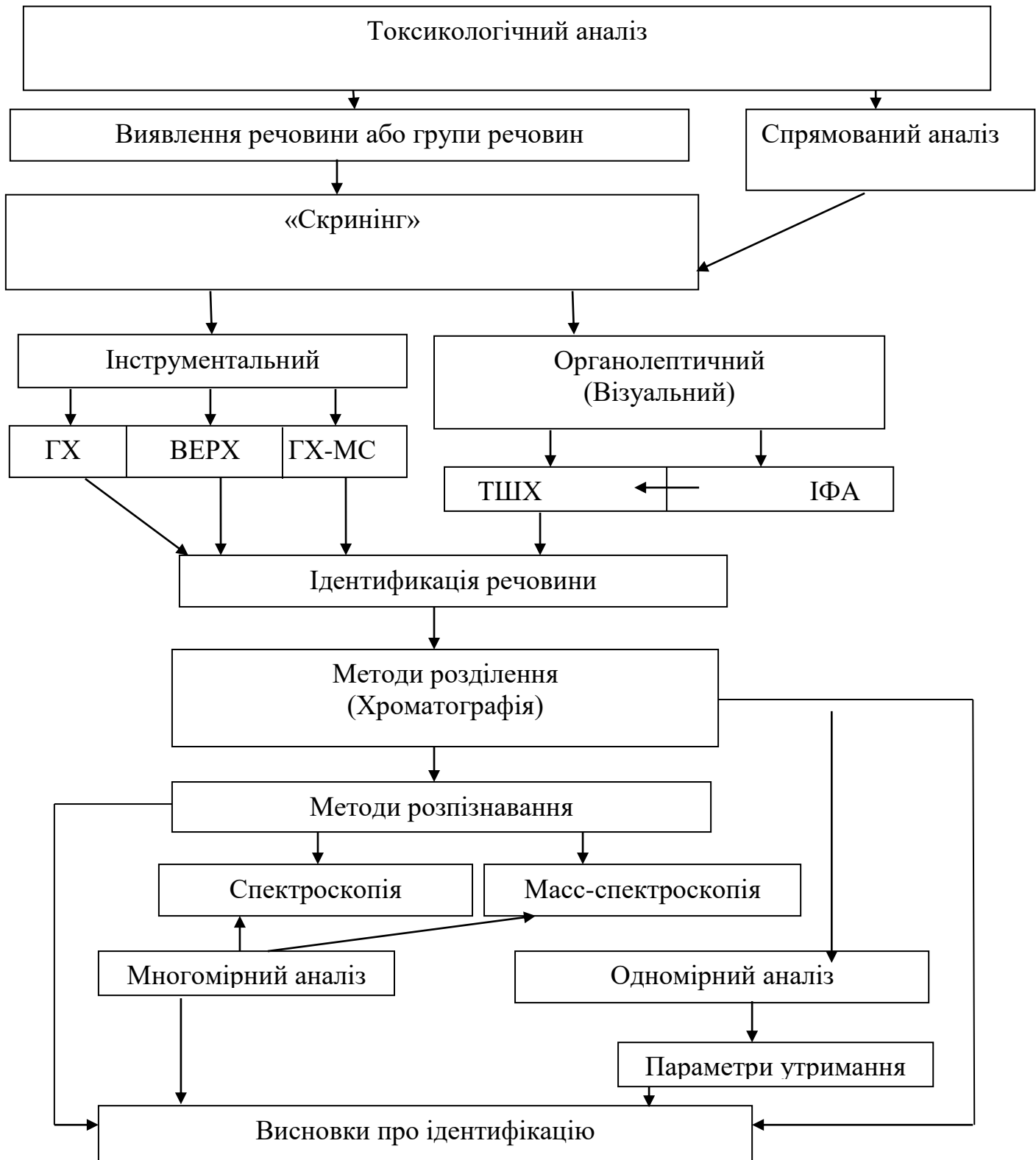
В порівнянні, наприклад, з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ), ТШХ дозволяє виявлять сполуки які погано поглинають УФ-випромінювання, завдяки використанню достатньо селективних хімічних реакцій для візуалізації речовин які досліджують.

В порівнянні з газовою хроматографією (ГХ) або ГХ з мас-спектрометричним детектором (ГХ-МС), ТШХ дозволяє хроматографувати полярні сполуки без попередньої дериватизації. Ще одним важливим додатком в ТШХ є первинний скринінг наркотиків, пестицидів. Але переваги використання імуноферментного аналізу (ІФА) та ГХ-МС в цій галузі перешкоджають розвитку сучасних ТШХ методів. ІФА-скринінг є вразливим у зв'язку з більшою можливістю фальсифікації проби та високою інтерференцією. Таким чином, широкий спектр методів, наявних сьогодні в лабораторіях включно з ТШХ, вважаються доповнюючими, а не взаємовиключними.

При використанні методу ТШХ завжди слід пам'ятати що розділення протікає «у відкритій хроматографічній системі», тому багато чинників впливають на результати аналізу.

На схемі 1 показано місце методу хроматографії в тонких шарах сорбенту в токсикологічному аналізі.

Схема 1



Метод ТШХ поєднує в собі два механізми взаємодії нерухомої фази з аналітом – це адсорбція та розподіл. В деяких випадках перевагу має один з

механізмів, а другий виконує допоміжну роль, або може бути просто не бажаним.

Для здійснення аналізу методом ТШХ потрібне відповідне обладнання (Рис. 1):



Рис. 1. Обладнання для хроматографії у тонких шарах сорбенту

Нерухома фаза (сорбент) утворює шар який нанесено на інертну поверхню з полімерних матеріалів або алюмінію, і все разом це утворює хроматографічну пластинку. Характеристикою хроматографічних пластинок є хімічна природа сорбенту з певними аналітичними можливостями, розмір часток сорбенту та товщина його шару, що нанесена на інертну поверхню, розмір хроматографічних платівок (15x15 або 10x10, найчастіше). Природа нерухомої фази має вирішальне значення для здійснення хроматографічного розподілу, тому на поверхню сучасних сорбентів в процесі їх виготовлення прищеплюють різні функціональні групи, які визначають механізм розподілу. В якості сорбенту можливо використовувати всі речовини, які здатні утворювати хімічно, фізично та геометрично стабільні шари. Тому ідеальний сорбент повинен задовольняти наступні вимоги:

- речовина не повинна розчинятися в рухомій фазі;

- речовина не повинна хімічно взаємодіяти з аналізом і не утворювати з ним ковалентні зв'язки;
- в сорбенті не повинно бути компонентів, які заважають детектуванню та розподілу;
- речовина, яка використовується для утворення шару сорбенту, не повинна бути забарвлена.

К найбільш використовуваним сорбентам належать силікагель та оксид алюмінію. Силікагель отримують з ортосілікатної кислоти шляхом поліконденсації. Силікагель має сіланольні групи, які діють як донори протонів із значенням $pK_a = 6 - 6,8$. Тому, він є полярним сорбентом з гідрофільними властивостями. Молекули води легко адсорбуються силікагелем, і від їх кількості залежить активність силікагелю.

Для підвищення активності шарів силікагелю його нагрівають при 120°C , і таким чином, активні сіланольні групи звільняються від молекул води.

Оксид алюмінію отримують дегідратацією гідроксиду алюмінію, який нагрівають до 500°C . Після чого, на поверхні цього сорбенту утворюються гідроксильні групи ($pH\ 7,5-8,0$) і він також є полярним сорбентом з гідрофільними властивостями.

Окрім цих речовин використовують флорисил (силікат магнію з лужними властивостями) та поліаміди. Використання цих сорбентів на платівках має назву пластинок з нормально-фазним механізмом розподілу.

Прикладом пластинок з прищепленими групами можуть слугувати платівки з обернено-фазним механізмом розподілу (платівки з RP-шарами). Їх використання не підміняє платівки з нормально-фазним механізмом, а доповнює, що дозволяє отримувати результати хроматографічного розподілу які дають можливість підвищити об'єктивність виявлення аналіту.

Всі наведені характеристики мають безпосереднє відношення до якості хроматографічного розподілу, але слід брати до уваги, те що і вразі співпадаючих характеристик платівок на них можливо отримати різні дані по

хроматографічній рухливості однієї речовини (наприклад хроматографічні платівки однієї марки але з різних пакунків, або різних серій чи дат виготовлення та інше).

Хроматографічну пластинку перед проведенням аналізу належним чином готують. Якщо є спеціальні зауваження, то її активують видаленням вологи, або проводять очищення сорбенту, або готують платівку з імпрегнованими шарами. Після цього, на пластинці креслять простим твердим олівцем лінію старту.

2. Рухома фаза

Велике значення для проведення аналізу методом ТШХ є застосування рухомої фази (системи розчинників). Рухома фаза може являти собою як індивідуальну речовину з певними властивостями, так і суміші різних речовин (розчинників). Найбільш вживаною характеристикою розчинників які використовують в тонкошаровій хроматографії є місце розчинника в «елюотропних рядах», їх класифікація базується на зростаючій силі елюювання. Це безрозмірний параметр, який враховує поверхневе на тяжіння та в'язкість розчинника. Вона має різні значення відповідно до кожного сорбенту та має різницю для кожної комбінації сорбент – рухома фаза. (Табл. 1).

Таблиця № 1

Зростання елюючої сили розчинників в залежності від природи сорбенту

Силикагель	Al ₂ O ₃
н-гексан	пентан
пентан	н-гексан
циклогексан	циклогексан
чотирьоххлористий вуглець	чотирьоххлористий вуглець
толуол	толуол

хлороформ	діетиловий ефір
діхлорметан	хлороформ
діетиловий ефір	діхлорметан
оцтова кислота	ацетон
ацетон	оцтова кислота
етанол	піридин
метанол	етанол
піридин	метанол
вода	вода

На противагу елюотропним рядам була розроблена система порівняння, яка базується на різниці «сили розчинника». Згідно з нею більшість розчинників розділено на 8 груп по селективності, в основі якої лежить наявність у розчинників протоно–акцепторних, протоно–донорних або діпольних сил.

Кожна з індивідуальних речовин має свою величину сили розчинника яка складається з його хроматографічних характеристик. Слід зазначити, що в випадку змішування індивідуальних компонентів в системі розчинників їх характеристики такі як «єлююча сила» або «сила розчинника» втрачають значення так як система розчинників набуває своєї характеристики с сторону збільшення цих показників.

Крім індивідуальних властивостей органічних розчинників – компонентів рухомої фази на покращення її розподільчої властивості впливають речовини–модифікатори. Найбільш вживаними є гексан (неполярна речовина) та 25% розчин аміаку, який додається до рухомої фази в певній кількості, так щоб фаза залишалася прозорою. Для обернено фазного механізму вода має силу розчинника яка дорівнює нулю, тому її використовують для регулювання сили розчинника.

В залежності від застосування сорбенту з певними властивостями (нормально– або обернено–фазні сорбенти) система розчинників представляє

собою гомогенну, прозору суміш рідин з неполярними або полярними властивостями яка по можливості зберігає ці властивості без змін до кінця хроматографічного розподілу.

Систему розчинників після приготування наливають до хроматографічної камери в такій кількості, щоб рівень її діставав середини відстані між нижнім краєм платівки та лінією старту. Якщо нема спеціальних зауважень про насичення камери, то до неї в той же час занурюють платівку і проводять хроматографування. Для насичення камери використовують фільтрувальний папір, який розташовують на стінках камери, після просякнення його системою розчинників камера є насиченою. В разі спеціальних зауважень можливе насичення камери за певний час згідно методики, яку використовують.

В якості хроматографічних камер застосовують спеціальний скляний посуд певного об'єму та форми, який забезпечує герметичність на час проведення хроматографування.

Використовують два типи камер:

- нормальні з об'ємом 500 дм³ (Рис. 2) та
- “сендвіч” – камери (Рис. 3), в яких відстань між хроматографічною платівкою та стінкою камери менше ніж 3 мм.



Рис. 2. Хроматографічна камера з об'ємом 500 дм³



Рис. 3. “Сендвіч” – камера

Хроматографічну платівку після нанесення зразків занурюють в систему розчинників, хроматографічну камеру зразу герметично закривають кришкою та очікують поки система розчинників підніметься по платівці на відстань $\approx 8,5$ см. Після чого платівку витягають, висушують та здійснюють візуалізацію.

Візуалізацію плям на хроматографічній платівці проводять за допомогою декількох методів:

1. Опромінювання УФ-світлом (маркування на хроматографічній платівці може свідчити про наявність в складі сорбенту речовини, яка здатна до флюоресценції): в такому разі при опроміненні УФ-світлом з довжиною хвилі 254 нм або 366 нм на платівці можуть проявитися тьмяні або сяючі плями на сяючому фоні іншого забарвлення.

2. Використання хімічного реагенту для проявлення платівки:

Для візуалізації речовин на платівках використовуються як загальні проявники, так й специфічні реактиви – проявники.

Речовини які проявляють, вступають в хімічну взаємодію з реактивами – окислювачами, які руйнують органічні речовини з утворенням плям одного забарвлення, або вступають у взаємодію з комплексоутворюючими

реагентами, які дають плями одного або різного кольору, або вступають в хімічну взаємодію в залежності від наявності функціональних груп в речовині, яку хроматографували.

Хімічні реагенти для візуалізації наносять на платівку в вигляді аерозолю в спеціальній камері (Рис. 4), за допомогою спеціального розприскувача (Рис. 5), або крапельно.

Швидко зникаючі плями фіксують за допомогою простого олівця. Результати хроматографічного розподілу та візуалізації в разі необхідності можуть бути зафіксовані цифровим фотоапаратом, або сканером.

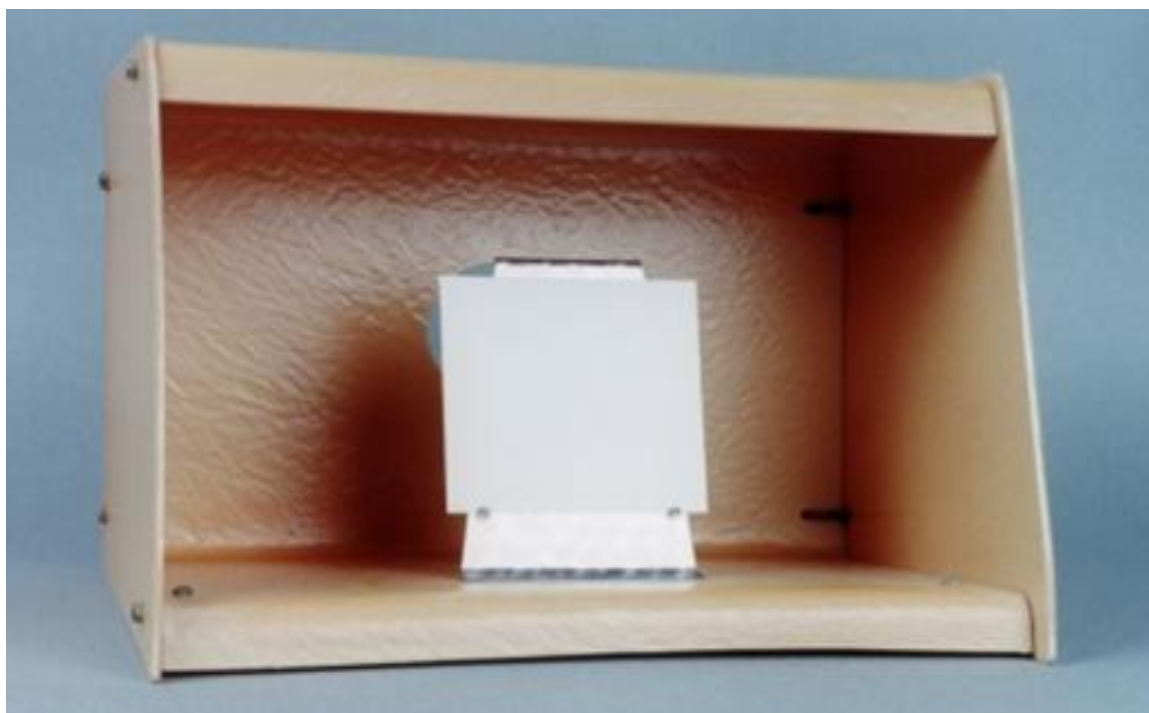


Рис. 4. Камера для обробки хроматограм



Рис. 5. Види розприскувачів

3. Інтерпретація отриманих результатів

Якісний аналіз в методі хроматографії в тонких шарах сорбенту може бути проведено з виявленням групової приналежності речовин (наприклад: опіати, похідні фенілалкіламінів та інш.), або здійсненням ідентифікації індивідуальної речовини (наприклад: морфін, метамфетамін та інш.).

Здійснення якісного аналізу базується на визначенні хроматографічної рухливості речовини яку аналізують, а також на взаємодії її з реактивом – проявником. Для визначення хроматографічної рухливості вираховують R_f – показник, який дорівнює відношенню відстані яку проходить аналіт до відстані, яку проходить система розчинників. Після його розрахунку можливо зробити висновок про попередню ідентифікацію речовини. Для остаточної ідентифікації проводять хроматографічне розділення аналіту та речовини стандарту, або речовини, прийняту за стандарт з розрахунком відносної величини R_s – відношення відстані, яку пройшов аналіт до відстані, яку пройшов стандарт.

Використання стандартів є запорукою правильно проведеного аналізу. До їх використання є певні вимоги:

– *Стандартна речовина порівняння (первинний стандарт)* – зразок який має паспорт визначуваної речовини високої чистоти, яку використовують для приготування еталонних розчинів речовини порівняння. Чистота має бути доведена одним з арбітражних методів. Зберігають в умовах, які забезпечують його стабільність при збереженні.

– *Еталонний розчин речовини порівняння (вторинний стандарт)* – розчин певної концентрації стандартної речовини порівняння у дистильованій або деіонізованій воді або органічному розчиннику. Використовують для аналітичного контролю і/або калібрування аналітичних приладів. Концентрацію розчинів періодично перевіряють. Зберігають в умовах які забезпечують їх стабільність при збереженні.

– *Робочий розчин речовини порівняння* – розчин, приготований розбавленням розчинів еталонних речовин водою або органічним розчинником. Проводять аналіз контрольного і неодруженого зразків.

– *Контрольний зразок* – біологічний зразок, що містить аналізоване з'єднання у відомій концентрації, так звана модельна суміш.

– *Холостий зразок* – біологічний зразок, ідентичний по складу контрольному за типом біоматриці, але що не містить аналізованої речовини або яких-небудь інших хімічних речовин. Неодружений зразок аналізується для визначення систематичної помилки, що часто називається фоном.

– *Фон* – штучна інтерференція яких-небудь матеріалів в контрольному або аналітичному зразку, яка може викликати позитивну або негативну похибку.

– *Показник R_f* – це перемінний чинник для кожної окремої речовини який залежить від умов хроматографічного розподілу – природи та складу рухомої та нерухомої фази, температури, кількості речовини яку наносять на лінію старту та інше. Тому для остаточної ідентифікації індивідуальної

речовини потрібно отримати два показника R_f на різних рухомих фазах та одній нерухомій з найменшою кореляцією вирахованих величин.

Таким чином, використання рухомої фази для ідентифікації речовин у методі хроматографії в тонких шарах сорбенту отримує вирішальне значення. Використання систем розчинників у токсикологічному аналізі має свою специфіку.

По-перше, це системи, які застосовують при здійсненні “скринінгу”. Їх перелік фіксовано, і вони використовуються в залежності від кислотно–лужних якостей можливих аналітів. Вони належним чином повинні бути приготовані, та здійснено перевірку умов хроматографування з використанням референтної суміші речовин – стандартів.

По-друге, при задовільному розподілі та отриманні співпадаючих з літературними даними показників R_f кожної з речовин – стандартів можливо проводити сам “скринінг”. Це стосується і використання специфічних систем розчинників при проведенні остаточної ідентифікації аналіту. Крім цього, речовини стандарти повинні з реактивом – проявником утворити плями певного забарвлення (табл. 2).

Таблиця 2

Ідентифікаційні параметри	
<i>Пов’язані з рухливістю речовини</i>	<i>Пов’язані з хімічними властивостями речовини</i>
$R_f = A_x / B < 1$	Загальні реактиви окислювачі
$hR_f = R_f \times 100 < 100$	Загальні реактиви комплексоутворювачі
$R_s = A_x / C_{ct} > 1 <$	УФ–опромінення 254 нм, 366нм
	Реактиви на окремі функціональні групи

4. “ТШХ–скринінг”

Токсикологічний аналіз принципово відрізняється від будь–якого клінічного або фармацевтичного своєю двоетапністю. Це викликано, по–перше, відсутністю будь–якої інформації про речовину, що призвела до отруєння, по–друге, більш жорсткими вимогами, що пред’являються юридичними системами у всьому світі до результатів токсикологічних аналізів, які є доказами. Використання методології скринінгу в таких випадках дозволяє скоротити загальний час дослідження і, в той самий час, отримати вірогідні результати.

Найбільш часто для скринінгу використовується метод тонкошарової хроматографії, який дозволяє одночасно проводити аналіз декількох класів речовин. Враховуючи, що наркомани часто використовують так звані “коктейлі”, які складаються з декількох наркотичних або психотропних речовин, то використання ТШХ, як раз і є найбільш ефективним методом скринінгу, якій дозволяє впевнено “відсіяти” відсутні групи засобів, які контролюються. Негативні результати методу ТШХ приймаються як остаточні і ніколи не можуть бути хибно негативними (“не виявлено”), і підтверджуючі дослідження на ці групи речовин вже не проводяться. Позитивний результат (“виявлено”) може бути хибно позитивним, однак він стосується виявлення групи речовин, які об’єднані деякими хімічними властивостями. Після отримання позитивного результату скринінгу дослідження переходить з групової до внутрішньо-групової ідентифікації.

Методологічною основою ТШХ–скринінгу є поєднання загальних систем розчинників, хроматографування в яких дозволяє розділити токсичні речовини на групи з окремими системами розчинників, які виявляють конкретний токсикант. ТШХ–скринінг токсичних речовин включає два етапи:

1. хроматографічний розподіл аналітів в загальних системах розчинників, виявлення їх шляхом комбінованого використання загальних реагентів,

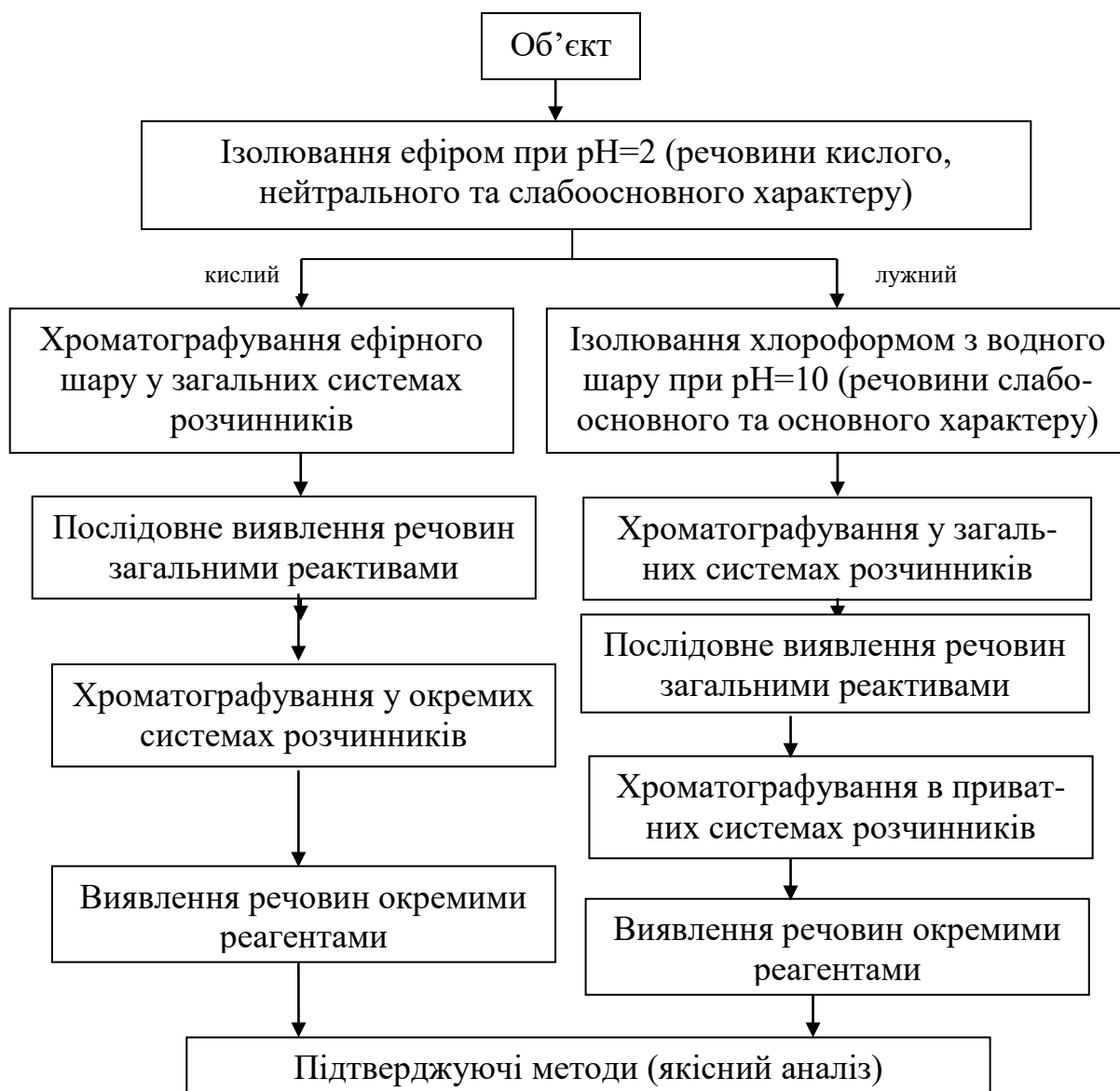
вимірювання величини R_f , що дозволяє встановити належність речовини до відповідного хімічного класу;

2. хроматографування аналітів в окремих системах розчинників, виявлення специфічними та чутливими реагентами, визначення невідомої токсичної речовини, елюювання останнього з метою подальшого проведення підтверджуючого аналізу та кількісного визначення.

ТШХ – скринінг може базуватися на різних принципах використання параметрів хроматографічної рухливості та фізико-хімічних методах візуалізації аналітів.

Один з варіантів скринінга, який широко використовують в практиці токсикологічних лабораторій передбачає, що всі токсиканти можна досить умовно розділити за кислотно-основними властивостями.

Після здійснення рідинно-рідинної екстракції дослідник отримує декілька екстрактів: «кислий», «лужний» (схема 2), та екстракт після кислотного (опіати, бездіазепіни) та лужного гідролізів (каннабіноїди). Після випаровування кожен з екстрактів наносять на тонкошарову пластинку поряд з референтною сумішшю речовин стандартів. Платівки поміщають в хроматографічні камери в кожній з яких знаходиться відповідна система розчинників.



Для виявлення невідомої речовини систематичний токсикологічний аналіз використовує розділення екстракту в стандартних системах ТШХ. Отримані дані використовують для здійснення попередньої ідентифікації речовини. Для цього застосовують статистичний підхід порівняння відносно бази даних великої кількості речовин із заздалегідь встановленою хроматографічною рухливістю в стандартних системах.

Методика здійснення систематичного токсикологічного аналізу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту повинна відповідати наступним критеріям:

- наркотики і лікарські речовини повинні давати прийнятні хроматографічні властивості у використовуваних ТШХ–системах;
- значення R_f для визначуваних речовин повинні рівномірно розподілятися по усьому діапазону величин R_f в стандартних системах;
- отримані значення R_f мають бути стандартизованими так, щоб була отримана добра міжлабораторна відтворюваність;
- коли для попередньої ідентифікації речовини, використовують більше однієї системи, то отримані значення R_f повинні мати низьку кореляцію в цих системах.

Використання стандартних систем дозволяє розділити екстракти отримані з кислого і лужного середовища, а присутність нейтральних речовин очікується як в кислих так і лужних екстрактах.

Комітет по систематичному токсикологічному аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів (TIAFT) рекомендує використовувати для попередньої ідентифікації системи № 1 – 10. У вітчизняному ТШХ–скринінгу органічних речовин використовуються системи № 11 – 14:

1. хлороформ – ацетон (80:20);
2. етилацетат;
3. хлороформ – метанол (90:10);
4. а) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5) *(для речовин кислого та нейтрального характеру)*;
б) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5) *(для речовин нейтрального та основного характеру)*;
5. метанол;
6. метанол – *n*-бутанол (60:40) + 0,1 моль/л NaCl;
7. метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5) (платівка імпрегнована 0,1н КОН);

8. циклогексан – толуол – діетиламін (75:15:10);
9. хлороформ – метанол (90:10) (платівка імпрегнована 0,1н КОН);
10. ацетон (платівка імпрегнована 0,1н КОН);
11. толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:1,5);
12. метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5);
13. ацетон;
14. гексан – ацетон – 25% розчин аміаку (50:50:2).

Для речовин з різними кислотно–основними властивостями рекомендують використовувати перші 4 системи зі списку для розділення кислих і нейтральних речовин, 7 наступних, для розділення нейтральних і основних речовин. Це стосується 1600 токсикологічно важливих речовин.

Після закінчення хроматографування платівки висушують та обробляють відповідними реактивами, які широко використовуються у токсикологічному скринінгу (№ 1 – 5), або специфічними (№ 6 – 16):

1. реактив Драгендорфа, модифікований за Мун'є (в 10 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють 0,85 г основного нітрату вісмуту та додають 40 мл води. До отриманої рідини додають розчин, який вміщує 8 г йодиду калію в 20 мл води. Перед використання беруть 1 мл вказаного розчину, додають до нього 2 мл льодяної оцтової кислоти та 10 мл води);
2. 1% розчин нінгідріну в ацетоні (в 10 мл ацетону розчиняють 0,1 г нінгідріну);
3. реактив Маркі (до 1 мл кислоти сульфатної концентрованої додають 1 краплю формаліну та охолоджують);
4. реактив ФПН (до 5 мл 5%-го розчину феруму (III) хлориду додають в 45 мл 20%-го розчину кислоти хлоратної та 50 мл 50%-го розчину кислоти нітратної);
5. розчин калію йодплатинату (суміш 0,25 г платини хлориду та 5 г калію йодиду в 100 мл води);
6. концентрована сульфатна кислота;

7. 1% розчин нінгідріну в концентрованій сульфатній кислоті (в 10 мл концентрованої сульфатній кислоті розчиняють 0,1 г нінгідріну);
8. послідовна обробка хроматограм 0,3% розчином нінігідріну у *n*-бутанолі, нітратом міді та амоніаком (0,3 г нінгідріну розчиняють у 100 мл *n*-бутанолу та додають 3 мл льодяної оцтової кислоти), потім пластинку нагрівають 10 хв при 110 °С, після чого, оброблюють розчином міді нітрату в етанолі (1 мл насиченого водного розчину міді нітрату з додаванням 0,2 мл 10% азотної кислоти розчиняють в 100 мл 96% етилового спирту) та поміщають в закриту посудину, яка насичена парами концентрованого розчину амоніаку;
9. аміачний розчин срібла азотнокислого з послідуєчим УФ–опромінюванням (5 г срібла азотнокислого розчиняють у 100 мл води та по краплях додають розчин амоніаку (при постійному перемішуванні), поки осад не буде повністю розчинено), а потім опромінюють УФ–світлом;
10. реактив Бушарда (в 10 – 15 мл води розчиняють 2 г калію йодиду, потім до цього розчину додають 1,27 г йоду. Після розчинення йоду додають воду до об'єму 100 мл);
11. реактив Бургера (Розчин № 1: 1,7 г вісмуту нітрату розчиняють в 220 мл льодяної оцтової кислоти та додають 100 мл 40% розчину калію йодиду. Розчин № 2: змішують 1 мл фосфорної кислоти, 10 мл 96% етанолу та 5 мл 20% розчину барію хлориду. Для отримання робочого розчину 10 мл розчину № 1 змішують з 16 мл розчину № 2);
12. реактив Фреде (1 г молібденової кислоти або натрію молібдату розчиняють в 100 мл гарячій концентрованій сульфатній кислоті);
13. 0,5% розчин *o*-толідіну з послідуєчим УФ–опромінюванням (0,05 г *o*-толідіну розчиняють в 10 мл ацетону), а потім опромінюють УФ–світлом;
14. реактив Манделіна (до 0,01 г ванадату амонію додають 2 мл концентрованої сірчаної кислоти);

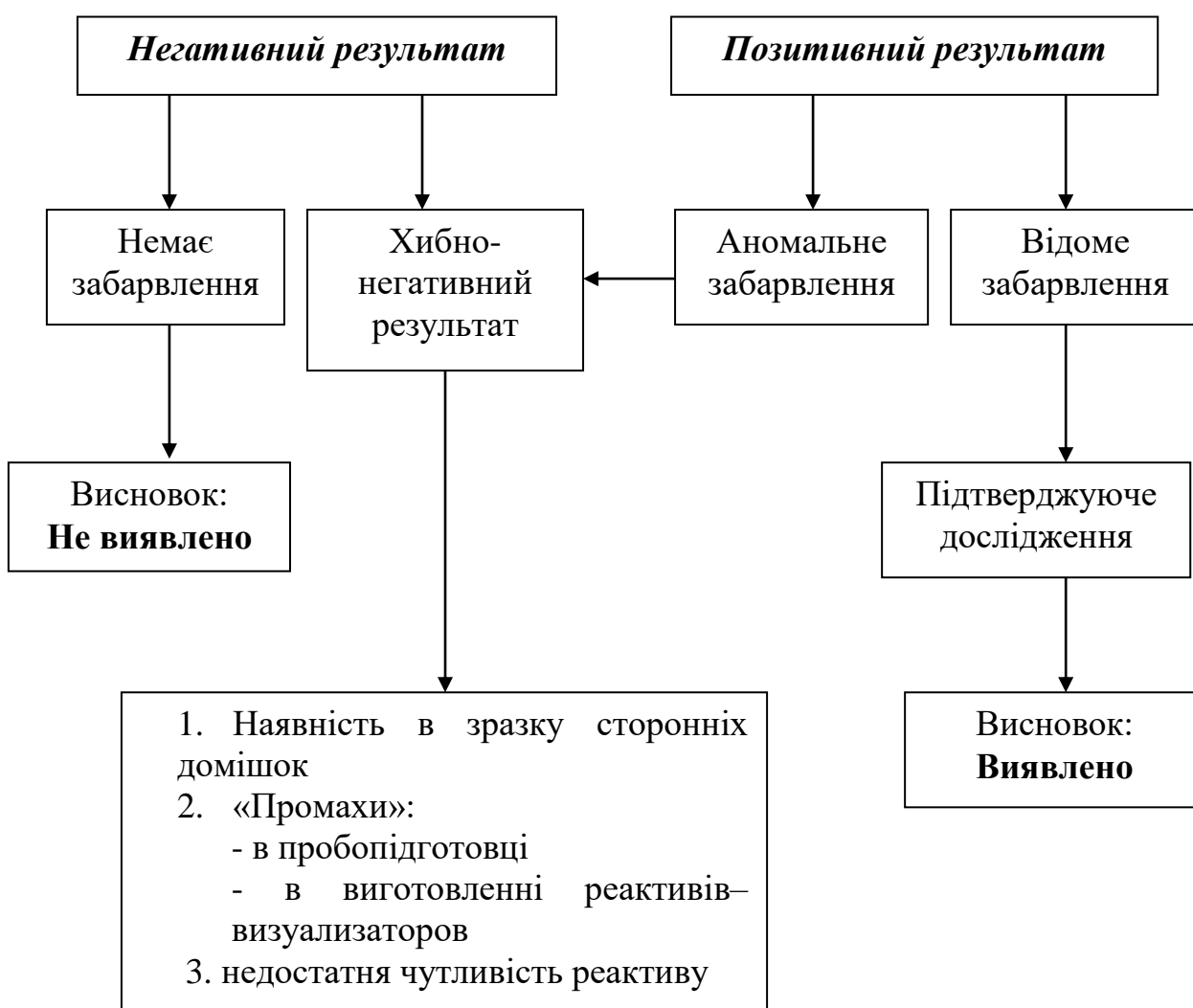
15. послідовне нанесення: а) 1% розчину нінгідріну в ацетоні та б) реактиву Маркі;

16. 1% розчин диметиламінобензальдегіду та хлороводнева кислота (0,1 г диметиламінобензальдегіда розчиняють в 10 мл 96% етилового спирту та обробляють цим розчином хроматограму, а потім поміщають її на 3–5 хв в ємність, яка насичена парами хлороводневої кислоти).

Якщо після обробки реактивом утворилось певне забарвлення з референтною сумішшю та не утворилось з досліджуваним екстрактом, то роблять висновок «не виявлено». Якщо референтна суміш та екстракт утворили очікуване забарвлення плям з певним значенням R_f (табл. 3) роблять висновок «виявлено групу речовин».

Таблиця 3

Результати «скринінгу» отримані після візуалізації хроматограм



В деяких випадках після застосування необхідного набору реактивів – проявників не можливо зробити однозначні висновки про виявлення групи речовин. В такому разі можливо застосувати послідовне нанесення реактивів, або змивання платівки водою після нанесення основного реактиву.

В тому разі, якщо експерт має справу з обмеженою кількістю токсикантів, то можливо застосування нових реактивів–проявників.

Важливою складовою в виявленні конкретного аналіта є його хроматографічна рухливість в запропонованих системах розчинників. Як зазначалось вище, по абсолютним значенням хроматографічної рухливості (R_f) роблять попередню ідентифікацію. Для отримання об'єктивних даних проводять деякі заходи з використанням стандартних речовин для отримання величини R_s , або з залученням референтних сумішей стандартних речовин. Для виявлення великої кількості лікарських засобів, наркотичних та психотропних речовин за кордоном використовують бази даних по яким можливо отримати уточнені величини R_f на декількох системах розчинників, що дає можливість ідентифікувати конкретну речовину. При застосуванні всіх складових – відповідності тонкошарових пластинок, референтних сумішей, систем розчинників цю систему можливо застосовувати і в нашій практиці. В разі, коли таке співпадіння не можливо відтворити, то тоді використовують одну референтну суміш для виявлення обмеженої кількості токсикантів.

Наявність тонкошарових пластинок з іншими механізмами розподілу (наприклад, пластинок з RP–шарами), дозволяє отримувати данні по хроматографічній рухливості речовини на платівках з нормально- та оберненофазними механізмами. Данні по хроматографічній рухливості отримані паралельно дозволяють використовувати їх на проміжному етапі скринінгу.

Досить часто в практиці токсикологічного аналізу, який здійснюється методом хроматографії в тонких шарах сорбенту зустрічаються речовини, які мають в своїй структурі обмежений набір функціональних груп. В першу

чергу, це стосується речовин, які мають в своєму складі третинну аміногрупу. Такі речовини можливо виявити тільки з реактивом Драгендорфа за Мун'є, крім цього, такі речовини мають близькі параметри хроматографічної рухливості. Тому, в таких випадках обов'язково необхідно застосувати нові реактиви–проявники (наприклад, реактив Манделіна), і якийсь з розрахункових методів хроматографічної рухливості.

При виконанні досліджень методом хроматографії в тонких шарах сорбенту на етапі скрінінгу деякі речовини мають однакову хроматографічну рухливість в системах розчинників, які використовують для розподілу. Додатковою складністю в виявленні одного з аналітів, може бути й те, що реактив-проявник утворює забарвлення з обома речовинами. В такому разі, для підвищення селективності виявлення аналіту використовують двомірну хроматографію.

5. Ідентифікація методом хроматографії в тонких шарах сорбенту

Після встановлення групової приналежності здійснюють внутрішньо-групове дослідження. Для його реалізації можуть бути використані методичні рекомендації для виявлення та визначення конкретної групи речовин, або речовини. В такому разі, дослідження проводять після проведення зазначеної в методичних рекомендаціях екстракції токсикантів з послідовним здійсненням всіх вимог зазначених в рекомендаціях.

Якщо методичних рекомендацій немає, то фахівець проводить самостійне дослідження.

Для проведення самостійного дослідження експерту необхідно розробити методіку аналізу речовини та виконати наступні дії:

1. По-перше, потрібно вивчити властивості речовини, яка була попередньо виявлена. Для конкретної речовини встановлюють її структурну формулу з виділенням функціональних по яких можливо запропонувати реактиви–проявники. З літературних джерел встановлюється кислотно-лужні властивості речовини по значенням P_{Ka} , його розчинність та здатність

утворювати можливі метаболіти або продукти, які утворюються при розкладанні аналіту.

2. З урахуванням цих властивостей проводиться екстракція нової порції біологічної речовини з отриманням екстракту. При цьому, необхідно вивчити процес пробопідготовки з точки зору максимальної вірогідності виявлення речовини. Процедура пробопідготовки повинна запобігати можливості випадкового забруднення або втрати аналізу.

3. Розробити умови хроматографічного розподілу:

- здійснити підбір 2 рухомих фаз (елюентів), де величина R_f речовини, яку досліджують має найменшу кореляцію;
- підібрати підходящий розчинник для нанесення досліджуваної речовини та спосіб нанесення на пластинку;
- підібрати умови хроматографічного розподілу (тип хроматографічної камери, насичення камери парами розчинника і т.д.);
- підібрати підходящий механізм розподілу аналіта на платівках з урахуванням полярності речовини та сорбенту або інших механізмів розподілу;
- підібрати метод візуалізації аналіта (проявлення УФ-світлом, реактивами – окислювачами, реактивами, які утворюють забарвленні продукти з аналітом відповідно до наявності функціональних груп);
- установити специфічність хроматографічного аналізу для даного аналіта (встановлення відмінностей між аналітом та соекстрактивними речовинами: метаболітами, ізомерами, продуктами розпаду, ендогенними речовинами, компонентами матриці). Для цього в підібраних умовах хроматографічного розподілу необхідно виявити потенційні перешкоди, які заважають, та оцінити виявлення цих перешкод.

- вибрати ряд хімічно подібних сполук (метаболітів, аналогів за структурою, похідних, і так далі) присутніх в пробі, і оцінити їх вплив на аналіт;
- проаналізувати деяку кількість репрезентативних чистих проб ($n=20$) і виявити плями, які виникають в області хроматографічної рухливості аналіта;
- додатково в репрезентативні чисті проби додаються відповідні концентрації речовин, що впливають на виявлення аналіта, і після проведення аналізу досліджують чи може їх присутність привести до хибнопозитивних результатів; чи ускладнена ідентифікація аналіту присутністю однієї або більше речовин; чи впливає це на кількісне визначення аналіту (якщо є потреба).

Хроматографування проводиться в мінімум двох системах розчинників, в яких величини R_f для даної речовини мають малу кореляцію. Поряд з досліджуванним екстрактом наносять речовину стандарт, а вразі відсутності такого наносять речовину прийняту за стандарт, після проявлення яких розраховують величину R_s та роблять висновки про ідентифікацію речовини.

Заключний контроль знань

1. Величина R_f не залежить від:

- A. однорідності шару сорбенту
- B. часу хроматографування
- C. насиченості парами розчинника хроматографічної камери
- D. властивостей речовин, які входять в склад суміші
- E. розміру пластинки

2. Величину R_f використовують з ціллю

- A. ідентифікації речовини
- B. кількісного визначення
- C. визначення чистоти речовини
- D. орієнтовної ідентифікації речовини

3. R_s -це величина, яка дорівнює:

- A. відношенню відстаней, які пройшли речовина та фронт розчинників
- B. відношенню відстаней, які пройшли фронт розчинників та речовина
- C. відношенню відстаней, які пройшли речовина, що визначається та стандартна речовина
- D. відношенню відстаней, які пройшли стандартна речовина та речовина, що визначається

4. Величина R_s залежить від

- A. однорідності шару
- B. індивідуальних властивостей речовин, що входять в склад суміші
- C. часу хроматографування
- D. температури

5. В методі ТШХ речовина рухається разом з фронтом розчинника, отже

- A. речовина необоротно адсорбується нерухомою фазою

- В. речовина майже не адсорбується нерухомою фазою
- С. речовина зворотно адсорбується нерухомою фазою
- Д. проходить десорбція речовини

6. При використуванні стандартних систем в методі ТШХ слід:

- А. провести апробацію систем з використанням зразків, що досліджуються
- В. не проводити апробацію системи з використанням зразків порівняння
- С. провести апробацію систем з використанням зразків порівняння та одержати значення R_f , які збігаються із літературними значеннями

7. При проведенні серійних аналізів методом ТШХ, системою розчинників слід користатися:

- А. багатократно
- В. кожного разу новою порцією
- С. не має значення

8. Об'єктивні результати в ТШХ-скринінгу речовин, які визначають, одержують при застосуванні:

- А. табличних значень величин R_f
- В. порівняння з величинами R_f стандартних речовин або речовин, які прийняті як стандарт (R_s), з речовинами, які визначають
- С. одержані значення R_f речовин, які визначають

9. На вірогідне визначення величини R_f або R_s впливає:

- А. розмір пластинки
- В. довжина пробігу фронту розчинника
- С. відстань від краю пластинки до лінії старту
- Д. форма плями

10. Оптимальний час насичення хроматографічної камери парами розчинника для пластинки з силікагелем складає

- A. 10 хвилин
- B. 60-120 хвилин
- C. 30-60 хвилин

11. ТШХ на оберненій фазі проходить у тому випадку, якщо нерухома фаза:

- A. менш полярна за рухому
- B. більш полярна за рухому

12. Речовини на пластинках для ТШХ з неполярною оберненою фазою утримуються за рахунок взаємодій:

- A. гідрофобних
- B. гідрофільних
- C. іонних

13. Розшарування багатокomпонентної рухомої фази в ТШХ відбувається в основному з-за:

- A. різниці в полярностях індивідуальних компонентів
- B. додавання модифікатора

14. Додавання модифікаторів (кислот або основ) до рухомої фази в ТШХ проводять для того, щоб для речовин, які хроматографують:

- A. стримати дисоціацію
- B. посилити дисоціацію
- C. підвищити розчинність

15. Полярні нерухомі фази в ТШХ можуть брати участь з речовиною у взаємодії:

- A. диполь-дипольний та утворювати водневі зв'язки
- B. дисперсійний
- C. іонний

Вірні відповіді

1	E
2	D
3	C
4	B
5	B
6	C
7	B
8	B

9	D
10	C
11	A
12	A
13	A
14	A
15	A

ЛІТЕРАТУРА

1. Clarke's isolation and identification of drugs. –London: Pharmaceut.Press, The Pharmaceutical Society of Great Britain. – 2011. – Ed. 4. – 2476 P.
2. Development and validation of two LC–MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography / N. Schaefer, B. Peters, P. Schmidt, A. H. Ewald // Anal Bioanal. Chem. – 2013. – Vol. 405. – № 1. – P 247–258.
3. Montenarh D. A simple extraction and LC–MS/MS approach for the screening and identification of over 100 analytes in eight different matrices / D. Montenarh, M. Hopf, S. Warth, [et al.] // Drug Test Anal. – 2015.– Vol. 7. – № 3. – P. 214–240.
4. Recommended methods for the identification and analysis of barbiturates and benzodiazepines under international control : manual for use by National Laboratories ST/NAR/46. – New York. : United Nations, 2012. – P. 21–35.
5. Буряк В.Ю. Експертиза наркотичних речовин / Буряк В.Ю., Геваза Ю.І., Замошець О.П. – К.: 2005. – С. 203.
6. Інформаційний лист «Спосіб визначення заборонених наркотиків у суміші з лікарськими засобами в сечі людини» / Г.П.Петюнін, О.В.Чубенко, Н.В.Гузенко, О.В.Хіжніченко // МОЗ України, Український Центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. – Київ, 2012.
7. Клименко Л.Ю Анализ подходов к определению специфичности/селективности при проведении валидации аналитических методик в судебно-токсикологическом анализе /Л.Ю.Клименко, Г.П.Петюнин // Український медичний альманах. – Т.16 (№1). – 2013. – С. 71-74.
8. Крамаренко В.Ф. Токсикологічна хімія // Підруч. пер. з рос. – К.: Вища школа, 1995. – 423 с.
9. Лурье А.А. Хроматографические материалы // М: Химия. – 1978. – 439 с.

10. Наркотичні засоби, психотропні речовини та прекурсори: Словник довідник для працівників правоохоронних органів // Г.П.Петюнін, А.М. Полях, В.Ю. Шепітько. – Х.: Право, 2016. – 96 с.
11. Петюнін Г.П. Использование новых реактивов – проявителей при исследовании некоторых психотропных препаратов методом хроматографии в тонких слоях сорбента / Г.П.Петюнін, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Збірник наукових праць «Теорія та практика судової експертизи і криміналістики». 2013. – Вип.13. – С.300-305.
12. Петюнін Г.П. Модификация метода "ТСХ-скрининга" для некоторых контролируемых соединений / Г.П.Петюнін, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: Збірник науково-практичних матеріалів Харківського НДІ судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса. – Випуск 14, 2014. – С. 258-264.
13. Петюнін Г.П. Лужний гідроліз гідазепаму та його метаболітів / М.А. Савченко, Н.В. Гузенко, Г.П.Петюнін // Український медичний альманах. – Т. 17, № 1. – 2014. – С. 42-45.
14. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией. Учебное пособие / [Под ред. А.П.Арзамасцева]. – М.: «ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 239 с.
- 15.Хижниченко О.В. Разработка алгоритма аналитической диагностики факта употребления или отравления декстропропоксифеном / О.В.Хижниченко, Г.П.Петюнін // Український медичний альманах. – Т.16 (№ 1). – 2013. – С.103-104.
- 16.Фридрих Гейсс. Основы тонкослойной хроматографии. М.: Т. №I, II, 1999 р.