

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
НА ГРУППУ ВЕЩЕСТВ, ИЗОЛИРУЕМЫХ  
ЭКСТРАКЦИЕЙ И СОРБЦИЕЙ.  
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА**

Учебно-методическое пособие

Составители:  
Н.В. Мироненко,  
Н.А. Беланова

Воронеж  
Издательский дом ВГУ  
2016

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Взаимосвязь между содержанием токсиканта в биообъекте и интерпретацией результатов исследования .....	5
Особенности методологии клинико-токсикологического анализа .....	5
Особенности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа.....	8
ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
Правила отбора и характеристика биологических объектов .....	10
Осмотр объектов исследования и определение некоторых свойств .....	13
Предварительные испытания анализируемой пробы .....	14
Предварительная подготовка пробы .....	15
ЭКСТРАКЦИОННЫЙ СПОСОБ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ТОКСИКАНТА ИЗ БИОМАТЕРИАЛА .....	17
Основные понятия экстракции .....	17
Влияние различных факторов на процесс экстракции .....	18
Основные количественные характеристики процесса экстракции .....	20
Твердофазная экстракция .....	21
ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ .....	24
Принцип метода .....	24
Способы обнаружения и идентификации веществ методом ТСХ .....	27
Качественный анализ в ТСХ .....	28
Количественный анализ.....	29
Представление результатов исследований .....	29
Достоинства и недостатки ТСХ.....	29
<b>Лабораторная работа № 1.</b> Изолирование сильнодействующих лекарственных веществ из биологических жидкостей методом жидкость-жидкостной экстракции .....	30
<b>Лабораторная работа № 2.</b> Изолирование сильнодействующих лекарственных веществ из биологических жидкостей методом твердофазной экстракции.....	32
<b>Лабораторная работа № 3.</b> ТСХ-скрининг веществ кислотного и основного характера .....	33
ТСХ-скрининг в варианте «Toxi-lab».....	37
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ	
Производные барбитуровой кислоты.....	39

– лекарственные препараты и другие вещества кардиотоксичного действия: адреноблокаторы, антагонисты кальциевых каналов, сердечные гликозиды, антиаритмические препараты, клофелин;

– лекарственные препараты и другие вещества судорожного действия: тубазид, трициклические антидепрессанты;

– лекарственные препараты и другие вещества холинолитического действия: антигистаминные, противопаркинсонические средства;

– алкоголь и суррогаты алкоголя, другие спирты: метиловый, этиленгликоль, изопропиловый.

Примеры симптомов острых отравлений различными токсикантами представлены в табл. 1–2.

Т а б л и ц а 1

*Симптомы острых отравлений (примеры)*

Клинические проявления	Симптомы	Токсиканты
Нарушение общего состояния	Беспокойство, возбуждение	Кокаин, стимуляторы центральной нервной системы
	Неподвижность, кома	Снотворные средства, органические растворители
Неврологические расстройства	Нарушения, зафиксированные на электроэнцефалограмме	Центральные нейролептики
	Нарушения моторных функций	Бензодиазепины, алкоголь
	Нарушения речи	Алкоголь, наркотики
	Нарушения двигательных функций	Наркотики, бутирофеноны, карбамазепин
Расстройства психики	Психозы, дезориентация, ступор	Наркотики, симпатомиметики, алкоголь
Изменение артериального давления	Гипотония	Трициклические антидепрессанты
	Гипертония	Кортикостероиды, стимуляторы центральной нервной системы
Изменение температуры тела	Гипертермия	Амфетамины, динитрокрезол
	Гипотермия	Алкоголь, бензодиазепины
Нарушение частоты дыхания	Депрессия	Опиаты, барбитураты, бензодиазепины
	Гиповентиляция	Салицилаты

Т а б л и ц а 2

*Цвет мочи при острой интоксикации (примеры)*

Цвет мочи	Токсикант
Красный/ розовый	Ампицилин, анилин, ибупрофен, фенитоин, хинин, рифампицин
Оранжевый	Варфарин, рифампицин
Ржаво-коричневый	Хингамин, нитрофурантоин

Клинико-токсикологический анализ проводят в следующих случаях:

- для установления различия между опьянением и отравлением;
- для установления информации о пациенте при отсутствии таковой (например, частота и интенсивность потребления наркотиков, алкоголя, случаи интоксикации в прошлом и т.д.);
- при комплексных отравлениях, например, наркотиком и алкоголем или метанолом и этанолом;
- при отравлении без выраженной клинической картины, например, при отравлении парацетамолом;
- когда метод и интенсивность лечения зависят от концентрации токсиканта в организме;
- при необходимости отличить терапевтические и токсические концентрации вещества в организме.

Объектами клинико-токсикологического анализа при острых отравлениях, как правило, являются кровь, сыворотка или плазма, моча, содержимое желудка (промывные воды), слюна. Кровь, сыворотку или плазму в количестве до 10 мл обычно отбирают при поступлении больного. В большинстве случаев отбор мочи затруднен, поэтому проводят катетеризацию и отбирают мочу в количестве до 50 мл. В содержимом желудка (при пероральном отравлении) обычно находится действующее вещество в высокой концентрации, поэтому собирают промывные воды. Слюну отбирают в пробирки (специальные пластмассовые контейнеры) при необходимости.

При экспресс-диагностике острых отравлений применяют:

- иммунохроматографические и иммуноферментные методы;
- ферментативные методы;
- хроматографические методы;
- спектральные методы;
- цветные реакции;
- биохимические методы.

В клинических лабораториях широко используют метод ВЭЖХ и экспертные системы, обеспечивающие проведение исследования биообразцов на нескольких колонках с последующим детектированием в УФ- и видимой области спектра и позволяющие на основе сопоставления времен удерживания и характеристик поглощения света с банком данных по токсикологически значимым веществам в автоматическом режиме идентифицировать и количественно определять до нескольких сотен веществ и их метаболитов.

При проведении клинико-токсикологического анализа используют хроматографические (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ), спектральные и комбинированные методы исследования. ТСХ используют, главным образом, при исследовании мочи и содержимого желудка. Из-за недостатка времени обычно применяют ограниченное количество хроматографических систем и способ последовательной обработки пластин различными проявляющими реактивами.

### *Особенности интерпретации результатов химико-токсикологического анализа*

При интерпретации данных ХТА необходимо учитывать многие факторы, имеющие значение для корректной оценки результатов. При выполнении клинико-токсикологического анализа необходимо учитывать принятую дозу, способ и частоту введения, толерантность к действию токсичных веществ, время, прошедшее с момента отравления, особенности тканевого распределения токсикантов. При этом значимость медико-правовой классификации смерти (причинении ущерба) и правильного отбора образцов всегда остается приоритетной.

Достоверное количественное определение токсикантов в крови, печени, содержимом желудка и других биообъектах является надежной основой для интерпретации полученных результатов ХТА. Токсичные и летальные дозы известны для многих соединений и отражены в различных справочных материалах.

Должно быть обязательно проведено исследование на соответствие терапевтической дозы принятого потерпевшим лекарственного препарата и его концентрации, обнаруженной в биологических образцах в результате ХТА (даже если причина смерти иная).

Эксперт должен различать случаи хронического использования высоких доз токсичного вещества (лекарственного средства) и острого отравления при передозировке. Случаи хронического и острого отравления можно различить, если сопоставить концентрации токсичного соединения и его метаболитов в крови. Как правило, более высокая концентрация метаболита в крови свидетельствует о хроническом применении, а значительное превышение концентрации токсиканта над концентрацией метаболита – об остром отравлении. Причина смерти не может быть установлена только на основании данных о концентрации токсичного вещества в крови. Равные концентрации токсичных веществ в печени и крови будут свидетельствовать о хроническом использовании высоких доз. В случае острого отравления концентрация токсиканта в печени будет значительно превышать концентрацию в крови.

Знание способа введения токсичного соединения в организм также имеет значение, во-первых, для определения максимальной концентрации токсиканта и времени, за которое эта концентрация достигнута, во-вторых, для правильной интерпретации результатов, полученных при анализе образцов различных органов. Внутривенное введение и ингаляция первоначально дают более высокую концентрацию токсичного вещества в крови, в то время как оральное и подкожное введение вследствие медленного всасывания – более низкую концентрацию. При внутривенном введении или ингаляции в печени обнаруживается более низкая концентрация токсиканта, чем при оральном введении. Для оценки быстро всасывающихся веществ

необходимо знать их концентрации в крови и печени. При оральном приеме большой дозы почти всегда концентрация токсиканта в печени более чем в 3 раза превышает таковую в крови, в то время как после внутривенного введения его концентрации в печени и крови почти равны. Высокая концентрация токсиканта в крови на раннем этапе после внутривенного и орального введения будет соответствовать более высокой концентрации в легких и печени, в то время как в период выведения концентрации в желчи и моче будут более высокими по сравнению с концентрацией в крови. В то же время концентрация метаболитов может быть выше концентрации исходного соединения почти во всех тканях, что особенно важно в отношении метаболитов, обладающих фармакологической активностью.

Токсичные вещества основного характера дают относительно низкие концентрации в крови, и соотношение концентрации в печени и крови обычно превышает отношение 10 : 1.

Соединения кислотного характера дают умеренно высокие концентрации в крови, и отношение концентрации токсиканта в печени к концентрации в крови составляет 2 : 1–5 : 1.

Для нейтральных соединений характерна очень высокая концентрация в крови и почти одинаковое распределение в других тканях.

Если моча недоступна для тестирования, то она может быть заменена экстрактом или фильтратом содержимого желудка. Скрининговые исследования на лекарственные препараты содержимого желудка недостаточны, чтобы определить все потенциальные токсиканты. Например, лекарственные средства, обычно применяемые внутривенно, при курении или ингаляционно, не могут проникнуть в желудок в детектируемых количествах, поэтому их обнаружение проводят иммунохимическими методами в крови или плазме.

Вместо скрининговых исследований мочи (если моча недоступна) проводят исследование содержимого желудка, крови, гомогенатов тканей. Полученные результаты должны быть сопоставлены с данными ИХМ, полученными при исследовании плазмы крови или скрининга веществ основного характера в крови методом ГЖХ. ГЖХ-скрининг веществ основного характера крови более чувствителен, чем таковой содержимого желудка, но также и более трудоемок.

В тех случаях, когда первоначальный хроматографический скрининг дает неидентифицированные пятна при ТСХ или неидентифицированные пики на хроматограмме (ГЖХ) в отсутствие нужных стандартных веществ сравнения, образец в дальнейшем может быть подвергнут скринингу методом ГХ–МС.

Для интерпретации результатов ХТА обязательно сопоставляются обстоятельства дела, результаты вскрытия, клинические данные и результаты исследования, а также информация о специфических физиологических реакциях, обусловленных действием того или иного токсиканта.

## ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Правила отбора и характеристика биологических объектов*

Пробоподготовка – стадия риска потерять анализируемое вещество и объект. Поэтому все предпринимаемые действия должны быть логически оправданы и направлены на сохранение образцов, отобранных для анализа, для дальнейшего исследования.

*Моча* – наиболее распространенный объект исследования на лекарственные токсичные соединения и наиболее простой биообъект для анализа вследствие низкого содержания белковых компонентов.

Моча собирается в стеклянный или пластмассовый градуированный сосуд с широким горлом объемом до 200 мл в количестве до 100 мл, но не менее 30 мл. Сосуд с мочой накрывается покровной пластиной (крышкой).

В течение первых 5 минут проводится предварительное исследование мочи, включающее определение следующих показателей:

- температуры (не более чем через 4 минуты после отбора мочи) стеклянным ртутным термометром (в норме температура находится в пределах 32,5–37,7 °C);

- pH с помощью универсальной индикаторной бумаги для определения pH мочи (в норме pH мочи в интервале 4–8 ед. pH);

- относительной плотности (в норме относительная плотность в пределах 1,008–1,025 г/см<sup>3</sup>);

- содержания креатинина методом иммунной хроматографии – иммунохроматографическими тестами (в норме содержание креатинина 4,4–17,7 ммоль/сут).

После проведения предварительных исследований мочу делят на две части (1/3 и 2/3 общего объема) и помещают их в два стеклянных или пластмассовых герметично закрывающихся контейнера объемом 100 мл каждый. Первый контейнер с меньшим количеством мочи хранится как контрольный образец. Вторым (анализируемый образец) используется для проведения химико-токсикологических исследований. Для контрольного образца мочи используются контейнеры с контролем первого вскрытия.

Важным показателем мочи как биообъекта является pH, поэтому работа с ней требует постоянного внимания к изменению pH. Величина pH мочи повышается со временем из-за действия бактериальной флоры, выделяющей аммиак. Такое увеличение можно предотвратить путем хранения ее при пониженных температурах (при анализе очень лабильных веществ – в замороженном виде). Необходимо учитывать также, что при хранении мочи в холодильнике в ней происходит новообразование этанола до концентрации 0,5 ‰. Вместе с тем следует помнить, что при большом объеме воздушного слоя во флаконе над кровью или мочой происходит окисление алкоголя и снижение его содержания в объекте.