МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Присвячується пам'яті
доктора фармацевтичних наук, професора
Геннадія Павловича Петюніна

О. В. ЧУБЕНКО, Н. В. ГУЗЕНКО, О. В. ЧОРНА

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ ДЛЯ АНАЛІЗУ НІТРОГЕНВМІСНИХ СПОЛУК

Монографія

За загальною редакцією доцента *О. В. Чубенка*

Харків
ХНМУ
2024

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24

Рекомендовано до друку вченою радою
Харківського національного медичного університету
(протокол № 10 від 31 жовтня 2024 р.)

Р е ц е н з е н т и:

О.Ю. Гончарова, кандидат медичних наук, доцент, завідувач кафедри психіатрії та наркології ННІПО Харківського національного медичного університету

С.В. Баюрка, доктор фармацевтичних наук, професор кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету

Т.Є. Кириленко, завідувач відділенням судово-медичної токсикології ДСУ «Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи»

Використання методу хроматографії в тонких шарах сорбенту для аналізу нітрогенвмісних сполук / О. В. Чубенко, Н. В. Гузенко, О. В. Чорна. – Х.: ХНМУ, 2024. – 157 с.

Наукове видання містить теоретичні та практичні матеріали з використання методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту в токсикологічному аналізі нітрогенвмісних сполук. Ця група речовин включає в себе деякі наркотичні, психотропні та лікарські засоби, які є об’єктами аналізу. Наведені доробки можуть бути використані як фрагменти скринінгу, який здійснюють методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, проведенню групового, внутрішньогрупового виявлення означених речовин.

Призначене для фахівців з аналітичної токсикології: лікарів судово-медичних експертів токсикологів, експертів токсикологів судових, лікарів – лаборантів клініко-діагностичних лабораторій, які здійснюють токсикологічні дослідження в спеціалізованих закладах охорони здоров’я.

157 стор., 3 рис., 40 табл., 10 схем, список літератури 53 посилання.

УДК 543.544

© О.В. Чубенко, Н.В. Гузенко, О.В. Чорна, 2024
© ХНМУ, 2024

ЗМІСТ

ЗМІСТ 3

ПЕРЕДМОВА 5

ТЕРМІНИ ТА УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ 6

ВСТУП 8

ЗАГАЛЬНА ЧАСТИНА 11

І. ДЕЯКІ ПИТАННЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ (ХТШС) 11

1.1 Нерухома фаза 14

1.2 Рухома фаза 16

1.3 Хроматографічні камери 18

1.4 Візуалізація речовин на пластинках 18

ІІ. ОСОБЛИВОСТІ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ В ТОКСИКОЛОГІЧНОМУ АНАЛІЗІ 20

2.1 Стадія «виявлення» аналіту 21

2.2 Використання параметрів хроматографічної рухливості речовин 22

2.3 Заходи по створенню та підтримуванню належних умов при здійсненні аналізу методом ХТШС 30

2.4 «ТШХ–скринінг» 32

2.5 Аналіз нітрогенвмісних сполук 44

2.5.1 Речовини з первинною та вторинною аміногрупами 44

2.6 Речовини з третинною аміногрупою 57

2.6.1 Речовини першої групи 57

2.7 Хроматографічний розподіл структурних аналогів 64

2.7.1. Виявлення структурних аналогів за допомогою реактивів - проявників 65

2.8 Вивчення хроматографічної рухливості структурних аналогів 68

2.8.1 Оптимізація рухомої фази для ідентифікації структурних аналогів 70

2.8.2 Вибір рухомої фази для ідентифікації структурних аналогів та деяких інших наркотичних речовин 75

2.9 Виявлення структурних аналогів та деяких наркотичних та психотропних речовин методом міцелярної ТШХ 80

2.10 Виявлення кетаміну, фенциклідину та трамадолу при одночасній присутності 86

2.11 Дослідження речовин з третинною аміногрупою та їх метаболітів.....94
ПІСЛЯМОВА.....107
ВИСНОВКИ.....108
ДОДАТКИ.....110
ЛІТЕРАТУРА.....148

Монографія присвячується світлій пам'яті
нашого вчителя та керівника
заслуженого винахідника України, члена Міжнародної асоціації судових
токсикологів (TIAFT), завідувача кафедри клінічної біохімії,
судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії
післядипломної освіти, доктора фармацевтичних наук, професора
ПЕТЮНІНА ГЕННАДІЯ ПАВЛОВИЧА

ПЕРЕДМОВА

На сьогодні актуальною проблемою в Україні є створення схеми систематичного токсикологічного аналізу, першим етапом якого є розробка «скринінгу», в основу якого положено метод хроматографії в тонких шарах сорбенту. Нітрогенвмістні сполуки є однією з важливих груп токсикантів, до складу якої входять наркотики та лікарські засоби. Тому, метою цієї роботи було узагальнення доступних та експериментально отриманих даних щодо виявлення цієї групи речовин означеним методом.

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

ДМА – 2,5-диметоксіамфетамін

ДМФ –декстрометорфан

ДПФ – декстропропоксифен

МДМА – 3,4-метилендіоксиамфетамін

Наркотик (від грец. *Narkoticos* – той, що призводить до заціпеніння, одурманюючий) – це речовини, які спричиняють отруєння організму та здатні викликати психічну чи фізичну залежність

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

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

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

ГХ – газова хроматографія

ГХ-МС – газова хроматографія з масспектрометричним детектором

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ІФА – імуно-ферментний аналіз

ХТШС – хроматографія у тонкому шарі сорбенту

НФ та ОФ – нормально та обернено фазні механізму розподілу

«ТШХ–скринінг» – екпериментальне виявлення невідомих речовин методом ХТШС

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

УФ – ультрафіолетове випромінювання

pH – обернений логарифм концентрації іонів оксонію (H_3O^+) в розчині

FPN – Ferric (III) chloride – Perchloric acid – Nitric acid

pKa – ступінь дисоціації іонів гідрогену (H^+) з кислоти в розчині

TIAFT – The International Association of Forensic Toxicologists

НАЗВИ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Дифенгідрамін – дімедрол

Доксиламін – донорміл

Клонідін – клофелін

Фенілефрин – мезатон

ВСТУП

Токсикологічний аналіз має принципові відмінності від будь-якого іншого, наприклад клінічного або фармацевтичного аналізу тим, що проводиться в два етапи.

Це викликано, по-перше, відсутністю будь-якої інформації про речовину, що призвела до отруєння; по-друге, більш жорсткими вимогами, які висуваються 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 достовірні результати.

Найбільш часто для скринінгу використовується метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ХТШС), який дозволяє одночасно проводити аналіз декількох класів речовин. Враховуючи, що постраждалі від токсикантів часто приймають декілька речовин, наприклад випадки полінаркоманії [1, 2, 3] – коли людина вживає кілька різних наркотичних або психотропних речовин одночасно, то використання ХТШС є найбільш ефективним методом скринінгу, який дозволяє впевнено “відсіяти” групи засобів, які не є метою дослідження, і які, можливо, присутні в матриці [4]. Негативні результати методу ХТШС приймаються як остаточні, і підтверджуючі дослідження на ці групи речовин вже не проводяться [5].

Переваги методу ХТШС не втратили своєї актуальності й в теперішній час:

1. пластини для ХТШС є одноразовими; підготовка проби не така затратна як в інших методах;
2. зразки аналізуються паралельно, відповідно пропускна здатність є вищою;
3. витрати розчинників та експлуатаційні витрати нижчі ніж у інструментальних методах;

4. виявлення токсикантів базуються на двох можливостях методу: визначення хроматографічної рухливості та підтвердження очікуваних хімічних властивостей токсиканту відповідними реагентами;
5. дослідження може бути виконане незалежно від часу та місця.

Крім цього, весь зразок залишається видимим для аналітика, і не може бути втрачений, як в методах високоефективної рідинної хроматографії (елюювання з фронтом розчинника) та газової хроматографії (або втрачено в передколонці, або в випарнику). Сучасна ХТШС, безумовно, може бути проведена за допомогою приладів з автоматизованою складовою для кількісної оцінки та зняття спектрів. ХТШС в першу чергу підходить для аналізу органічних сполук (наркотичні речовини та лікарські препарати), з характеристичними функціональними групами, здатними до візуалізації селективними реактивами.

Слід зауважити, що токсикологічний аналіз може проводитись по двом направленням:

1. ***Спрямований пошук.*** Він може бути застосований, коли присутність певного препарату, або певного класу речовин (наприклад, наркотиків) випливає з завдання, яке отримує токсиколог, або з обставин справи. В деяких випадках задача аналізу полягає лише в обмеженій кількості речовин (наприклад, при тестуванні на робочому місці або допінгу). В цих випадках, аналітичний підхід може бути орієнтований на конкретний токсикант який цікавить – як для виявлення, так і до його ідентифікації.

2. ***Ненаправлений пошук.*** Той випадок, коли немає ніякої інформації про можливий токсикант і токсиколог повинен виконати широкий пошук речовин різних груп. Це також називається загальним аналізом і складається з серії аналітичних процедур скринінгу з метою встановлення або усунення присутності якомога більшої кількості токсичних агентів. Слід зазначити, що останнє може бути так само важливим, як встановлення самого токсиканту. Звичайно, коли маєш справу з «загальним» аналізом, то перед фахівцем стоїть

величезне завдання, і не можна просто очікувати, що в зразку буде проведено аналіз на наявність усіх потенційно шкідливих речовин протягом розумного періоду часу. Отже, має бути обраний системний підхід, який забезпечує прийнятні умови між повнотою аналізу, його чутливістю та вибірковістю та часом, витраченим на аналіз. Отже, «загальним» також називається систематичний токсикологічний аналіз, який може бути визначений як логічний хіміко-аналітичний пошук потенційно шкідливих речовин, присутність яких та їх природа невідомі [6].

Поза всяким сумнівом, скринінг у судовій токсикології, ймовірно, є найважливішим етапом всього дослідження. Про ідентифікацію та кількісне визначення можна говорити лише тоді, коли потенційний токсикант достовірно виявлений серед великої кількості ендогенних речовин ефективним методом «ТШХ–скринінгу».

ЗАГАЛЬНА ЧАСТИНА

І. ДЕЯКІ ПИТАННЯ ПО ЗАСТОСУВАННЮ МЕТОДА ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ (ХТШС)

Метод хроматографії в тонких шарах сорбенту є одним з найпоширеніших методів хроматографії які знайшли 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 багатокомпонентні лікарські засоби.

Завдяки своїй доступності, високій чутливості, широким можливостям, простоті проведення досліджень та низькою вартістю реактивів, ХТШС стала найпоширенішим скринінговим методом виявлення токсичних речовин.

В токсикологічному аналізі, виняткові риси ХТШС використовуються для широкомасштабного скринінгу при аналізі наркотиків та отрут в сечі та іншому біологічному матеріалі. В ідеалі для цього повинно бути відповідне обладнання, додатки у вигляді спеціалізованого програмного забезпечення та довідкових бібліотек, які випускаються закордонними виробниками.

В порівнянні, наприклад, з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ), ТШХ дозволяє виявляти сполуки, які погано поглинають УФ-

випромінювання, завдяки використанню достатньо селективних хімічних реакцій для візуалізації речовин, які досліджуються.

В порівнянні з ГХ або ГХ-МС, ХТШС дозволяє хроматографувати полярні сполуки без попередньої дериватизації. Ще одним важливим додатком в ХТШС є первинний скринінг наркотиків, хоча переваги сполучення ІФА та ГХ-МС в цій галузі перешкоджають розвитку сучасних ХТШС методів. «ІФА – скринінг» є вразливим у зв'язку з більшою можливістю фальсифікації проби та високою інтерференцією. Наприклад, тест-системи "Пропоксифен", призначені для виявлення декстропропоксифену, мають перехресну реактивність до трамадолу і його метаболітів та дають хибно-позитивні результати із зразками сечі, що містять трамадол і його метаболіти [7].

Таким чином, широкий спектр методів, наявних сьогодні в лабораторіях включно з ХТШС, вважаються доповнюючими, а не взаємовиключними.

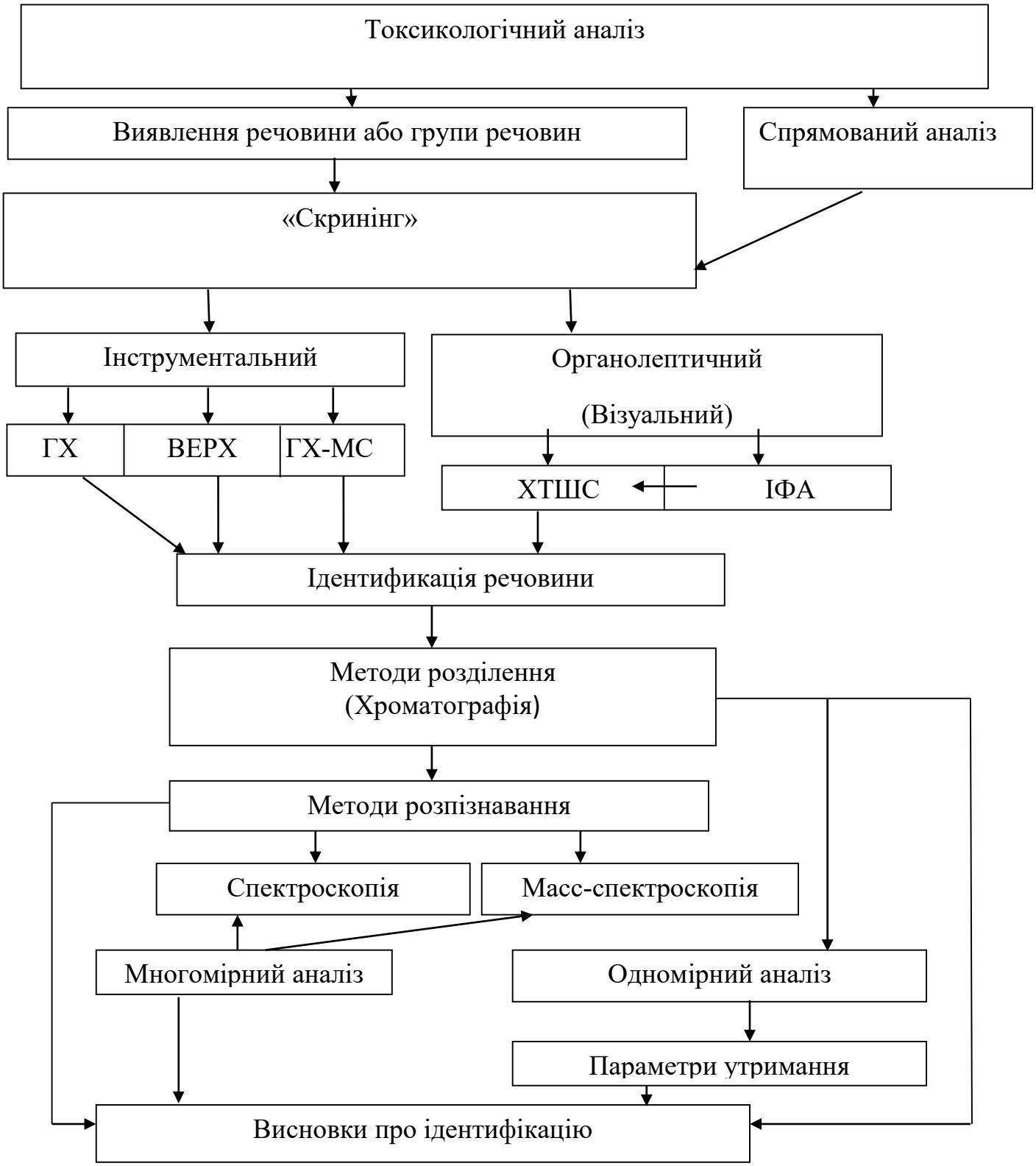
При використанні методу ХТШС завжди слід пам'ятати, що розділення протікає «у відкритій хроматографічній системі», тому багато чинників впливають на результати аналізу.

На схемі 1 показано місце методу ХТШС в токсикологічному аналізі.

Схема 1

Місце методу хроматографії в тонких шарах сорбенту

в токсикологічному аналізі



Метод ХТШС поєднує в собі два механізми взаємодії нерухомої фази з аналітом – це адсобція та розподіл. В деяких випадках перевагу має один з механізмів, а другий виконує допоміжну роль або може бути просто не бажаним.

1.1 Нерухома фаза

Нерухома фаза (сорбент) утворює шар, який нанесено на інертну поверхню з полімерних матеріалів або алюмінію, і все це разом 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 пластинок (15х15 або 10х10, 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 відповідати наступним вимогам:

- речовина не повинна розчинятися в рухомій фазі;
- речовина не повинна хімічно взаємодіяти з аналітом 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 ортосилікатної кислоти шляхом поліконденсації. Силікагель має силанольні групи, які діють як донори протонів із значенням pKa = 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 °С, і, таким чином, активні силанольні групи звільняються від молекул води.

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

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

Прикладом пластинок з прищепленими групами можуть бути пластинки з обернено-фазним механізмом розподілу (пластинки з RP-шарами). Їх використання не замінює пластинки 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 в разі співпадаючих характеристик пластинки на них можливо отримати різні дані по хроматографічній рухливості однієї речовини (наприклад, хроматографічні пластинки 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 пластинки з імпрегнованими шарами. Після цього на пластинці креслять простим твердим олівцем лінію старту.

1.2 Рухома фаза

Велике значення для проведення аналізу методом ХТШС має 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 використовуються в тонкошаровій хроматографії, є елююча сила. Вона має різні значення (див. Табл.1).

Таблиця 1

Зростання елюючої сили розчинників в залежності від природи сорбенту

Силікагель	**Al_2O_3**
н-гексан	пентан
пентан	н-гексан
циклогексан	циклогексан
чотирихлористий вуглець	чотирихлористий вуглець
толуол	толуол
хлороформ	діетиловий ефір
дихлорметан	хлороформ
діетиловий ефір	дихлорметан
оцтова кислота	ацетон
ацетон	оцтова кислота
етанол	піридин
метанол	етанол
піридин	метанол
вода	вода

На противагу елюотропним рядам було розроблено систему 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.

Для її успішного використання потрібно мати органічні розчинники, з яких ця система складається. Розчинники повинні мати певний клас чистоти, їх склад не може мати домішки, які б спотворювали результат хроматографічного розподілу. Кожна з індивідуальних речовин має свою величину сили розчинника, яка складається з його хроматографічних характеристик. Слід зазначити, що у випадку змішування індивідуальних компонентів в системі розчинників їх характеристики, такі як «елююча сила» або «сила розчинника», втрачають значення, так як система розчинників набуває своєї характеристики в 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 пластинки та лінією старту. Якщо нема спеціальних зауважень про насичення камери, то до неї в той же час занурюють пластинку і проводять хроматографування. В разі потреби в насиченні камери, використовують фільтрувальний папір, який розташовують на стінках камери. Після просякнення його системою розчинників, камера є насиченою. В разі

спеціальних зауважень, можливе насичення камери певний час згідно методики, яку використовують.

1.3 Хроматографічні камери

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

Використовують два типи камер:

– нормальні з об’ємом 500 дм^3;

– “сендвіч”–камери, в яких відстань між хроматографічною пластинкою та стінкою камери менше ніж 3 мм.

Хроматографічну пластинку, після нанесення зразків, занурюють в систему розчинників. Хроматографічну камеру відразу герметично закривають кришкою та очікують, поки система розчинників підніметься по пластинці на відстань ≈ 8,5 см, після чого пластинку витягають, висушують та здійснюють візуалізацію.

1.4 Візуалізація речовин на пластинках

Візуалізацію речовин на хроматографічній пластинці проводять за допомогою декількох методів:

1. Опромінювання УФ-світлом:

Маркування на хроматографічній платинці може свідчити про наявність в складі сорбенту речовини, яка здатна до флюоресценції. В такому разі при опроміненні УФ-світлом з довжиною хвилі 365 нм або 366 нм на пластинці можуть проявитися тьмяні або сяючи плями на сяючому фоні іншого забарвлення.

2. Використання хімічного реагенту для проявлення пластинки:

Для візуалізації речовин на пластинках використовуються реактиви – проявники різної хімічної природи (див. Додаток 1), серед яких є реактиви–окиснювачі, реактиви–комплексоутворювачі та інші. Речовини які проявляють,

вступають в хімічну взаємодію з реактивами–окислювачами, які руйнують речовини з утворенням плям одного забарвлення, або утворюють з речовинами комплексні сполуки одного або різного кольору, або вступають в хімічну взаємодію в залежності від наявності функціональних груп в речовині, яку хроматографували.

Окрім цього, реактиви поділяються за призначенням для застосування у токсикологічному скринінгу (див. Додаток 2), а також після застосування деяких реактивів можа зробити незаперечний висновок про відсутність групи речовин або індивідуальної речовини (див. Додаток 3). Всі реактиви, які використовують для проявлення, поділються ще й за специфічністю (див. Додаток 4). Рецетуру їх виготовлення наведено в Додатку 5.

Хімічні реагенти для візуалізації наносять на пластинку у вигляді аерозолю в спеціальній камері за допомогою спеціального розприскувача або крапельно [8]. Швидко зникаючі плями фіксують за допомогою простого олівця. Результати хроматографічного розподілу в разі необхідності можуть бути зафіксовані за допомогою цифрової фотографії або сканування.

ІІ. ОСОБЛИВОСТІ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ В ТОКСИКОЛОГІЧНОМУ АНАЛІЗІ

Ідентифікація невідомої речовини в токсикологічному аналізі методом ХТШС має деякі особливості. Як відомо, якісний аналіз, проведений цим методом, засновано на визначенні хроматографічної рухливості невідомої речовини, місце якої на хроматограмі виявляють за допомогою реактиву – візуалізатора. Найчастіше його успішне застосування залежить тільки від його чутливості щодо аналіту, забарвлення та контрастності плями, яка утворюється в результаті хімічної взаємодії між реактивом і токсикантом. Співпадаючі параметри аналізу, отримані щодо токсиканту і речовини стандарту, які здійснено в одних і тих самих хроматографічних умовах, дозволяють говорити про виявлення невідомої речовини.

Перед фахівцем при проведенні токсикологічного аналізу методом ХТСШ може бути поставлено два варіанти завдань, це:

1. Повне дослідження на невідому речовину (лікарські, наркотичні, психотропні речовини, пестициди та ін.).

2. Спеціальне завдання на конкретну речовину або групу речовин, об'єднаних спільністю ознак (будова, фармакологічна дія та т.п.). Друге завдання не набагато відрізняється від першого, так як у разі виявлення невідомої речовини та не виявлення цільового аналіту дослідження необхідно продовжувати.

При здійсненні повного дослідження на невідому групу речовин (лікарських, наркотичних, психотропних, пестицидів та ін.) використовують «ТШХ–скринінг».

Послідовність виконання операцій при «ТШХ–скринінгу» наступна: виявлення аналіту, встановлення його групової приналежності та проведення внутрішньогрупового дослідження з виходом на конкретний токсикант (див. Схему 2).

Схема 2

2.1 Стадія «виявлення» аналіту

На цій стадії сигналом про присутність невідомої речовини є пляма на хроматографічній пластинці, яка виникла внаслідок взаємодії з певним реактивом.

Для встановлення присутності органічної речовини такі реактиви містять у своєму складі сильні неорганічні кислоти, окиснювачі або їх суміші. Наявність плям з такими реактивами свідчить про присутність в екстракті органічних речовин.

Для встановлення гідрофобності або гідрофільності речовин, пластинку обприскують дистильованою водою – гідрофобні речовини утворюють білі плями.

Обов'язковим елементом «ТШХ–скринінгу» є опромінення пластинки УФ-світлом (УФ – ультрафіолетове) при двох довжинах хвиль: 254 та 366 нм.

Флюоресценція або гасіння випромінювання свідчить про присутність речовини. При цьому обов'язково слід враховувати чи містить тонкошарова пластинка УФ добавки в своєму складі.

Як правило, використовують загально відомі реактиви з достатньо високою чутливістю, але низькою селективністю. Після їх застосування, дослідник робить, в першу чергу, висновок про відсутність речовини або групи речовин в екстракті.

Реактиви, які застосовуються в «ТШХ–скринінгу» часом не можливо однозначно визначити як чутливі та неселективні і навпаки. Їх успішне використання залежить від належної послідовності їх застосування для встановлення групової приналежності речовин та виходу на індивідуальну речовину (див. Додатки 3, 4).

Таким чином, спочатку використовують чутливі реактиви, а потім специфічні. В деяких випадках цей поділ не має значення.

2.2 Використання параметрів хроматографічної рухливості речовин

Варіант «ТШХ–скринінгу», який використовують в наших токсикологічних лабораторіях, насамперед, спрямований на отримання негативного результату в групах речовин, об'єднаних кислотно-основними властивостями, а в разі позитивних результатів в одній з груп, здійснюється перехід до внутрішньогрупової ідентифікації. При чому, ця схема дає збої у випадку препаратів, які утворюють забарвлення тільки одним з реактивів (наприклад, реактив Драгендорфа за Мун’є).

Послідовність використання ідентифікаційних параметрів наступна: виникнення забарвлених плям з конкретними реактивами, а потім хроматографічна рухливість виявленої речовини. Тобто експерт заздалегідь знає, де він може очікувати присутність групи речовин або конкретної речовини. Характеристика хроматографічної рухливості характеризується в

термінах «знаходиться високо» або «ближче до лінії старту», і після цього проводять попередню ідентифікацію речовини за величиною *Rf*.

Для здійснення подальшого виявлення невідомої речовини, яка дала відповідні плями на хроматографічній пластинці потрібно визначити її хроматографічну рухливість. Для цього розраховують *Rf* – показник, який дорівнює відношенню відстані, яку проходить аналіт, до відстані, яку проходить система розчинників. Після його розрахунку можливо зробити висновок про попередню ідентифікацію речовини.

Цей показник *Rf* або *hRf* (*Rf* × 100) буде індивідуальним відносно однієї речовини у відповідній системі розчинників та умовах хроматографічного розподілу. При здійсненні «ТШХ–скринінгу» застосовують фіксовані системи розчинників у відповідності до кислотно-лужних екстрактів. Для «кислих» систем (наприклад, хлороформ – етанол (9:1)) речовини можуть розташовуватись по всьому шляху хроматографічного розподілу.

Для «лужного» екстракту, в разі систем розчинників, які мають у своєму складі відповідний модифікатор (25% розчин аміаку), місце знаходження плям речовин буде залежати від їх величини *pKa* (ступеню дисоціації іонів гідрогену (H^+) з кислоти в розчині) – чим лужні властивості вище, тим показник *Rf* матиме значення наближене до 1 (плями будуть ближче до лінії фінішу).

В різних варіантах «ТШХ–скринінгу», по отриманим значенням *Rf* та забарвленню плям, отриманих з відповідним реактивом проявником, здійснюють попередню ідентифікацію невідомої речовини або встановлюють групову приналежність невідомої речовини.

Наприклад: існують варіанти скринінгу [9], де місце знаходження плями розглядають як розташування речовини в певній зоні, до якої разом з виявленою речовиною можуть належати ще декілька речовин. Таким чином, пошук конкретної речовини звужується приналежністю до групи, яка поєднана хроматографічною рухливістю певних речовин в певній системі розчинників.

У разі «ТШХ–скринінгу», цінність параметрів, які одержуються, зростає в ряду «абсолютні значення *Rf*» → «відносні значення *Rs*» → отримання

уточнених даних значень *Rf*, з використанням референтних сумішей. Розрахунок останнього параметра наводиться в матеріалах TIAFT [10] та інших джерелах не стільки для перевірки розподільної здатності системи, але, в основному, для отримання уточнених даних для їх використання у виявленні конкретної речовини. (див. Табл. 2)

Таблиця 2

Системи розчинників рекомендовані Міжнародним Комітетом з систематичного токсикологічного аналізу

н\р	**Система**	**Адсорбент**	**Речовина порівняння**	**hRf**	**Пошукове вікно**
Rf1	Хлороформ – Ацетон (80:20)	Силікагель	Парацетамол Клоназепам Секобарбітал Метилфенобарбітал	15 35 55 70	2,3 (7)
Rf2	Етилацетат	Силікагель	Сульфатіазол Фенацетин Саліциламід Секобарбітал	20 38 55 68	2,7 (8)
Rf3	Хлороформ – Метанол (90:10)	Силікагель	Гідрохлотіазид Сульфафуразол Фенацетин Празепам	11 33 52 72	2,7 (8)
Rf4a	Етилацетат – Метанол – Аміак (25% р-н) (85:10:5)	Силікагель (кислі та нейтральні речовини)	Сульфадимідин Гідрохлотіазид Темазепам Празепам	13 34 63 81	3,7 (11)

н\р	Система	Адсорбент	Речовина порівняння	hRf	Пошукове вікно
Rf4b	Етилацетат – Метанол – Аміак (25% р-н) (85:10:5)	Силікагель (лужні речовини)	Морфін Кодеїн Гідроксизин Триміпрамін	20 35 53 80	3,3 (10)
Rf5	Метанол	Силікагель (камера роз-чинником не насичується)	Кодеїн Триміпрамін Гідроксизин Діазепам	20 36 56 82	2,7 (8)
Rf6	Метанол – н-Бутанол (40:60) 0,1 моль/л NaBr	Силікагель (камера роз-чинником не насичується)	Кодеїн Дифенгідрамін Хінін Діазепам	22 48 65 85	2,3 (9)
Rf7	Метанол: Аміак (25% р-н) (100:1,5)	Силікагель (імпрегнований 0,1 моль/л КОН та висушений)	Атропін Кодеїн Хлорпротиксен Діазепам	18 33 56 75	2,7 (9)
Rf8	Циклогексан – Толуол – Діетиламін (90:10)	Силікагель (імпрегнований 0,1 моль/л КОН та висушений)	Кодеїн Дезипрамін Празепам Триміпрамін	6 20 36 62	2,7 (8)
Rf9	Хлороформ – Метанол (90:10)	Силікагель (імпрегнований 0,1 моль/л КОН та висушений)	Дезипрамін Фізостигмін Триміпрамін Лідокаїн	11 36 54 71	3,7 (11)

н\р	Система	Адсорбент	Речовина порівняння	hRf	Пошукове вікно
Rf10	Ацетон	Силікагель (імпрегно-ваний 0,1 моль/л КОН та висушений)	Амітриптилін Прокаїн Папаверин Циннаризин	15 30 47 65	3,3 (9)

Загальні вимоги до здійснення «ТШХ–скринінгу», викладені TIAFT [10], полягають в наступному: це забезпечення адекватних підходів для виявлення токсикологічно значущих речовин; забезпечення компіляції достовірних аналітичних даних речовин, значущих для токсикології, з метою полегшення їх правильної ідентифікації. В принципі, це завдання було вирішено опублікуванням достовірних і порівняльних значень *Rf* для 1600 речовин в 10 системах розчинників, які використовують для цілей скринінгу. Це доповнюється двома спеціальними системами для пестицидів і однією спеціальною системою для похідних бензодіазепіну.

Для візуалізації речовин використовується набір стандартних проявників і, найголовніше, використання кодування забарвлень, які оцінюють за однозначною шкалою (див. Рис. 1):

1 – жовтий,

2 – помаранчевий,

3 – коричневий,

4 – червоний,

5 – пурпурний (рожевий),

6 – синій,

7 – зелений,

8 – відсутність забарвлення,

9 – чорний.

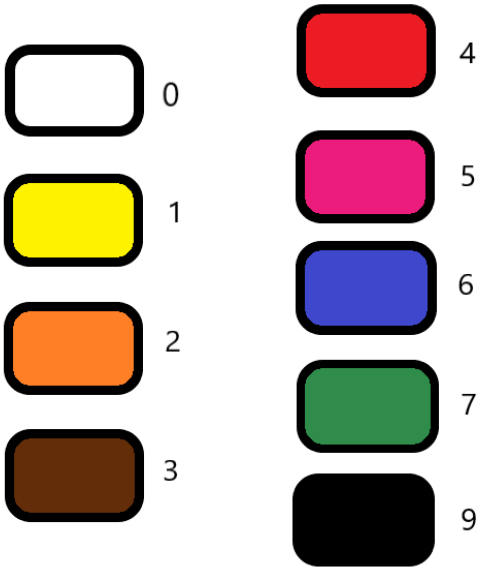


Рисунок 1. Кодування забарвлень

Якщо пляма показує більше одного кольору, то вибирається той колір який домінує; якщо центр плями відрізняється від обідка, беруть колір у центрі. Кольори залежать від концентрації та пляма кодується в сторону найбільш інтенсивного забарвлення. Тому колір позначають таким чином: з низькою концентрацією – L і високою – H.

Метод, який використовує чотири стандарти, структурно подібні з аналітом і лінійної інтерполяції між стандартами, використовують для скринінгу лікарських засобів і пестицидів. Отримані в результаті коригування значення *Rf* (*hRf*) відтворювані та ХТШС може практикуватися навіть в екстремальних умовах (наприклад, при високих температурах та вологості тропічних країн). Розрахунок здійснюють наступним чином:

$$hRf(X) = hRf(A) + \sim [hRf(X) - hRf(A)],$$

$$\text{где } A^{\circ} = hRf(B) - hRf(A)$$

$$\text{и } \quad A = hRf(B) - hRf(A)$$

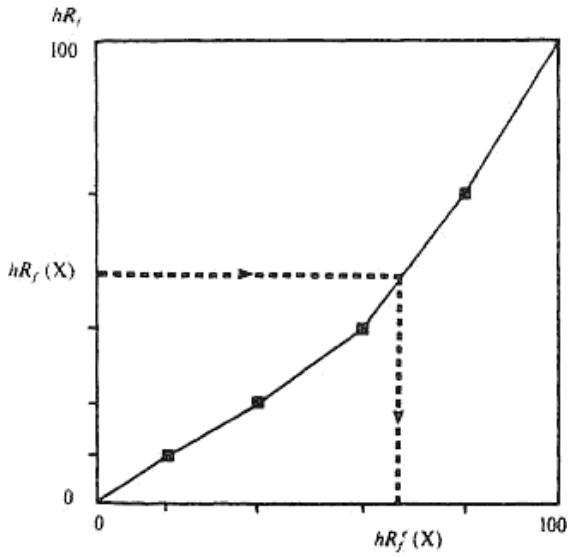


Рисунок 2. Ідентифікація виявленої речовини методом ХТШС

Після виявлення невідомої речовини та встановлення групової приналежності (або проведення попередньої ідентифікації невідомої речовини) здійснюють остаточну ідентифікацію методом ХТШС. Як і в інших аналітичних методах, ідентифікація індивідуальної речовини здійснюється двома шляхами – це використання загально відомого програмного забезпечення або порівняння отриманих результатів з речовинами стандартами. Останній варіант має вирішальне значення для метода ХТШС.

Для остаточної ідентифікації проводять хроматографічне розділення аналіту та речовини стандарту або речовини прийнятої за стандарт, з вирахуванням відносної величини *Rs* – відношення відстані, яку пройшов аналіт до відстані, яку пройшов стандарт.

Використання стандартів є запорукою правильно проведеного аналізу. До їх використання існують 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 холостого 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 такий, що не містить аналізованої речовини або будь-яких інших хімічних речовин. Холостий зразок аналізується для визначення систематичної помилки, що часто називається фоном.

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

Як проводять остаточну ідентифікацію:

Для проведення ідентифікації досліджувана проба ділиться на дві частини. Одна частина аналізується як така, а до другої додається відома кількість стандартної речовини. Дві частини хроматографують в однакових умовах, після візуалізації значення величин *Rf* аналіту зі значенням *Rf* стандарту повинно узгоджуватися в межах ± 5%. Візуально зовнішній вигляд аналіту не повинен відрізнятися від стандарту. Для плям одного і того ж кольору центр найближчої плями повинен відокремлюватися від центру плями аналіту, принаймні, половиною суми діаметру плям.

2.3 Заходи по створенню та підтримуванню належних умов при здійсненні аналізу методом ХТШС

В токсикологічному аналізі важливим є отримання достовірних результатів, які б відтворювались як в окремо взятій лабораторії, так і від лабораторії до лабораторії. Для вирішення цієї задачі, при проведенні аналізу методом ХТШС, необхідно підтримувати належні заходи, які б унеможливлювали отримання не відтворюваних результатів.

Хроматографічний аналіз повинен проводитись в лабораторії, в якій підтримуються нормальні санітарно-гігієнічні умови (температура 20 ^{o}C, вологість та ін.). Різке коливання температури приводить до змін в величинах хроматографічної рухливості для однієї й тієї ж речовини (див. Схему 3).

В деяких випадках результатом виявлення невідомої речовини можуть бути обмежені результати, які відобразились лише у вигляді плям які утворились з розчином йодплатинату або з реактивом Драгендорфа за Мун'є та розташовані в зоні *Rf* від 0,3 до 0,9. В такому разі можливо зробити висновок про виявлення речовини, яка містить у своєму складі третинну аміногрупу.

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

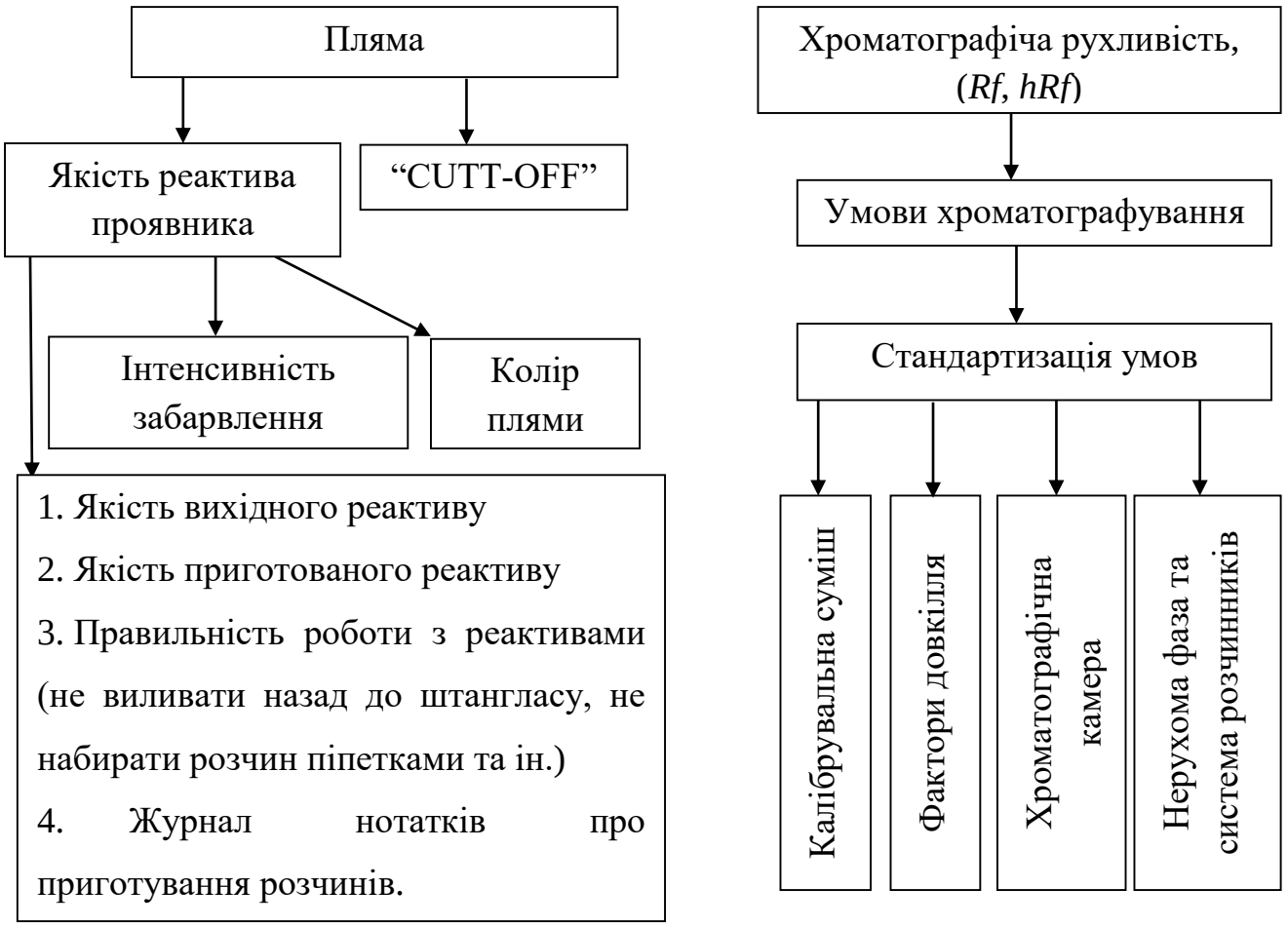
Показник *Rf* – це перемінний чинник для кожної окремої речовини, який залежить від умов хроматографічного розподілу, тому для остаточної ідентифікації індивідуальної речовини потрібно отримати два показника *Rf* на різних рухомих фазах та одній нерухомій з найменшою кореляцією вирахованих величин.

Таким чином, використання рухомої фази для ідентифікації речовин у методі ХТШС отримує вирішальне значення.

Використання систем розчинників у токсикологічному аналізі має свою специфіку.

Схема 3

Ідентифікаційні параметри методу ХТШС



По-перше, це системи, які застосовують при здійсненні «скринінгу». Їх перелік фіксовано, і вони використовуються в залежності від кислотно-лужних властивостей можливих аналітів. Вони повинні бути приготовані належним чином та здійснено перевірку умов хроматографування, з використанням референтної суміші речовин стандартів. При задовільному розподілі та отриманні співпадаючих з літературними даними показників *Rf* 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 утворити плями певного забарвлення з реактивом проявником.

Важливість контролю за дотриманням усіх вимог до використання ідентифікаційних параметрів методу ТШХ приведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Ідентифікаційні параметри речовини

Ідентифікаційні параметри	
Пов'язані з рухливістю речовини	***Пов'язані з хімічними властивостями речовини***
Rf = Ax / B < 1	Загальні реактиви окислювачі
hRf = Rf x 100 < 100	Загальні реактиви комплексоутворювачі
Rs = Ax / Cct >1<	Уф-випромінення 254 нм, 366нм
	Реактиви на окремі функціональні групи

2.4 «ТШХ–скринінг»

Застосування «ТШХ–скринінгу» належить до попередніх методів аналізу на вміст речовин, які контролюють. Очікувані два результати скринінгу відрізняються за доказовістю та достовірністю, негативний результат – остаточний і ніколи не може бути хибно негативним («не виявлено»); позитивний («виявлено») може бути хибно позитивним, та стосується виявлення групи речовин, які об'єднані хімічними властивостями. Після отримання позитивного результату скринінгу, дослідження переходить з групової до внутрішньогрупової ідентифікації.

Методологічною основою ТШХ–скринінгу є поєднання загальних систем розчинників, хроматографування в яких дозволяє розділити токсичні речовини на групи з приватними 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 *Rf*, що дозволяє встановити належність речовини до відповідного хімічного класу;

2. хроматографування аналітів в загальних 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 методів візуалізації аналітів.

Один із варіантів скринінгу [5], 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» (див. Схему 4), та екстракт після кислотного та лужного гідролізів (каннабіноїди).

Після випаровування кожен з екстрактів наносять на тонкошарову пластинку поряд з референтною сумішшю речовин стандартів. Пластинки поміщають в хроматографічні камери, в кожній з яких знаходиться відповідна система розчинників (див. Схема 5).

Варіант ТШХ–скринінгу, який проводять після здійснення кислотного гідролізу естракту, отриманого з біоматеріалу, наведено на Схемі 6.

Схема 4

Схема попереднього ненаправленого ТШХ–скринінгу

Схема 5

Послідовність дій при ненаправленому скринінгу

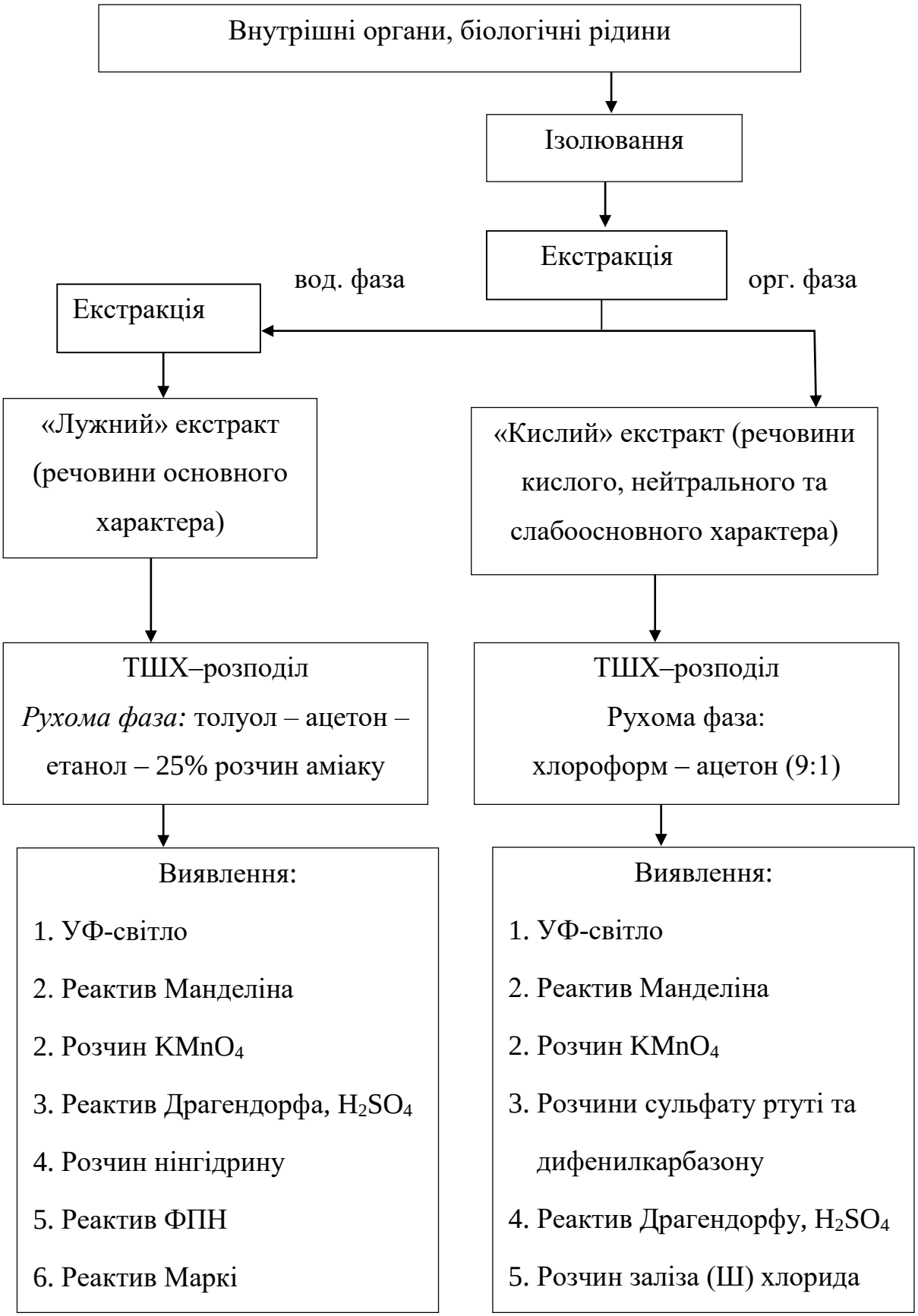
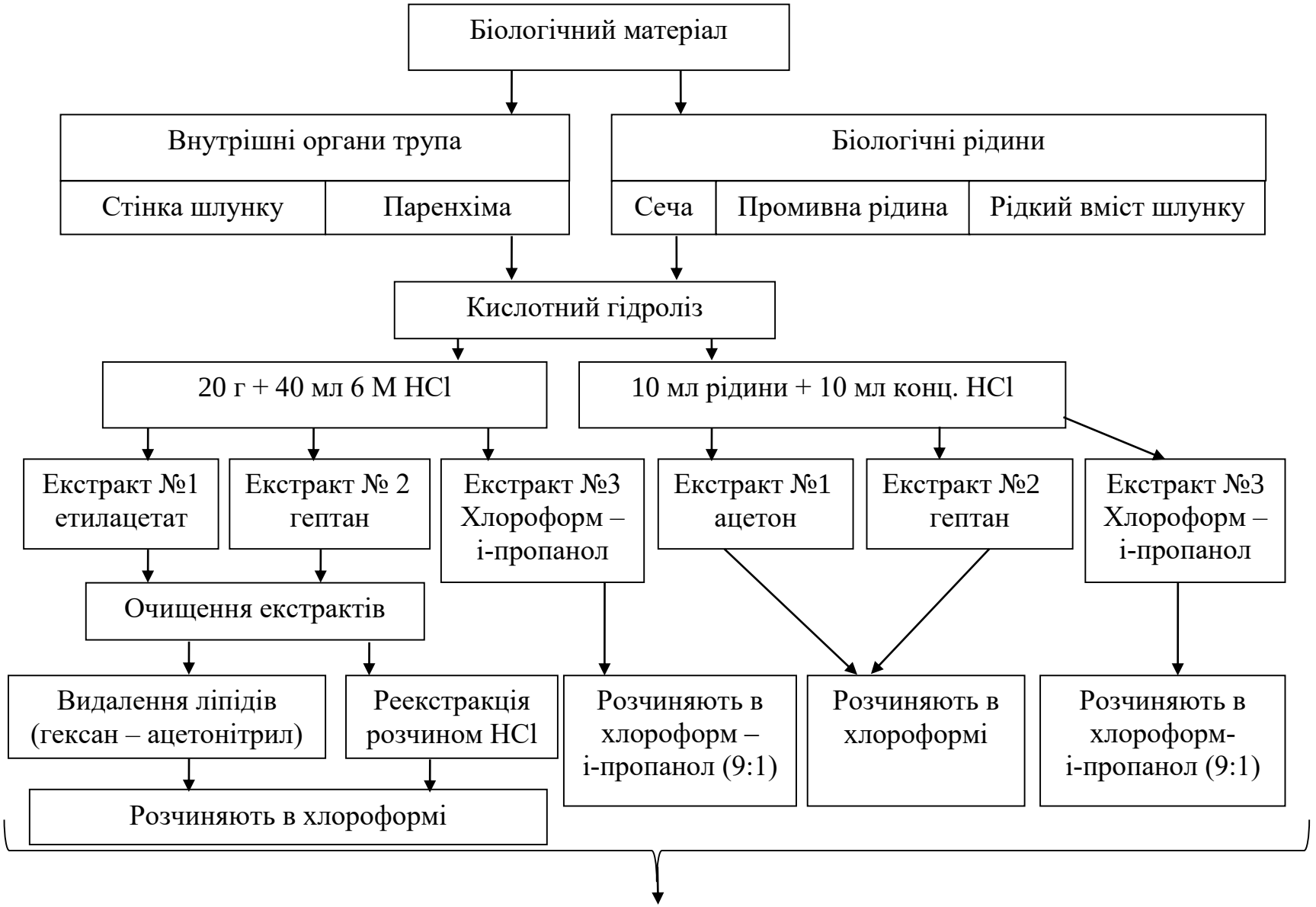
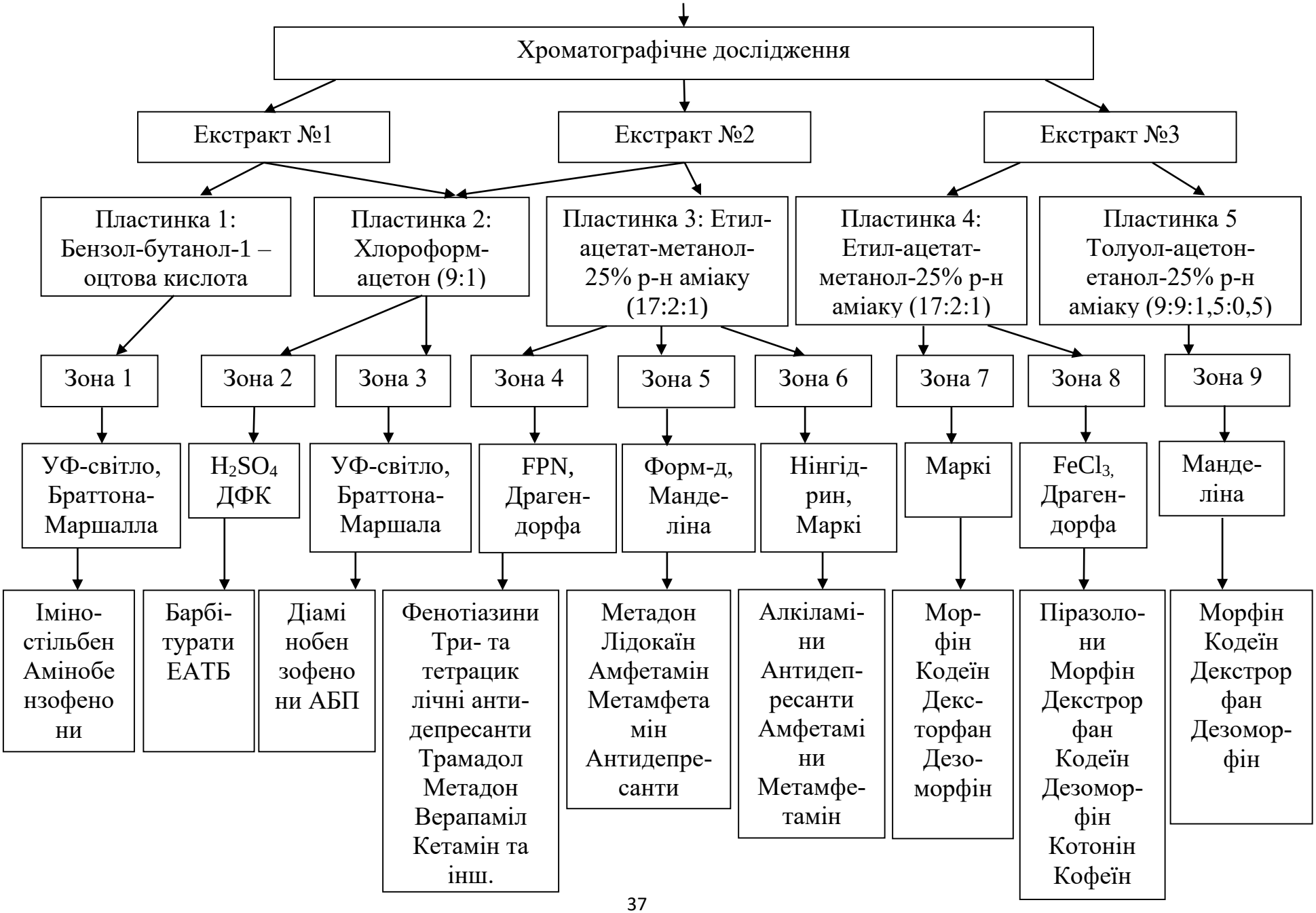


Схема 6

СХЕМА ТШХ–СКРИНІНГУ ПІСЛЯ КИСЛОТНОГО ГІДРОЛІЗУ




Хроматографічне дослідження
Екстракт №1
Екстракт №2
Екстракт №3
Пластинка 1: Бензол-бутанол-1 – оцтова кислота
Пластинка 2: Хлороформ-ацетон (9:1)
Пластинка 3: Етил-ацетат-метанол-25% р-н аміаку (17:2:1)
Пластинка 4: Етил-ацетат-метанол-25% р-н аміаку (17:2:1)
Пластинка 5 Толуол-ацетон-етанол-25% р-н аміаку (9:9:1,5:0,5)
Зона 1
Зона 2
Зона 3
Зона 4
Зона 5
Зона 6
Зона 7
Зона 8
Зона 9
УФ-світло, Браттона-Маршалла
H_2SO_4 ДФК
УФ-світло, Браттона-Маршала
FPN, Драген-дорфа
Форм-д, Манде-ліна
Нінгід-рин, Маркі
Маркі
$FeCl_3$, Драген-дорфа
Манде-ліна
Іміно-стільбен Амінобе нзофено ни
Барбі-турати ЕАТБ
Діамі нобен зофено ни АБП
Фенотіазини Три- та тетрацик лічні анти-депресанти Трамадол Метадон Верапаміл Кетамін та інш.
Метадон Лідокаїн Амфетамін Метамфета мін Антидепре-санти
Алкіламі-ни Антидеп-ресанти Амфетамі ни Метамфе-тамін
Мор-фін Кодеїн Декс-торфан Дезо-морфін
Піразоло-ни Морфін Декстрор фан Кодеїн Дезомор-фін Котонін Кофеїн
Морфін Кодеїн Декстрор фан Дезомор-фін

Для виявлення невідомої речовини систематичний токсикологічний аналіз використовує розділення екстракту в стандартних системах ХТШС. 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 ХТШС повинна відповідати наступним критеріям:

– наркотичні і лікарські речовини повинні давати прийнятні хроматографічні властивості у ХТШС – системах, які використовуються;

– значення *Rf* для визначуваних речовин повинні рівномірно розподілятися по усьому діапазону величин *Rf* в стандартних системах;

– отримані значення *Rf* мають бути стандартизованими так, щоб була отримана добра міжлабораторна відтворюваність;

– коли для попередньої ідентифікації речовини використовують більше однієї системи, то отримані значення *Rf* повинні мати низьку кореляцію в цих системах.

Використання стандартних систем дозволяє розділити екстракти отримані з кислого та лужного середовища, а присутність нейтральних речовин очікується як в кислих, так і лужних екстрактах. Комітет з Систематичного Токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів (TIAFT) рекомендує використовувати для попередньої ідентифікації 11 ХТШС систем (див. Табл. 3).

Для речовин з різними кислотно-лужними властивостями рекомендують використовувати: перші 4 системи зі списку – для розділення кислих і нейтральних речовин, а 7 подальших – для розділення нейтральних та основних речовин. Дані представлені для 1600 токсикологічно важливих речовин [6, 10].

Після закінчення хроматографування пластинки висушують та обробляють відповідним реактивом проявником.

Послідовність проявлення полягає у взаємодії з реактивом Манделіна, після розташування пластинки у випари формальдегіду, опроміненням УФ-світлом при 254 та 366 нм (виникнення флуоресценції) та проявленням реактивом Драгендорфа за Мун'є. Використовуються й інші кольорові реакції (див. Додатки 1 – 4).

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 певне забарвлення плям з певним значенням *Rf* (див. Схема 7) роблять висновок «виявлено групу речовин».

Схема 7

Результати «скринінгу» отримані після візуалізації хроматограм

В деяких випадках, після застосування необхідного набору реактивів проявників, неможливо зробити однозначні висновки про виявлення групи речовин. В такому разі можливо застосувати послідовне нанесення реактивів [11, 12, 13] або змивання пластинки водою, після нанесення основного реактиву [12, 13, 14].

В тому разі, якщо маємо справу з обмеженою кількості токсикантів, то можливо застосування нових реактивів проявників [15].

Важливою складовою у виявленні конкретного аналіту є його хроматографічна рухливість в зазначених системах розчинників. Як зазначалось вище, по абсолютним значенням хроматографічної рухливості *Rf* роблять попередню ідентифікацію. Для отримання об'єктивних даних проводять деякі заходи з використанням стандартних речовин для отримання величини *Rf* [16] або з залученням референтних сумішей стандартних речовин. Для виявлення великої кількості лікарських засобів, наркотичних та психотропних речовин, за кордоном, використовують бази даних, за якими можливо отримати уточнені величини *Rf* у декількох системах розчинників, що дає можливість ідентифікувати конкретну речовину [10]. При застосуванні всіх складових – відповідності тонкошарових пластинок, референтних сумішей, систем розчинників, цю систему можливо застосовувати і в нашій практиці. В разі, коли таке співпадіння неможливо відтворити, використовують одну референтну суміш для виявлення обмеженої кількості токсикантів [15]. Наявність тонкошарових пластинок з іншими механізмами розподілу (наприклад, пластинок з RP–шарами), дозволяє отримувати данні по хроматографічній рухливості речовини на пластинках з нормально- та оберненофазними механізмами. Данні по хроматографічній рухливості отримані паралельно, дозволяють використовувати їх на проміжному етапі скринінгу [16].

Досить часто в практиці токсикологічного аналізу, який здійснюється методом ХТШС, 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 реактивом Драгендорфа за Мун'є. Крім цього, такі речовини мають близькі параметри хроматографічної рухливості. Тому, в цих випадках, обов'язково необхідно застосувати нові реактиви проявники (наприклад, реактив Манделіна [17, 18]) і один з розрахункових методів хроматографічної рухливості.

При виконанні досліджень методом ХТШС на етапі скринінгу, деякі речовини мають однакову хроматографічну рухливість в системах розчиників, які використовують для розподілу. Додатковою складністю у виявлені 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 [17].

Після встановлення групової приналежності здійснюють внутрішньогрупове 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 послідуючим здійсненням всіх вимог, зазначених в рекомендаціях.

Якщо методичних рекомендацій немає, то фахівець проводе самостійне дослідження.

Для розробки методики аналізу речовини необхідно виконати наступні дії:

1. Вивчити властивості речовини, яку було попередньо виявлено. Для конкретної речовини встановлюють її структурну формулу з виділенням функціональних груп, по яких можливо запропонувати реактиви проявники. З літературних джерел необхідно встановити кислотно-лужні властивості речовини по значенням P_{Ka}, її розчинність та здатність утворювати можливі метаболіти або продукти, які утворюються при розкладанні аналіту.

2. З урахуванням цих властивостей, провести екстракцію нової порції біологічного матеріалу, 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 аналіту.

3. Розробити умови хроматографічного розподілу:

– здійснити підбір 2 рухомих фаз (елюєнтів), де величина *Rf* 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 пластинках з урахуванням полярності речовини та сорбенту або інших механізмів розподілу;

– підібрати метод візуалізації аналіта (проявлення УФ-світлом, реактивами окислювачами, реактивами, які утворюють забарвлені продукти з аналізом, 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 т.д.) 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 хибно позитивних

результатів; чи ускладнена ідентифікація аналіту присутністю однієї або більше речовин; чи впливає це на кількісне визначення аналіту (якщо є потреба);

– для остаточного виявлення, речовину яку досліджують, хроматографують мінімум в двох системах розчинників, в яких величини *Rf* для даної речовини мають малу кореляцію. Поряд з досліджуваним екстрактом наносять речовину стандарт, а вразі відсутності такого наносять речовину прийняту за стандарт, після проявлення яких розраховують величину *Rs* та роблять висновки про ідентифікацію речовини. Дослідження здійснюється в підібраних системах розчинників в стандартизованих умовах хроматографічного розділення. Для стандартизації умов підбирається референтна суміш з 4 еталонних речовин з величиною дискримінуючої здатності *DP=0,95-1,0*, при *n=5, P=0,95* для кожної з систем розчинників.

Значення величин *Rf* аналіта зі значенням *Rf* стандарту повинно узгоджуватися в межах ±5%. Візуально зовнішній вигляд аналіту не повинен відрізнятися від стандарту. Для плям одного і того ж кольору центр найближчої плями повинен відокремлюватись від центру плями аналіту, принаймні, половиною суми діаметру плям.

Використання «ТШХ–скринінгу» є актуальним та незамінним в Україні, позаяк труднощі з придбанням сучасних приладів, таких як ГХ–МС, ВЕРХ–МС та використання речовин стандартів не здійснюється в достатньому обсязі.

Визнано, що забезпечення лабораторій первинними референтними стандартами, які застосовуються в токсикологічному аналізі як в Україні, так й за кордоном, в ряді випадків не завжди може бути здійснено з кількох причин: стандарти для нових наркотиків, лікарських речовин, їх метаболітів, «дизайнерських наркотиків» або просто рідкісних речовин часто не доступні для використання в аналізі через великий проміжок часу між самим аналізом і постачанням стандарту в лабораторію або адміністративними перешкодами, що виникають.

Ні внутрішні, ні міжнародні спеціалізовані організації не в змозі надавати лабораторіям навіть найважливіші речовини, не кажучи вже про знову

синтезовані наркотики та психотропи або нові лікарські препарати. Їх використання визначається як завдання окремо взятих лабораторій – набувати речовини порівняння такими шляхами: або від комерційних виробників, або як подарунки від фармацевтичних фірм чи інших лабораторій, чи вчених. Отримання речовин порівняння можливе й вилученням основи діючих речовин із конфіскованих матеріалів.

2.5 Аналіз нітрогенвмісних сполук

Нітрогенвмісні сполуки, які підлягають «скринінгу» мають різну ступінь складнощів при виявленні, оскільки наприклад такі речовини, які мають слабо кислі властивості, можуть бути виявлені обмеженим колом реактивів проявників з застосуванням однієї системи розчинників (барбітурати, похідні піразолону).

Складнощі виникають з речовинами, які проявляють нейтральні, амфотерні та слабо лужні властивості, позаяк вони потрапляють як у «кислий» так і в «лужний» екстракти. Для вирішення цієї проблеми необхідно паралельне проявлення кислого та лужних екстрактів з порівнянням виникаючих забарвлень при опроміненні УФ-світлом та застосуванням реактиву Манделіна. Збіг виникаючих забарвлень в обох витягах вказує на присутність саме таких речовин. Крім того, використовувати зазначений реактив можливо паралельно у двох його варіантах приготування, що дає можливість отримати додаткові забарвлення для виявлення, наприклад, тетрациклічних антидепресантів [8].

2.5.1 Речовини з первинною та вторинною аміногрупами

Найбільш проблемною для виявлення є група нітрогенвмісних речовин з лужними властивостями, яку умовно поділяють на лужні та сильно лужні речовини. До складу цих речовин входять речовини, які мають у своєму складі первинну та вторинну аміногрупи.

Речовини з первинною та вторинної аміногрупами виявляються в ТШХ–скринінгу 1% розчином нінгідрину в ацетоні. Це групи речовин поєднані за

структурою, наприклад похідні фенілакіламіну, до складу якої входять багато лікарських засобів, а також контрольовані речовини – похідні амфетаміну, деякі прекурсори. Без речовин стандартів достовірно не можливо провести виявлення контрольованих речовин цієї групи, так як структура лікарських засобів, прекурсорів, їх ліпофільність та лужні властивості дуже близькі. Інші реактиви, які використовують для проведення внутрішньогрупового дослідження фенілалкіламінів – це 1% лужний розчин тривкого чорного Б, розчин флюорана. Але ці реагенти грають допоміжну роль, так як є реактивами на первинну і вторинну аміногрупу, які присутні в багатьох органічних структурах.

Похідні фенілалкіламінів (ФАА) мають широкий спектр фармакологічної дії. Серед них є речовини, що знайшли застосування в медичній практиці як лікарські засоби. Деякі з них використовуються в немедичних цілях завдяки потужній психостимулюючій дії, тому ця група речовин (їх отримання та поширення) контролюється державою.

Амфетамін та його метилендіоксіпохідні отримують, в основному, в підпільних лабораторіях, після чого вони стають предметом незаконного обігу наркотиків. Заходи контролю, що здійснюються в міжнародному масштабі за цими речовинами, з одного боку, та інформація, що надходить із сучасних засобів комунікації, з іншого, призвели до того, що виробництво контрольованих ФАА з лабораторій зробило крок безпосередньо до споживача, який самостійно може, не беручи участі в незаконному обігу наркотиків, у кустарних умовах синтезувати контрольовані речовини.

Джерелом прекурсорів в основному виступають лікарські препарати, що продаються в аптеках. Це ефедрин, псевдоефедрин і норпсевдоефедрин (фенілпропаноламін), що містяться в багатокомпонентних лікарських формах [18]. З них отримують метамфетамін (первітин), ефедрон та норефедрон, відповідно.

Наркоманія, що розвивається внаслідок вживання цих речовин, носить важкий характер і набула широкого поширення [3]. Ідентифікація похідних

амфетаміну, які одержують з медикаментів, пов'язана з певними труднощами, викликаними впливом супутніх компонентів, які використовують у многокомпонентних лікарських засобах, паралельним прийомом з медичною або немедичною метою деяких препаратів – трамадолу, амідопірину та ін. [3], а також використанням аналогів за структурою похідних амфетаміну, наприклад, фенілефрину та етилефрину.

Близькість структури представників групи ФАА створює серйозні труднощі при їх виявленні, викликані двома причинами.

По-перше, відмінність між представниками зводиться до варіацій обмеженого кола замісників та їх положенням у бензольному кільці фенілалкіламіну.

По-друге, ці замісники мало відрізняються за своїми ліпофільними властивостями, внаслідок чого препарати мають подібні параметри хроматографічної рухливості, що не дозволяє проводити їхню надійну ідентифікацію, а реактиви, рекомендовані для їх виявлення, дають з ними подібні забарвлення.

Метою нашої роботи була розробка схеми аналізу кустарно виготовлених контрольованих ФАА у присутності офіційно дозволених медикаментів, що мають подібну хімічну будову. Аналіз ґрунтувався на визначенні хроматографічної рухливості аналізованих речовин у тонких шарах сорбенту з подальшим проведенням хромогенних реакцій на пластинках із загальними та специфічними реактивами.

Паралельно досліджувалась хроматографічна рухливість контрольованих речовин, їх прекурсорів та аналогів за будовою; речовин, що входять до складу багатокомпонентних лікарських форм, що містять прекурсор; а також ліків, що приймаються токсикоманами – всього досліджувалося 23 речовини (Табл. 4).

Таблиця 4

Хроматографічна рухомість та забарвлення с реактивами похідних амфетаміну, лікарських засобів та їх метаболітів

№ з/п	Речовина	Величина hR_f в системі*			Реактив	
		1	2	3	1% розчин нінгідрину в ацетоні	Драгендор-фа за Мун'є
1	2	3	4	5	6	7
1.	Метамфетамін	33	53	34	Фіолетове	Помаранчеве
2.	Амфетамін	62	70	66	Фіолетове	Помаранчеве
3.	Меткатинон	53	70	66	Фіолетове	Помаранчеве
4.	Ефедрин	20	44	30	Фіолетове	Помаранчеве
5.	Псевдоефедрин	65	68	63	Фіолетове	Помаранчеве
6.	Фенілпропаноламін	70	50	60	Фіолетове	Помаранчеве
7.	Фенілефрин	56	60	50	Фіолетове	Помаранчеве
8.	Бромгексин	80	66	90	Фіолетове	Помаранчеве
9.	Амброксол	75	70	85	Фіолетове	Помаранчеве
10.	Монометил-аміноантипірін	50	68	71	Фіолетове	Помаранчеве
11.	4-аміноантипірин	52	66	75	Фіолетове	Помаранчеве
12.	МДМА	33	53	32	Жовто-помаранчеве	Помаранчеве
13.	ДМА	66	42	40	Жовте	Помаранчеве
14.	Трамадол	88	87	68	Темно-синє	Помаранчеве
15.	N-дезметилтрамадол	66	75	52	Фіолетове	Помаранчеве
16.	N, N-дезметилтрамадол	56	68	52	Фіолетове	Помаранчеве
17.	N, O-дезметилтрамадол	43	38	52	Фіолетове	Помаранчеве

1	2	3	4	5	6	7
18.	ДПФ	80	82	69	Рожеве	Помаранчеве
19.	Меткатинон	68	53	61	Фіолетове	Помаранчеве
20.	ДМФ	70	81	51	–	Помаранчеве
21.	Амідопірин	–	–	–	–	Помаранчеве
22.	Парацетамол	80	80	80	Жовте	Помаранчеве
23.	Кетамін	74	81	63	Жовто-зелене	Помаранчеве

* Системи:

1) толуол – ацетон – етанол − 25% розчин аміаку (45:45: 7,5:2,5);

2) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:2,5);

3) метанол − 25% розчин аміаку (100:1,5).

Як видно з табл. 4, речовини забарвлюються нінгідрином, реактивом Драгендорфа за Мун'є і мають хроматографічну рухливість у межах 0,2 – 0,9. Для подальшої диференціації нами було запропоновано використовувати послідовне нанесення реактиву Маркі після 1% розчину нінгідрину в ацетоні [20]. Забарвлення, що виникають представлені в Табл. 5.

Таблиця 5

Забарвлення, які виникають при проявленні

№ з/п	Речовина	Реактив / забарвлення			
		1% розчин нінгідрину в ацетоні	Реактив Маркі після 1% розчину нінгідрину в ацетоні	Реактив Маркі	10% розчин $FeCl_3$
1	2	3	4	5	6
1.	Метамфетамін	Фіолетове	Коричнево-помаранчеве	Коричневе	–
2.	Амфетамін	Фіолетове	Коричнево-помаранчеве	Коричневе	–

1	2	3	4	5	6
3.	Меткатинон	Фіолетове	Малинове	–	–
4.	Ефедрин	Фіолетове	Малинове	–	–
5.	Псевдоефедрин	Фіолетове	Малинове	–	–
6.	Фенілпропаноламін	Фіолетове	Малинове	–	–
7.	Фенілефрин	Фіолетове	Темно-червоне	–	Червоно-фіолетове
8.	Бромгексин	Фіолетове	Фіолетове	–	–
9.	Амброксол	Фіолетове	Фіолетове	–	–
10.	Монометиламіно-антипірин	Фіолетове	Жовте	–	Фіолетове
11.	4-аміноантипірин	Фіолетове	Жовте	–	Фіолетове
12.	МДМА	Фіолетово-коричневе	Синьо-сіре	Синьо-чорне	–
13.	ДМА	Жовте	Фіолетове	Зелене	–
14.	Трамадол	Синьо-сіре	Буре	Буре	–
15.	N-дезметіл-трамадол	Фіолетове	Буре	Буре	–
16.	N,N-дезметил-трамадол	Фіолетове	Буре	Буре	–
17.	N,O-дезметил-трамадол	Фіолетове	Буре	Буре	–
18.	ДПФ	Сіре	–	Чорно-фіолетове	Коричневе
19.	Норефедрон	Фіолетове	Малинове	–	–
20.	ДМФ	Темно-коричневе	–	Чорно-зелене	–
21.	Амідопірин	–	–	–	Фіолетове

1	2	3	4	5	6
22.	Кетамін	Жовто зелене	–	–	–

Паралельно для підтвердження результатів було проведено проявлення аналізованих речовин 10% розчином заліза (III) хлориду, що дозволило підвищити достовірність досліджень.

У літературі описано використання такого реагенту як 1% розчин нінгідрину в концентрованій сірчаній кислоті, отримані з ним забарвлення для аналізованих речовин дозволили підвищити достовірність досліджень для трамадолу та його метаболітів, а також деяких контрольованих метилендіоксиамфетамінів [20 – 22] (див. Табл. 6).

Таблиця 6

Забарвлення, які виникають в результаті послідовного нанесення реактивів

№ з/п	Речовина	Реактиви		
		1% розчину нінгідрину в концентро-ваній сірчаній кислоті	Змивання водою після 1% розчину нінгідрину в концентро-ваній сірчаній кислоті	Змивання водою після реактиву Маркі
1	2	3	4	5
1.	Метамфетамн	Коричневе	Коричневе	Коричневе
2.	Амфетамін	Коричневе	Коричневе	Коричневе
3.	Меткатинон	–	–	–
4.	Ефедрин	–	–	–
5.	Псевдоефедрин	–	–	–

1	2	3	4	5
6.	Норпсевдоефедрин	–	–	–
7.	Фенілефрин	–	–	–
8.	Бромгексин	–	–	–
9.	Амброксол	–	–	–
10.	Монометиламіно-антипірин	–	–	–
11.	4-аміноантипірин	–	–	–
12.	Трамадол	Вишневе	Помаранчеве	Смарагдово-зелене
13.	N-дезметилтрамадол	Вишневе	Помаранчеве	Смарагдово-зелене
14.	N,N-дезметил-трамадол	Вишневе	Помаранчеве	Смарагдово-зелене
15.	N,O-дезметил-трамадол	Вишневе	Помаранчеве	Смарагдово-зелене
16.	ДПФ	Чорно-зелене	Чорно-фіолетове	Чорне
17.	ДМФ	–	–	Сіро-зелене
18.	Амідопірин	–	–	–
21.	Норефедрон	–	–	–

Вживання заборонених речовин часто супроводжується одночасним вживанням наркотиків інших груп або прийомом лікарських засобів в дозах значно перевищуючих терапевтичну, з метою одержання наркотичного або токсикоманічного сп’яніння. До таких лікарських засобів належать трамадол, кетамін, декстропропосифен, декстрометорфан.

Широке розповсюдження заборонених психостимуляторів (похідних амфетаміну) та їх прийом разом з вищенаведеними препаратами ускладнює їх виявлення в сечі людини (див. Табл. 7).

Таблиця 7

Результати хроматографічного розподілу заборонених наркотиків та деяких лікарських засобів та їх метаболітів

№ з/п	Речовина	Забарвлення		Величина hRf в системі*		
		З 1% розчином нінгідрину	З р-вом Маркі	1	2	3
1	2	3	4	5	6	7
1.	Ефедрин	Фіолетове	–	31	46	18
2.	Фенілпропаноламін	Фіолетове	–	61	47	69
3.	Меткатинон	Фіолетове	–	66	71	53
4.	Амфетамін	Фіолетове	Жовто-гаряче	46	62	62
5.	Метамфетамін	Фіолетове	Коричневе	31	53	33
6.	3,4-метилендіокси-амфетамін	Фіолетове	Чорне	32	53	33
7.	2,5-диметокси-амфетамін	Фіолетове	Жовте	40	42	66
8.	Трамадол	Сіро-блакитне	Буро-коричневе	68	87	88
9.	N-дезметилтрамадол	Фіолетове	Буро-коричневе	52	68	56
10.	N,N-дезметил-трамадол	Фіолетове	Буро-коричневе	52	68	56
11.	N,O-дезметил-трамадол	Фіолетове	Буро-коричневе	52	38	43

1	2	3	4	5	6	7
12.	Кетамін	Жовто-зелене	–	63	81	74
13.	ДПФ	Сіре	Чорне	7	82	80
14.	ДМФ	Темно-коричневе	Чорно-зелене	51	81	70
15.	Фенілефрин	Коричневе	Темно-червоне	50	60	56

*Системи:

1) метанол – 25% розчин аміаку (100:15);

2) етилацетат – етанол – 25% розчин аміаку (85:10:0,5);

3) толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5).

Поставлена задача удосконалення способу виявлення заборонених наркотиків – похідних амфетаміну в сечі людини, вирішувалась за рахунок введення нової системи розчинників, в якій досягають низької кореляції між хроматографічною рухливостю заборонених фенілалкіламінів та лікарськими засобами. В подальшому можливе застосування методу двомірної тонкошарової хроматографії з системою розчинників, яка не має в своєму складі речовини модифікатора (25% розчину аміаку): гексан – ацетон (2:1) (див. Табл. 8).

Після даного етапу проводять візуалізацію речовин за допомогою послідовного нанесення 1% ацетонового розчину нінгідрину та реактиву Маркі.

Дослідження проводиться наступним чином: розчин екстракту наносять на лінії старту двох хроматографічних пластинок, підготованих для двомірної хроматографії.

Таблиця 8

Результати хроматографічного розподілу заборонених наркотиків та деяких лікарських засобів та їх метаболітів в рекомендованій ситемі розчинників

№ з/п	Речовина	Забарвлення		Величина hRf в системі 4*
		З розчином Маркі після 1% розчину нінгідрину	Змивання водою	
1	2	3	4	5
1.	Ефедрин	Малинове	Малинове	0
2.	Фенілпропаноламін	Малинове	Малинове	0
3.	Меткатинон	Малинове	Малинове	0
4.	Амфетамін	Коричневе	Коричневе	19
5.	Метамфетамін	Коричневе	Коричневе	0
6.	3,4- метилендіокси-амфетамін	Чорно-синє	Чорно-синє	0
7.	2,5-диметоксиамфетамін	Чорно-зелене	Чорно-зелене	0
8.	Трамадол	Буро-коричневе	Смарагдово-зелене	29
9.	N-дезметилтрамадол	Буро-коричневе	Смарагдово-зелене	15
10.	N,N-дезметилтрамадол	Буро-коричневе	Смарагдово-зелене	10
11.	N,O-дезметилтрамадол	Буро-коричневе	Смарагдово-зелене	6
12.	Кетамін	–	–	50
13.	ДПФ	Чорне	Чорне	40

1	2	3	4	5
14.	ДМФ	Синьо-зелене	Чорно-зелений	10
15.	Фенілефрин	Червоне	Червоне	10

*Система: 4) гексан – ацетон (2:1).

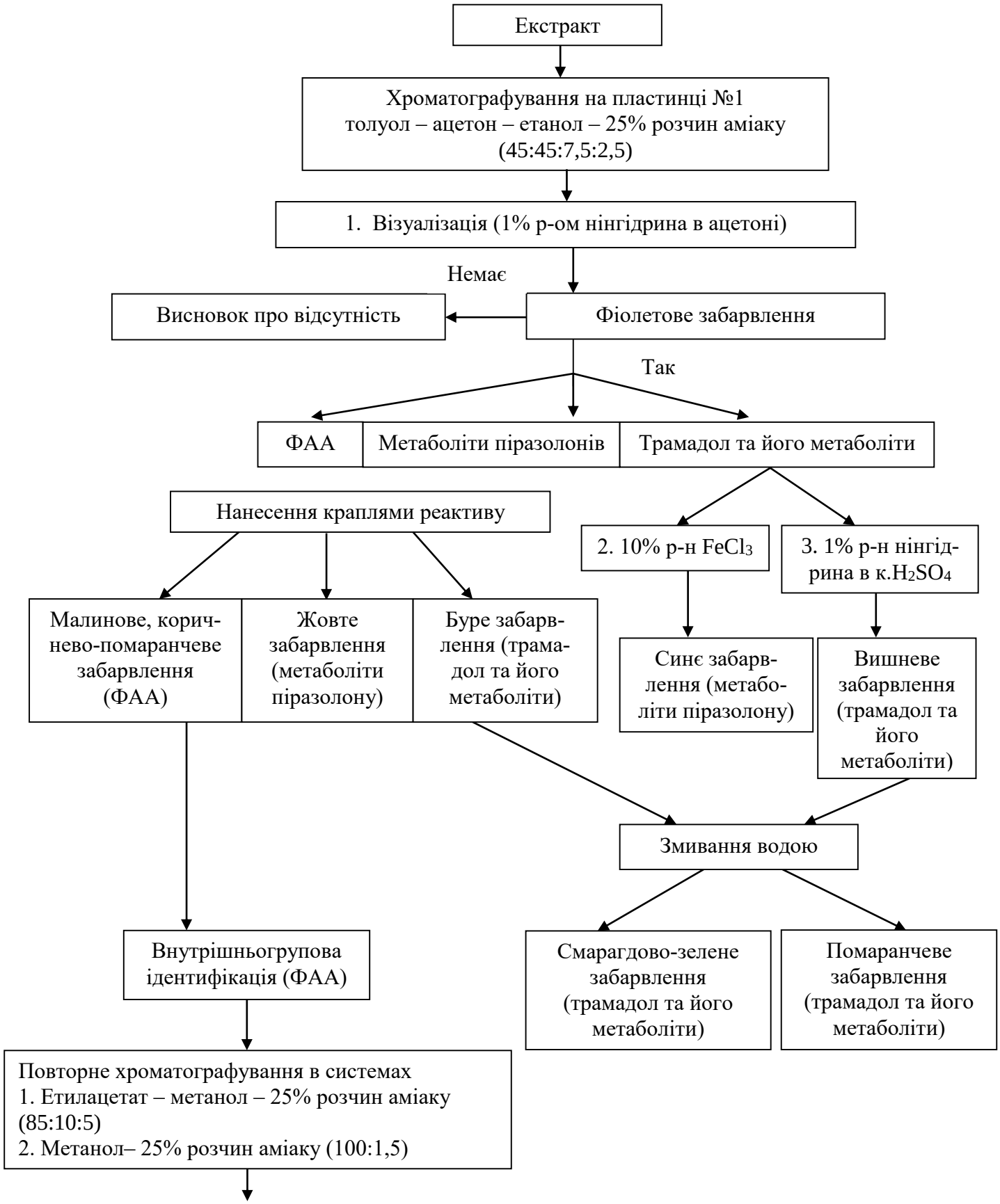
Після закінчення хроматографування в системі розчинників 1, пластинки витягають, висушують і на лінії старту наносять стандарні розчини забороненого наркотика (наприклад метафетаміну) та лікарського засобу (наприклад трамадолу) та хроматографують в системі 4 у напрямі перпендикулярному до напрямку хроматографування в системі 1.

Після досягнення лінії фронту пластинки виймають, висушують та проявляють 1% ацетоновим розчином нінгідрину, фіксуючи забарвлення та величини *Rf*. Після висушування наносять реактив Маркі та, після змінення забарвлення, в разі потреби, змивають водою. При співпаданні величини *Rf* речовин, що досліджуються зі стандартами, а також відповідного забарвлення (див. табл. 8), роблять висновок про наявність забороненого наркотика [11].

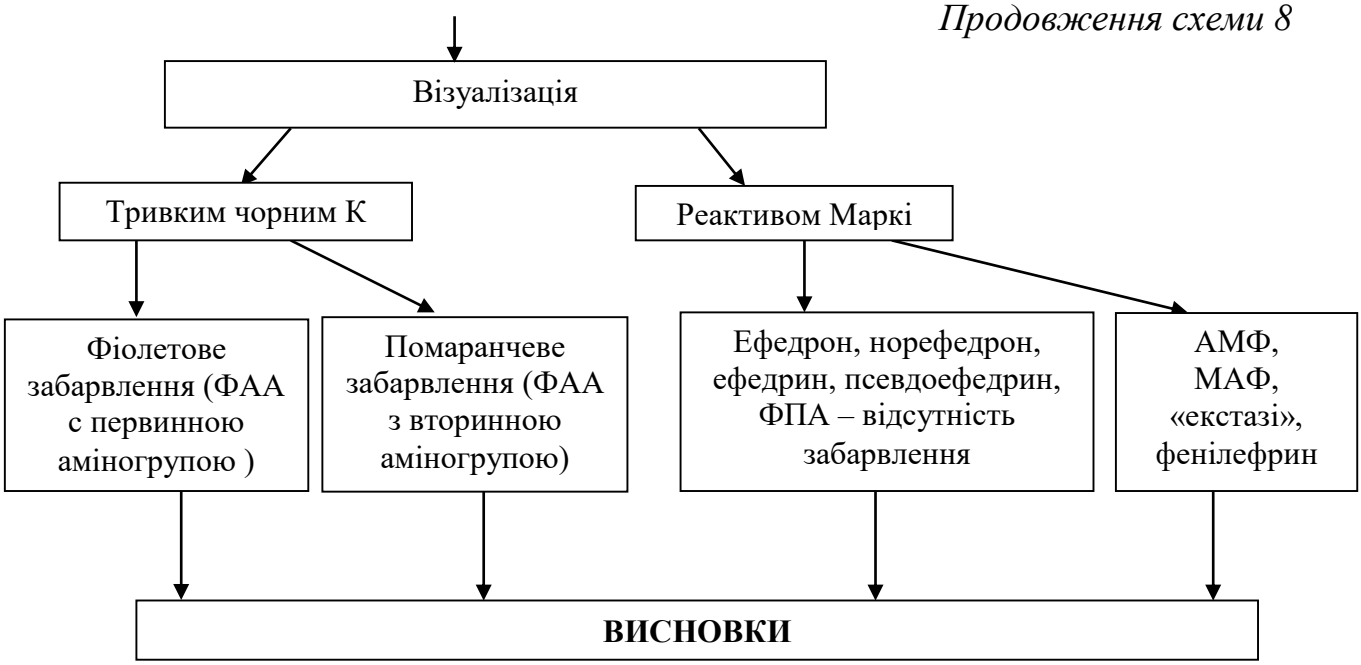
Для досліджень для групи фенілалкіламінів можна рекомендувати таку схему:

Схема 8

Алгоритм ТШХ-скринінгу на фенілалкіламіни



Продовження схеми 8



2.6 Речовини з третинною аміногрупою

Речовини, які мають в своїй структурі третинну аміногрупу, можна розділити на дві чистини: 1 група – речовини, які крім неї мають ще характеристичні функціональні групи, і, самий складний випадок: 2 група – речовини, в яких присутня тільки третинна аміногрупа. Для виявлення таких речовин було використано традиційні для проведення токсикологічного аналізу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту підходи: це пошук нових систем розчинників, які могли б достовірно розділити такі речовини.

2.6.1 Речовини першої групи

Нашою метою було розробити схему аналізу, що дозволяє методом ХТШС достовірно ідентифікувати контрольовані речовини в присутності деяких лікарських препаратів. Для цього було визначено хроматографічну рухливість цих речовин у системах розчинників, що застосовуються в токсикологічному «скринінгу».

Виявилось, що наркотичні речовини в системах 1 – 3 мають величини *Rf* близькі до великого числа препаратів (Табл. 9). Тому були обрані ще шість систем, з яких у системах 3 та 5 вдалося отримати низьку кореляцію значень *Rf*.

Результати в системах 7 та 8 отримані на пластинках з RP-3 шарами (решта – на пластинках Сорбфіл ПТСХ-ПА), можна використовувати для додаткової ідентифікації.

Системи:

1. толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5);
2. етилацетат – етанол – 25% розчин аміаку(85:10:5);
3. хлороформ – ацетон (9:1);
4. гексан – ацетон – 25% розчин аміаку (20:20:1);
5. ацетонітрил – бензол – етилацетат – 25% розчин аміака (40:30:25:4);
6. етилацетат – н-пропанол – 25% розчин аміаку (40:30:2);
7. і-пропанол – ацетон – етанол (30:30:30);
8. метанол– 25% розчин аміаку (100:1,5);
9. гексан –ацетон (2:1);
10. вода –ацетон – тетрагідрофуран (1:1:1);
11. вода –ацетон – метанол (1:1:1).

Візуалізація хроматографованих речовин проводилася реагентами, які використовуються у «скринінгу» і загальноалкалоїдними реагентами (Табл. 9).

Таблиця 9

Хроматографічна рухливість досліджуваних речовин

№ з/п	Речовина	Система										
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
1.	ДМФ	62	81	6	75	70	40	20	12	–	–	–
2.	Морфін	23	45	50	10	12	18	50	37	–	–	–
3.	Кодеїн	38	70	60	30	31	25	80	46	–	–	–
4.	Фенциклідин	85	70	40	87	83	84	60	20	–	–	–
5.	Кетамін	74	81	67	71	64	75	75	50	–	–	–
6.	Циклодол	83	80	40	86	83	84	56	20	–	–	–
7.	МДМА	33	53	0	25	27	62	12	12	–	–	–
8.	Метамфетамін	33	56	0	37	12	62	25	16	–	–	–
9.	Амфетамін	62	69	0	62	12	28	21	18	–	–	–
10.	Псевдоефедрин	65	65	0	81	18	30	31	50	–	–	–
11.	Фенілефрин	56	68	0	37	30	12	13	37	–	–	–
12.	Трамадол	88	87	88	87	75	60	25	27	–	–	–
13.	ДПФ	80	82	20	83	87	81	43	27	–	–	–
14.	Бупренорфін	85	80	68	85	66	87	78	43	–	–	–

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
15.	Метадон	60	60	–	–	–	–	–	72	24	20	56
16.	Зопіклон	62	26	–	–	–	–	–	67	0	88	40
17.	Фенотропіл	46	56	–	–	–	–	–	65	0	76	80
18.	Пірацетам	30	42	–	–	–	–	–	58	0	76	74

Таблиця 10

Забарвлення, що виникають при проявленні реактивами

№ з/п	Речовина	Реактив							
		13*	**19***	**1**	**20***	**2**	**3**	**12***	**4**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
1.	ДМФ	Чорно-зелене	Темно-коричневе	Чорно-зелене	–	Коричне-во-фіоле-тове	Зелено-коричне-ве	Зелене	–
2.	Морфін	Фіолетове	–	–	Буре	Коричне-ве	Коричне-во-фіоле-тове	Фіолетове	–
3.	Кодеїн	Темно-синє	–	–	Буре	Коричне-ве	Синьо-зелене	Синьо-зелене	–
4.	Фенциклідин	–	–	–	Рожеве	Сіро-коричневе	Коричне-ве	Буре	–
5.	Кетамін	–	Жовто-зелене	–	Коричне-ве	Жовто-помаран-чове	Коричне-ве	Буре	–

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6.	Циклодол	Рожево-коричневе	–	Коричне-ве	Буре	Рожево-коричневе	Рожево-коричневе	Буре	–
7.	МДМА	Синьо-чорне	Фіолетове	Синьо-чорне	Зелено-чорне	Темно-синє	Синьо-чорне	Смараг-дово-зелене	Чорно-фіолето-ве
8.	Метамфетамін	Помаран-чево-коричневе	Фіолетове	Помаран-чево-коричневе	Коричне-ве	–	–	–	–
9.	Амфетамін	Помаран-чево-коричневе	Коричне-во-фіолето-ве	Помаран-чево-коричневе	Коричне-ве	Помаран-чеве	Коричне-ве	–	–
10.	Псевдоефедрин	–	Фіолетове	Малинове	–	Жовто-коричневе	Коричне-ве	–	–
11.	Фенілефрин	Рожеве	Фіолетове	Малино-ве	Жовте	–	Коричне-ве	–	–
12.	Трамадол	Буре	Синьо-сіре	Буре	Помаран-чеве	Сіро-коричневе	Сіре	Сіре	Сіре

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
13.	ДПФ	Чорно-фіолетове	Рожеве	Чорно-зелене	Синьо-фіолетове	Сіре	Фіолетове	Сіре	Сіре
14.	Бупренорфін	Фіолетове	Жовте	Фіолетове	Синьо-вишневе	Буре	Фіолетове	Фіолетове	Помаранчеве
15.	Метадон	Синьо-зелене	–	–	–	–	–	–	Синьо-зелене
16.	Зопіклон	–	–	–	–	–	–	–	–
17.	Фенотропіл	Коричневе	–	Коричневе	–	–	–	–	–
18.	Пірацетам	Коричневе	Фіолетове	Коричневе	–	–	–	–	–

13*, 19*, 20*, 12* – див додаток 4;

1 – реактив Маркі після 1% нінгідрину в ацетоні; **2** – йодат калію в концентрованій сірчаній кислоті;

3 – реактив Фреде; **4** – концентрована сірчана кислота

“**–**” – забарвлення відсутнє

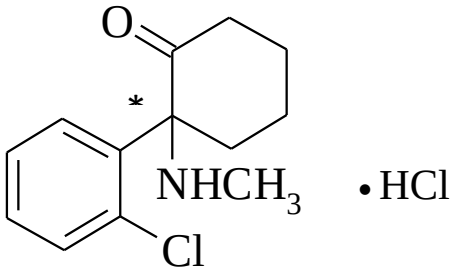
Як випливає з наведених даних, можливо достовірно розрізняти структурні аналоги такі як ДМФ, морфін, кодеїн, бупренорфін; ДПФ, метадон, трамадол в тонких шарах сорбенту, та можна запропонувати таку схему аналізу:

– проведення попередньої ідентифікації в системах 1 або 2 з візуалізацією реактивом Маркі;
– здійснення остаточної ідентифікації в системах 3 та 5 з візуалізацією реактивами Манделіна та Маркі, які наносяться після обробки пластинки 1% розчином нінгідрину в ацетоні;
– проведення підтверджуючого дослідження на пластинках з RP-3 шарами в системах 7 або 8 та проявлення будь-яким з наведених реактивів [24-26].

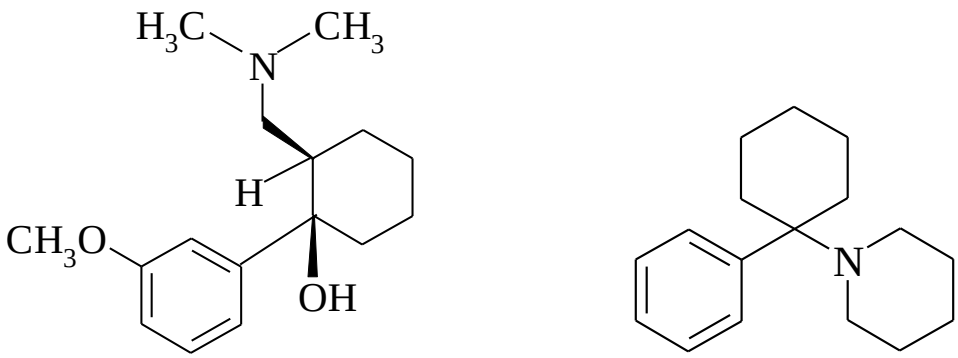
2.7 Хроматографічний розподіл структурних аналогів

Однак, метод ХТШС не відрізняється дуже високою селективністю, особливо при необхідності розподілу структурних аналогів. Тому при розробці методики виявлення речовини методом ХТШС, обов'язково досліджують хроматографічну рухливість таких речовин. Вивчення їх хроматографічних характеристик є важливою задачею для встановлення факту наявності одного із них.

Одним із прикладів структурних аналогів є кетамін, фенциклідин та трамадол (далі «структурні аналоги»):



Кетамін



Трамадол Фенциклідин

Рисунок 3. Структурні аналоги

2.7.1. Виявлення структурних аналогів за допомогою реактивів - проявників

Було вивчено взаємодію структурних аналогів, насамперед, зі стандартними проявниками, які широко використовуються у токсикологічному скринінгу, а також було проведено пошук специфічних реактивів проявників з урахуванням наявності функціональних груп у молекулі речовин, які досліджувались.

Результати візуалізації наведені в таблиці 11.

Таблиця 11

Результати візуалізації речовин

Реактив	**Речовина (забарвлення)**		
	Кетамін	**Фенциклідин**	**Трамадол**
1	**2**	**3**	**4**
6*	жовто-гаряче	жовто-гаряче	жовто-гаряче
19*	жовто-зелене	–	темно-блакитне
13*	–	коричневе	коричневе
23*	–	–	–
8*	жовто-коричневе	жовто-коричневе	жовто-коричневе

1		2	3	4
1		–	–	рожеве
20*		–	рожеве	вишневе
2		рожеве → малинове → фіолетове	коричневе → жовтогаряче → коричневе	–
26*		рожево-сіре	–	–
3		коричневе	коричневе	коричневе
4		–	сіро-зелене	чорне
5		рожеве	смарагдово-зелене	блакитне
6		буро-коричневе	коричневе	буро-коричневе
29*		голубе	смарагдово-зелене	–
12*		–	–	–
7	а)	жовто-зелене	–	темно-блакитне
	б)	–	–	буро-коричневе
4*		–	красно-коричневе	жовте

Реактиви: 6*, 19*, 13*, 23*, 8*, 20*, 26*, 29*, 12*, 4* – див. Додаток 4;

1. концентрована сульфатна кислота;

2. послідовна обробка хроматограм 0,3% розчином нінігідрину у *н*-бутанолі, нітратом міді та амоніаком (0,3 г нінгідрину розчиняють у 100 мл *н*-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 аміаку;

3. 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);

4. розчин кобальту роданіду (до 1 г кобальту нітрату (II) додають 4 г кобальту роданіду. Суміш цих речовин розчиняють в 20 мл води);

5. 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);

6. реактив Фреде (1 г молібденової кислоти або натрію молібдату розчиняють в 100 мл концентрованій сульфатній кислоті);

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

– забарвлення відсутнє.

Як виходить з даних наведених в таблиці 11, із стандартних реактивів, що використовуються у скринінгу, реактиви ФПН та Манделіна не дають забарвлення ні з одним із препаратів. Останні реактиви, за виключенням нінгідрину, дають однакове забарвлення, тому з їх допомогою досліджувані речовини не можуть бути диференційовані.

Лише нінгідрин в ацетоні дає можливість одразу припустити наявність кетаміну по жовто-зеленому кольору плями на відмінність від фіолетових, що характерні для амінів. Фенциклідин взагалі з нінгідрином не реагує, а трамадол дає типове для амінів сіре забарвлення.

З інших досліджуваних реактивів, інтерес для диференціації речовин представляють реактиви на хлор (26* та № 29*) та 2. Використання останніх дозволяє більш обґрунтовано припускати присутність кетаміну.

Встановлену чутливість цих реагентів у відношенні до кетаміну наведено у таблиці 12.

Таблиця 12

Чутливість реакції виявлення кетаміну

Реагент	**Чутливість (мг в плямі)**
1% розчин нінгідрину в ацетоні	0,001
Аміачний розчин азотнокислого срібла + опромінення УФ–світлом	0,008
0,3% розчин нінігідрину в *н*-бутанолі	0,002
0,5% розчин *о*-толідіну + опромінення УФ–світлом	0,002
Реактив Драгендорфа	0,002

2.8 Вивчення хроматографічної рухливості структурних аналогів

Дослідження даних речовин проводилось на пластинках “Sorbfil” ПТСХ–П–А УФ (силикагель СТХ–1А фракція 5 – 17 мкм, товщина шару – 110 мкм, тип підложки – ПЕТФ, зв’язуюча речовина – силиказоль, розмір платівок – 10 × 10 см) в 14 системах розчинників, серед яких № 1 – 10 рекомендовані Комітетом по систематичному токсикологічному аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів (TIAFT) (Див. таблицю 3), системи № 11 – 14 використовуються у вітчизняному ТШХ–скринінгу органічних речовин [5,6,10].

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).

По 0,1 мл 0,1 % розчинів досліджуваних речовин наносили скляним каліброваним капіляром на лінію старту, розташовану на відстані 1,5 см від

краю пластинки. Пластинку висушували на повітрі, а потім поміщали в хроматографічну камеру.

Хроматографування проводили тричі в ненасичених скляних камерах об'ємом 500 мл, що містили 10 мл рухомої фази, яка використовувалась одноразово.

Після досягнення фронтом розчинника лінії фінішу, пластинки виймали, висушували на повітрі при кімнатній температурі до видалення запаху розчинників, розглядали в УФ–променях при 254 нм. При цьому на світло–зеленому фоні з'являлися флуоресцируючі плями фіолетового кольору кетаміну, фенциклідину і трамадолу, після чого, пластинки обробляли проявниками.

Отримані значення hR_F досліджуваних речовин в загальноприйнятих хроматографічних системах наведені в таблиці 13.

Таблиця 13

Значення hR_F досліджуваних речовин в загальноприйнятих скринінгових системах

№ системи	Речовина		
	Кетамін	**Фенциклідин**	**Трамадол**
1	**2**	**3**	**4**
1	67	40	88
2	62	59	51
3	75	61	33
4	81	86	87
5	89	85	83
6	75	48	26
7	89	89	90
8	98	97	97
1	**2**	**3**	**4**
9	78	78	76

1	2	3	4
10	77	78	78
11	74	85	88
12	63	68	68
13	77	55	28
14	73	83	75

Як видно з даних таблиці 13, практично у всіх стандартних системах ТШХ–скринінгу хроматографічна рухливість усіх трьох речовин співпадає. Тому, диференціювати їх окремо ні у міжнародних, ні у вітчизняних системах практично не можливо [27, 28].

2.8.1 Оптимізація рухомої фази для ідентифікації структурних аналогів

Основним прийомом підвищення селективності в методі ХТШС є варіювання природи рухомої фази, регулювання її елюючої сили, пригнічення або посилення іонізації сорбату при додаванні до рухомої фази кислот або лугів [28]. Тому нами було проведено дослідження по пошуку більш селективних рухомих фаз для ідентифікації структурних аналогів .

Першим кроком було проведення оптимізації розподільного потенціалу рухомої фази. Після попереднього хроматографування, нами були вибрані два розчинники (ацетон, метанол) із класифікації Снайдера, які використовувалися для приготування двох видів рухомої фази в різному процентному співвідношенні компонентів.

Хроматографування речовин було проведено в 10 системах, для кожної рухомої фази тричі. Відтворюваність склала ±2%.

Таблиця 14

Значення hR_F досліджуваних речовин в запропонованих системах

№ з/п	Система	Речовина		
		Кетамін	**Фенциклідин**	**Трамадол**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
15.	гексан – ацетон (2:1)	**50**	**71**	**26**
16.	гексан – ацетон (1:2)	80	70	44
17.	гексан – ацетон (1:1)	81	81	43
18.	гексан – ацетон (1:3)	88	80	50
19.	гексан – ацетон (3:1)	**49**	**69**	**21**
20.	гексан – метанол (2:1)	46	44	47
21.	гексан – метанол (1:2)	**74**	**59**	**44**
22.	гексан – метанол (1:1)	79	77	70
23.	гексан – метанол (1:3)	84	85	80
24.	гексан – метанол (3:1)	39	34	32

З отриманих даних (Табл. 14) видно, що системи № 15, № 19 та № 21 є найбільш селективними та дозволяють надійно відокремити кетамін від фенциклідину та трамадолу. До того ж, системи № 15 та № 19 по відношенню до системи № 21 є некорелюючими відносно кетаміну та фенциклідину, що значно підвищує достовірність ідентифікації [29, 24].

Ці системи і були рекомендовані як підтверджуючі при визначенні структурних аналогів не тільки в біологічному матеріалі при проведенні токсикологічного аналізу, але і для криміналістичних цілей [23].

Крім дослідження селективності виявлення у структурних аналогів, доцільним було вивчити можливість виявлення їх виявлення на фоні найбільш поширених наркотичних та психотропних речовин, які входять до списку контрольованих (див. Табл. 14).

Цей вибір базувався насамперед на тому, що всі ці засоби є одними з найбільш розповсюджених, а деякі з них, використовуються у суміші з структурними аналогами. Ці речовини мають у структурі молекули аміногрупи, які також будуть давати при скринінгу позитивну реакцію з розчином нінгідрину, тим самим ускладнюючи виявлення, наприклад, кетаміну [8, 30].

Хроматографування вищезазначених речовин та кетаміну проводилось в системах скринінгу, рекомендованих [13] для аналізу речовин основного характеру 4, 11, 12, а отримані дані наведені в таблиці 15.

Таблиця 15

Значення hR_F досліджуваних речовин та результати візуалізації

Речовина	**Забарвлення**		**Величина hR_F в системі**		
	з 1% розчином нінгідрину	**з реактивом Маркі**	**4**	**11**	**12**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Ефедрин	фіолетове	–	46	18	31
Фенілпропаноламін	фіолетове	–	47	69	62
Меткатинон	фіолетове	–	71	53	66
Амфетамін	фіолетове	жовто-гаряче	62	62	46
Метамфетамін	фіолетове	коричневе	53	33	31
МДМА	фіолетове	чорне	53	33	32
ДМА	фіолетове	жовте	42	66	40
Трамадол	сіро-блакитне	буре	87	88	68
N-дезметилтрамадол	фіолетове	буре	68	56	52
N,N–дезметилтрамадол	фіолетове	буре	68	56	52
N,O–дезметилтрамадол	фіолетове	буре	38	43	52
Кетамін	жовто-зелене	–	81	74	63
ДПФ	темно-сіре	чорне	82	80	70

1	2	3	4	5	6
ДМФ	темно-коричневе	чорно-зелене	81	70	51
Фенілефрин	коричневе	темно-червоне	60	56	50

“–” – забарвлення не спостерігалося

Як видно з даних таблиці 15, використані системи не забезпечують необхідної селективності розподілу досліджуваних речовин, в яких хроматографічна рухливість має близькі параметри.

Для надійного розділу аналізованих речовин, було проведено дослідження по вивченню можливості використання розробленої нами системи № 15 в методі двомірної хроматографії. Даний метод передбачає використання двох систем розчинників, які мають низьку кореляцію хроматографічної рухливості для речовин, які визначаються [11].

Для цього досліджувані речовини були нанесені на лінію старту хроматографічної пластинки, яку було поміщено у систему № 11. Після закінчення хроматографування в цій системі, пластинки виймали та висушували.

Потім пластинки перевертали на 90°, відкреслювали нову лінію старту, на неї наносили по 0,1 мл 0,1% розчинів досліджуваних речовин та хроматографували в системі № 15 (див. Табл. 16).

Після досягнення фронтом розчинників відмітки 8 см пластинку виймали, висушували та проявляли 1% розчином нінгідрину, фіксуючи забарвлення та величини hR_F, а після висушування наносили реактив Маркі, який змивали водою (див. Табл. 16).

Таблиця 16

Значення hR_F досліджуваних речовин та результати візуалізації

Речовина	Забарвлення		Величина hR_F в системі 15
	з реактивом Маркі після 1% розчину нінгідрину	після змивання водою	
1	**2**	**3**	**4**
Ефедрин	малинове	малинове	0
Фенілпропаноламін	малинове	малинове	0
Меткатинон	малинове	малинове	0
Амфетамін	коричневе	коричневе	19
Метамфетамін	коричневе	коричневе	0
МДМА	чорно-сине	чорно-сине	0
ДМА	чорно-зелене	чорно-зелене	0
Трамадол	буро-коричневе	смарагдово-зелене	26
N–дезметилтрамадол	буро-коричневе	смарагдово-зелене	15
N,N–дезметилтрамадол	буро-коричневе	смарагдово-зелене	10
N,O–дезметилтрамадол	буро-коричневе	смарагдово-зелене	6
Кетамін	–	–	50
ДПФ	чорне	чорне	40
ДМФ	синьо-зелене	чорно-зелене	10
Фенілефрин	малинове	малинове	10

З даних таблиці видно, що завдяки методу двомірної хроматографії та розробленій нами системі, можливо надійно стверджувати про наявність кетаміну, у разі його присутності у суміші з іншими контрольованими речовинами [31].

2.8.2 Вибір рухомої фази для ідентифікації структурних аналогів та деяких інших наркотичних речовин

Крім найближчих структурних аналогів кетаміну та похідних амфетаміну, хибно позитивні результати при скринінгу можуть давати і інші наркотичні речовини. Багато з них є похідними третинних амінів та дають позитивні результати з реактивом Драгендорфа та розчином йодплатинату [32].

Дослідженню піддавалися структурні аналоги, а також метадон, декстропропоксифен, декстрометорфан та буторфанол, які були виділені із сечі наркологічних пацієнтів.

Таблиця 17

Хроматографічна рухливість речовин, які аналізують

Речовина	**hR_F в системах розчинників**		
	4	**11**	**12**
Кетамін	81	74	63
Фенциклідин	86	85	68
Трамадол	87	88	68
Метадон	84	88	68
ДПФ	82	63	81
ДМФ	81	70	51
Буторфанол	89	88	65
DP	**0,71**	**0,8**	**0,79**

Дослідження проводилися у тих самих рухомих фазах, які використовуються у міжнародному та вітчизняному скринінгах.

Хроматографічна рухливість досліджених препаратів наведена в таблиці 17, а склад систем розчинників в таблиці 15.

Отримані результати хроматографічної рухливості були піддані обраховуванню за величиною дискримінуючої здантості (*DP*) [28], яка визначає ймовірність того, що дві довільно вибрані речовини можуть бути розділені в конкретній хроматографічній системі з обмеженою кількістю проаналізованих речовин. Значення *DP* попадають в інтервал від 0 до 1.

Розрахунок *DP* проводится за формулою 1:

$$DP = 1 - 2M/\left[n(n-1)\right], \qquad (1)$$

де n – загальне число речовин або досліджуваних значень hR_F;

M – число пар, які не розділяються системою (ці пари не розділяються, при заданому полі похибки E = ± 0,2 од. hR_F).

Як видно, з таблиці 17, значення *DP* для систем № 4, 11 та 12 не дозволяють вірогідно розділити як структурні аналоги (наприклад, фенциклідин – трамадол, декстропропоксифен – метадон), так і речовини, які відрізняються за структурою (кетамін – декстрометорфан, буторфанол – трамадол).

Тому, для ідентифікації цієї групи речовин нами було запропоновано рухому фазу, до складу якої, у відмінності від рухомих фаз № 15, 19 та 21 додано етанол та модифікатор – 25% розчин аміаку: гексан – етанол – 25% розчин аміаку (35:65:0,5) (система №25), яка значно підвищує значення величини *DP* = 0,95 (див. Табл. 18).

Таблиця 18

Хроматографічна рухливість речовин, які аналізуються

Речовина	**hR_F в системі 25 (середнє з трьох вимірювань)**
Фенциклідин	78
Кетамін	71
Трамадол	58
Метадон	47
ДПФ	74
ДМФ	29
Буторфанол	81
DP	**0,95**

Для стандартизації умов хроматографічного розподілу у даній системі була підібрана та використана референтна суміш з чотирьох речовин, для яких величина *DP* = 1 (див. Табл. 19).

Таблиця 19

Значення величини hR_F речовин референтної суміші

Речовина	**Величини hR_F в системі 25 (n=4, P=0,95)**
Клонідін	75 ± 3
Дифенгідрамін	59 ± 3
Кодеїн	34 ± 4
Доксиламін	14 ± 2
DP	**1**

На основі запропонованих нами систем та референтної суміші, ми розробили методику визначення невідомої речовини. Для уточнення отриманих величин hR_F для невідомої речовини на пластинку, поряд з точкою референтної

суміші, наносять досліджуваний екстракт, хроматографують в системі № 25, проявляють реактивом Драгендорфа.

Після розрахунку величин hR_F досліджуваної речовини та компонентів референтної суміші проводять обчислювання за формулою 2:

$$hR_F^c(\mathrm{X}) = hR_F^c(\mathrm{A}) + \Delta^c / \Delta\left[hR_F(\mathrm{X}) - hR_F(\mathrm{A})\right], \qquad (2)$$

де $\Delta^{\tilde{n}} = hR_F^c(\mathrm{B}) - hR_F^c(\mathrm{A})$ – табличне значення величин R_F референтної суміші;

$\Delta = hR_F(\mathrm{B}) - hR_F(\mathrm{A})$ – значення hR_F, які було отримано при дослідженні.

Розрахував уточнене значення величини hR_F невідомої речовини та порівнявши його з даними таблиці 19, приступають до внутрішньогрупової ідентифікації. Для цього використовують забарвлення, які виникають при проявленні реактивами Маркі, Манделіна та Фреде при хроматографуванні екстракту в системах № 15, № 21, № 25 (див. Табл. 20, 21).

Таблиця 20

Забарвлення, які виникають при проявленні реактивами

Речовина	**Реактиви**		
	Маркі	**Манделіна**	**Фреде**
1	**2**	**3**	**4**
Фенциклідин	немає забарвлення	немає забарвлення	немає забарвлення
Кетамін	–	–	–
Трамадол	буре	синьо-зелене	сіро-зелене
ДПФ	чорне	коричневе	фіолетово-коричневе

1	2	3	4
Метадон	рожеве	синьо-зелене	сіро-коричневе
ДМФ	чорно-зелене	синьо-чорне	зелено-коричневе
Буторфанол	сіре	синьо-зелене	блакитне

Системи № 15 та № 21 використовуються для підвищення достовірності визначення кетаміну та фенциклідину, які мають близькі параметри хроматографічної рухливості, і в цьому випадку візуалізуються реактивом Драгендорфа або розчином йодплатинату.

Таблиця 21

Хроматографічна рухливість речовин, які аналізують

Речовина	**Величини hR_F в системах**	
	15	**21**
1	**2**	**3**
ДПФ	40	73
ДМФ	15	58
Буторфанол	10	57
Фенциклідин	71	54
Кетамін	50	75
Трамадол	26	44
Метадон	16	18
DP	**0,90**	**0,91**

Використання систем № 15 та № 21 дозволило не тільки достовірно розділити структурні аналоги, але і змінити порядок ретардації для кетаміну та фенциклідину [33].

2.9 Виявлення структурних аналогів та деяких наркотичних та психотропних речовин методом міцелярної ТШХ

Розробка нових більш простих, доступних та експресних методів для визначення та ідентифікації лікарських препаратів, наркотичних та психотропних речовин представляє собою важливу задачу сучасного токсикологічного аналізу. Для подальших досліджень цієї групи речовин була використана міцелярна тонкошарова хроматографія [36, 37]. Цей метод в даний час досить широко застосовується для аналізу деяких токсикантів у навколишньому середовищі, низки лікарських засобів у лікарських формах, тощо. Слід зауважити, що пропонований метод має ряд істотних переваг перед традиційними методами нормальної та оберненофазної ХТШС.

Принципово новими рухомими фазами для ХТШС, в теперішній час, виявилися міцелярні розчини поверхнево-активних речовин (ПАР), які є ультрамікрогетерогенними системами, на відміну від гомогенних сумішей розчинників, які використовуються в традиційній ХТШС.

Методи ХТШС, в яких в якості рухомих фаз використовуються міцелярні розчини ПАР, індивідуальні, змішані, а також, які містять модифікуючи добавки, отримали назву міцелярної ХТШС.

Особливостями розподілу з міцелярними рухомими фазами є те, що в процесі елюювання відбувається динамічна модифікація поверхні сорбенту іонами або молекулами ПАР; змінюється порядок елюювання речовин на пластинці порівняно з неводними або водно-органічними рухомими фазами; на пластинці при висхідному елююванні утворюється двійний фронт розчинника. Тому використання рухомих фаз на основі ПАР є одним з перспективних шляхів підвищення селективності та ефективності розподілу досліджуваних речовин.

До позитивних якостей використання міцелярних рухомих фазах в ХТШС, перш за все, відноситься екологічна безпека (на відміну від органічних розчинників, які використовуються в традиційній ХТШС, водні розчини ПАР

нетоксичні, нелетучі), скорочення часу хроматографування та загального часу аналізу.

Використання міцелярного елюенту підвищує чутливість флуоресцентного детектування плям, рухома фаза може служити ізолюючим розчином на етапі пробопідготовки.

Усі типи ПАР в залежності від їх природи поділяються на чотири основні групи: катіонні, аніонні, цвіттер–іонні та неіоногенні. При розчиненні у воді вони утворюють відповідні заряджені або незаряджені діфільні іони або молекули. Внаслідок обмеженої розчинності ПАР у воді або органічних розчинниках (10^{-5}–10^{-2} моль/л) при досягненні деякої концентрації в розчині критичної концентрації міцелоутворювання (ККМ) – вони спонтанно асоціюють, утворюючі нанорозмірні псевдофази.

Окрім величини ККМ, міцели характеризуються числом агрегації, тобто числом іонів (молекул), які входять в міцелу. У водних міцелярних системах формуються прямі міцели. Мікрофаза прямих міцел відділена від дисперсійного середовища (води) шаром, який містить полярні головні групи ПАР, які сильно гідратовані. Властивості цього шару – міжфазну поверхню розподілу можна змінювати, додаючи електроліти, органічні розчинники або ко–ПАР, молекули яких здатні радіально вбудовуватися в міжфазний шар між молекулами ПАР.

В органічних розчинниках ПАР утворюють міцели зверненого виду – зворотні міцели. Їх ядро складають полярні головні групи ПАР, а вуглеводні радикали направлені в сторону неводного розчинника (дисперсійне середовище). Присутність невеликої кількості води стимулює утворення зворотних міцел та збільшує розмір полярного водного ядра. Ефективність зв’язування речовин міцелами визначається як особливістю самих міцел ПАР, так і природою субстрату. Відомо, що прямі міцели з’вязують, як правило, гідрофобні сполуки, а зворотні міцели – гідрофільні.

Додаткові можливості підвищення селективності розподілу в міцелярній тонкошаровій хроматографії можуть бути досягнуті модифікуванням

властивостей самих міцел, наприклад регулюванням щільності заряду, поверхневого потенціалу, а також зміною ступеню гідратації та розміру міцел або в'язкості міцелярної рухомої фази шляхом додавання електролітів, органічних розчинників або ко–ПАР.

Проте, відомостей про використання методу міцелярної ХТШС у токсикологічному аналізі немає. Оскільки, міцелярна ХТШС відрізняється за принципами розподілу від нормально– та зворотньофазної ТШХ, то при позитивних результатах дослідження цей метод можна було б розглядати, як ще один з методів підтверджуючого аналізу.

У якості об'єктів ми зосередили свій погляд на наступних лікарських засобах, які використовуються з метою кримінального впливу на особистість людини: кетамін, клофелін, димедрол, донорміл. У скринінговому варіанті нормальнофазної хроматографії усі вони мають близьку хроматографічну рухливість (див. Табл. 22).

Для здійснення хроматографічного розподілу були використані хроматографічні пластинки "Sorbfil " ПТСХ–П–А УФ (силикагель СТХ–1А фракція 5 – 17 мкм, товщина шару – 110 мкм, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силиказоль, розмір платівок – 10 × 10 см).

Таблиця 22

Результати хроматографічного розподілу

Речовина	**Величина hR_F в системах**		**Забарвлення з реактивами**	
	2	**4**	**Драгендор-фа за Муньє**	**Розчин йод-платинату**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Кетамін	67	88	помаранчеве	коричневе
Клонідін	66	81	помаранчеве	коричневе
Дифенгідрамін	70	78	помаранчеве	коричневе
Доксиламін	67	69	помаранчеве	коричневе
Трамадол	68	86	помаранчеве	коричневе

Вивчення можливого впливу на селективність проводили, використовуючи різні типи ПАР (аніонні, катіонні та неіонні). Але попереднє дослідження показало, що тільки водний розчин ТВІН–80 забезпечує найліпшу рухливість відносно речовин, які досліджувалися.

Тому, для послідуючого приготування міцелярних рухомих фаз використовували розчин неіонного ПАР (ТВІН–80) у воді, при концентраціях вище та нижче критичної концентрації міцелоутворення ($ККМ_{ТВІН–80}$= $=1\cdot10^{-4}$моль/л). Задовільний розподіл досліджуваних речовин вдалося досягнути з РФ, в якій концентрація ТВІН–80 склала $5\cdot10^{-5}$ моль/л, що є нижче ККМ.

Для підвищення ефективності розподілу та поліпшення форми хроматографічних плям нами варіювалися зміни основності елюенту та введення модифікаторів.

Усі хроматографічні вимірювання дублювалися, відтворюваність знаходилася у межах ±2%. Склад оброблених систем наведено в таблиці 23.

Введення в склад базової системи окремих модифікаторів – пентанолу, оксалату амонію, нітрату амонію, ацетату амонію та 25% розчину амоніаку, задовільних результатів не дало.

Таблиця 23

Склад міцелярних хроматографічних систем

№ системи	**Склад систем**	
1	2	
26	Розчин ТВІН–80 (10 мл)	
27	–//–	+ 0,03 мл 1–пентанолу
28	–//–	+ 1,0 г оксалату амонію
29	–//–	+ 1,0 г нітрату амонію
30	–//–	+ 0,04 мл 25% розчину амоніаку
31	–//–	+ 0,04 мл насиченого розчину ацетату амонію

1	2	
32	–//–	+ 0,04 мл насиченого розчину ацетату амонію + 0,04 мл 25% розчину амоніаку
33	–//–	+ 0,04 мл насиченого розчину ацетату амонію + 0,25 мл 25% розчину амоніаку
34	–//–	+ 0,04 мл насиченого розчину ацетату амонію + 0,5 мл 25% розчину амоніаку

Для підвищення ефективності розподілу в якості модифікаторів, нами було використано суміш насиченого розчину ацетату амонію з 25% розчином аміаку (у різних співвідношеннях). Проведені дослідження дозволили отримати достатньо селективну рухому фазу № 34, яка дозволяє проводити виявлення аналітів.

Результати хроматографічного розподілу наведені в таблиці 24.

Таблиця 24

Результати хроматографічного розподілу

Система	**Величина hR_F в системах**				
	Кетамін	**Клонідин**	**Дифенгідрамін**	**Доксиламін**	**Трамадол**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
26	70	70	10	11	0
27	81	80	12	31	20
28	13	14	13	11	14
29	10	13	10	11	10
30	35	38	13	14	10
31	14	20	11	13	14
32	26	26	11	12	14
33	56	60	14	15	25
34	**64**	**75**	**11**	**10**	**23**

Для візуалізації досліджуваних речовин були використані реактиви Драгендорфа за Мун'є (див.вище Табл. 22) та розчин бромтимолового синього (див. Табл. 25). Використання останього, дозволяє надійно відділити кетамін від клофеліну, як речовини, яка має близькі параметри хроматографічної рухливості.

Таблиця 25

Забарвлення, отримані з розчином бромтимолового синього

Речовина	**Забарвлення**
Кетамін	немає забарвлення
Клонідин	синє
Дифенгідрамін	синьо-фіолетове
Доксиламін	немає забарвлення
Трамадол	сіро-синє

Отримані дані було покладено в основу способу виявлення кетаміну та сильнодіючих лікарських засобів в біологічному матеріалі [37].

Метод міцелярної ХТШС дозволив надійно підвищити селективність виявлення структурних аналогів в присутності деяких психоактивних речовин, які застосовуються з метою кримінального впливу на особистість людини.

Проведене дослідження показало, що використання методу міцелярної хроматографії має перспективу використання в токсикологічному аналізі, стосовно наркотичних та психотропних речовин.

2.10 Виявлення кетаміну, фенциклідину та трамадолу при одночасній присутності

Близькість хроматографічної рухливості кетаміну та фенциклідину може бути усунена використанням двох систем розчинників (див. Табл. 26).

Таблиця 26

Речовина	**Величина hRf в системах**	
	21	**15**
1	**2**	**3**
Фенциклідин	54	71
Кетамін	75	50
Трамадол	44	26
DP	**1**	**1**

Системи:

21) гексан – метанол (1:2);

15) гексан – ацетон (2:1).

Використання систем 21 і 15 дозволило як достовірно розділити структурні аналоги, так й змінити порядок ретардації для кетаміну і фенциклідину, що підвищує достовірність виявлення цих речовин [38, 39].

Для подальшого дослідження малих груп наркотичних та біологічно активних сполук запропоновано метод з використанням внутрішніх стандартів (трамадолу) [23].

Отримані здобутки для плям речовини, яку виявляють, та стандартної речовини повинні співпадати в межах 2%. В подальшому отримані величини використовують для виявлення речовин цієї групи (див. Табл. 27, 28).

Таблиця 27

Результати отримані з використанням речовини стандарту – трамадолу

Речовина	**Величина hRf в системах**		**ΔhR_f**	**ΔhR_f х ΔhR_f трам.**
	21	**15**		
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Фенциклідин	54	71	-17	306
Кетамін	75	50	25	450
Клонідін	63	30	33	594
Дифенгідрамін	44	12	32	576
Доксиламін	16	0	16	288
Трамадол	44	26	18	324

Системи:

21) гексан – метанол (1:2);

15) гексан – ацетон (2:1).

Та дифенгідраміну [20] (див. Табл. 28).

Таблиця 28

Результати отримані з використанням речовини стандарту – діфенгідраміну

Речовина	**Величина hRf в системах**		**ΔhR_f**	**ΔhR_f х ΔhR_f діфен.**
	1	**2**		
1	**2**	**3**	**4**	**5**
Доксиламін	69	14	55	1045
Клонідін	81	75	6	114
Ксикаїн	78	77	1	19
Кетамін	88	71	17	323
Метадон	84	47	37	703
Дифенгідрамін	78	59	19	–

Системи:

1) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (8,5:1,0:0,5);

2) гексан – етанол – 25% розчин аміаку (3:6:0,04).

Далі представлені результати досліджень з вивчення хроматографічної поведінки деяких контрольованих речовин в умовах нормально-і обернено-фазних варіантів скринінгу, який здійснюється методом хроматографії в тонких шарах сорбенту. Особливістю його проведення є використання обох механізмів поділу системи розчинників, що дозволяє підвищити селективність виявлення ряду токсикологічно важливих речовин.

Причому скринінг методом ХТШС в даний час здійснюється як у нормальнофазному, так і в оберненофазному варіантах.

У продовженні раніше розпочатих досліджень нами була здійснена спроба розробити варіант скринінгу для обмеженого кола контрольованих речовин, при якому процедура ТШХ–скринінгу поєднувала б у собі два різні за своїми принципами механізми поділу токсикантів в одній системі розчинників.

Для реалізації цього варіанта ми використовували системи, що застосовуються для групового скринінгу методом оберненофазної хроматографії на пластинках з щепленою фазою С18 на пластинках Merk.

У нашому випадку дослідження проводилися паралельно як у нормальнофазному варіанті на пластинках «Сорбфіл» ПТСХ-П-А-УФ так і на оберненофазних пластинках «Плазмохром з RP-3 шарами». Результати хроматографічної рухливості досліджуваних речовин представлені у таблиці 29.

Таблиця 29

Результати хроматографічної рухливості речовин на пластинках «Плазмохром» та «Сорбфіл»

№ з/п	Препарати	hRf в системах розчинників на пластинках «Плазмахром» (I) та «Сорбфил» (II)							
		1		2		3		4	
		I	II	I	II	I	II	I	II
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	Кодеїн	62	59	60	87	76	85	76	82
2.	Морфін	25	22	31	87	76	85	76	82
3.	Папаверин	82	82	44	80	74	85	74	88
4.	Трамадол	75	67	56	84	74	85	74	81
5.	Метадон	66	69	18	81	69	85	69	82
6.	Кокаїн	81	87	56	81	65	83	77	75
7.	Кетамін	82	79	37	81	62	84	71	75
8.	ДМФ	75	79	37	87	56	76	68	85
9.	Дифенгідрамін	68	68	18	44	33	76	68	75
10.	Метамфетамін	60	46	82	79	83	80	83	68
11.	Амфетамін	56	64	60	71	60	80	60	75

Системи: 1) ацетонітрил – етанол – 25% розчин аміаку (3:6,5:0,5);

2) метанол – вода – 25% розчин аміаку (6:4:4);

3) етанол – вода – 25% розчин аміаку (6:2:4);

4) метанол – 25% розчин аміаку (7:3).

Як очевидно з наведених у таблиці даних, по хроматографічній рухливості досліджуваних речовин можна дійти висновку у тому, що у даних системах речовини не вдалося розділити як на пластинках «Плазмохром», так і

на пластинках «Сорбфіл». Для підвищення селективності виявлення речовин, що показали близькі величини *Rf*, були використані розрахункові показники.

Показник розраховували за формулою 3:

$$Rx = \frac{Rf_{x(1)} + Rf_{x(2)}}{Rf_{ст(1)} + Rf_{ст(2)}}, \qquad (3)$$

Де: $Rf_{x(1)}$ – чисельне значення хроматографічної рухливості аналізованої речовини у системі I;

$Rf_{x(2)}$ – чисельне значення хроматографічної рухливості аналізованої речовини у системі II;

$Rf_{ст(1)}$ – чисельне значення хроматографічної рухливості речовини стандарту системі I;

$Rf_{ст(2)}$ – чисельне значення хроматографічної рухливості речовини стандарту системі II.

В якості речовини, прийнятої за стандарт, було обрано дифенгідрамін. Результати представлені у таблиці 30.

Таблиця 30

Величини Rx речовин відносно дифенгідраміну

№ з/п	Препарати	Rx в системах			
		1	2	3	4
1	2	3	4	5	6
1.	Кодеїн	0,66	2,37	1,47	1,10
2.	Морфін	0,34	1,90	1,47	0,68
3.	Папаверин	1,20	2,00	1,47	1,13
4.	Трамадол	1,04	2,16	1,47	1,08
5.	Метадон	0,97	1,59	1,22	1,05
6.	Кокаїн	1,23	1,72	1,35	1,06
7.	Кетамін	1,18	1,90	1,33	1,02
8.	ДМФ	1,13	2,00	1,21	1,06

1	2	3	4	5	6
9.	***Дифенгідрамін***	***2,00***	***1,00***	***1,00***	***1,00***
10.	Метамфетамін	0,77	2,59	1,49	1,05
11.	Амфетамін	0,76	2,11	1,28	0,94

Отримані дані показали, що краще використовувати систему 1, в якій є найменша кількість результатів, що повторюються.

Крім параметрів хроматографічної рухливості у сучасному скринінгу визначальне значення мають результати візуалізації. Ми скористалися такою послідовністю прояву пластинок, які дали результати представлені у таблиці 31.

Таблиця 31

Результати флюоресценції в УФ світлі на пластинках «Плазмохром» та «Сорбфіл»

№ з/п	Препарати	Флюоресценція в УФ світлі з довжиною хвилі в нм			
		на «Плазмахромі»		на «Сорбфилі»	
		254	365	254	365
1	2	3	4	5	6
1.	Кодеїн	фіолетова	блакитна	блакитна	жовта
2.	Морфін	фіолетова	блакитна	блакитна	жовта
3.	Папаверин	фіолетова	жовта	жовта	жовта
4.	Трамадол	синя	–	–	–
5.	Метадон	фіолетова	–	–	–
6.	Кокаїн	блакитна	–	–	–
7.	Кетамін	фіолетова	біла	–	біла
8.	ДМФ	фіолетова	жовта	жовта	жовта
9.	Дифенгідрамін	синя	–	–	–
10.	Метамфетамін	блакитна	блакитна	блакитна	жовта
11.	Амфетамін	блакитна	блакитна	–	–

А також нанесення вказаних реактивів проявників (див. Табл. 32):

Таблиця 32

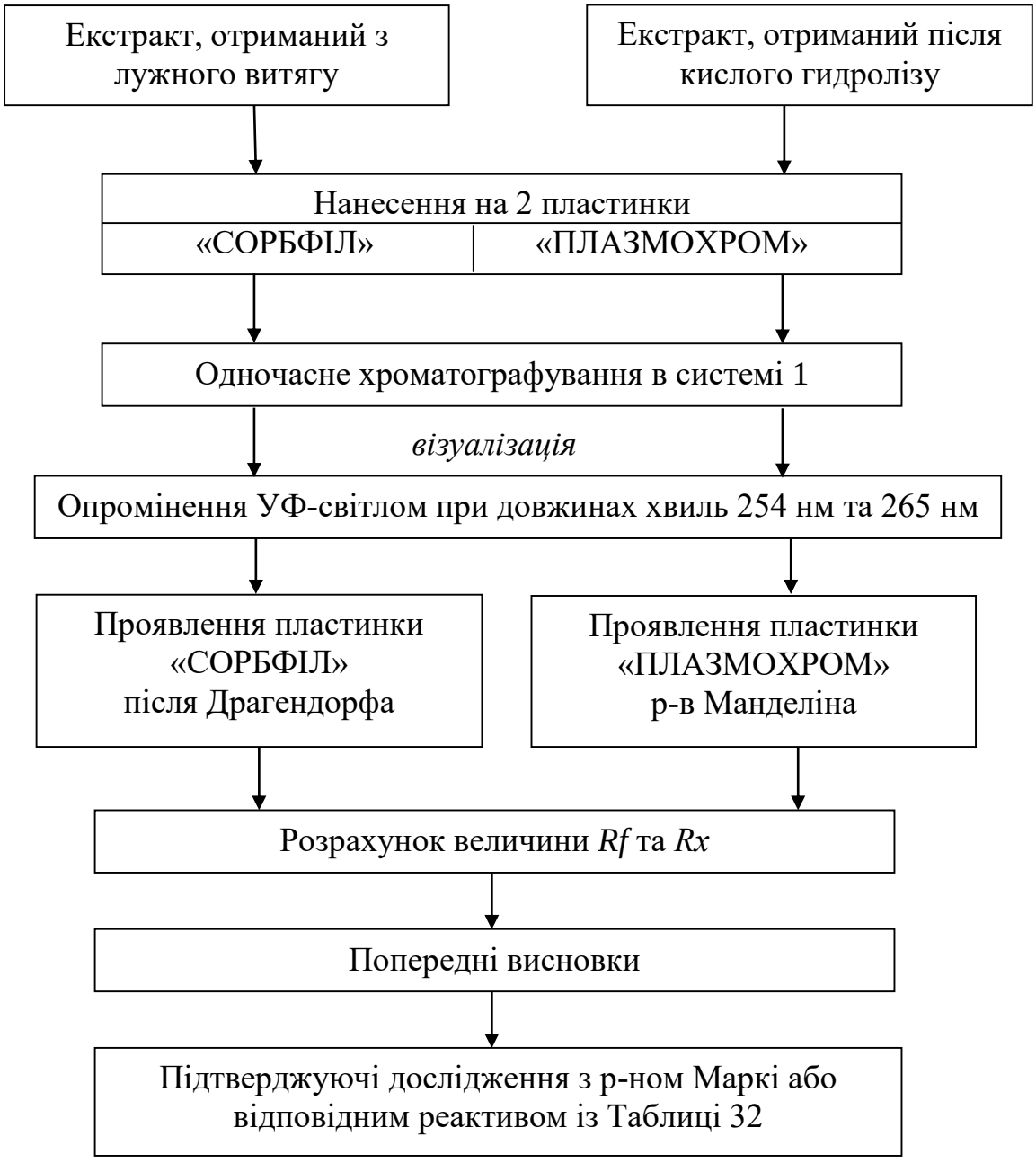
Результати візуалізації досліджуваних речовин

№ з/п	Препарати	Забарвлення з реактивами			
		Драгендорфа за Мун'є	Манделіна	1% нінгідрин в ацетоні	Маркі
1	2	3	4	5	6
1.	Кодеїн	помаранчеве	синьо-зелене	–	синьо-зелене
2.	Морфін	помаранчеве	фіолетове	–	фіолетове
3.	Папаверин	помаранчеве	синьо-фіолетове	–	фіолетове
4.	Трамадол	помаранчеве	синьо-зелене	сіре	буре
5.	Метадон	помаранчеве	синьо-зелене	–	–
6.	Кокаїн	помаранчеве	–	–	–
7.	Кетамін	помаранчеве	–	зелене	–
8.	ДМФ	помаранчеве	синьо-чорне	темно-коричневе	зелено-чорне
9.	Дифенгідрамін	помаранчеве	жовте	фіолетове	жовте
10.	Метамфетамін	жовте	–	фіолетове	помаранчеве
11.	Амфетамін	жовте	–	фіолетове	помаранчеве

Таким чином, можна запропонувати послідовність виконання ТШХ–сринінгу в одній системі розчинників на двох пластинках з різними механізмами розподілу (див. Схему 9).

Схема 9

Алгоритм скринінгу на деякі азотвмістні сполуки за допомогою НФ та ОФ механізму розподілу



Використовуючи запропоновану схему ТШХ–скринінгу в токсикологічному аналізі, можна значно підвищити селективність виявлення у разі направленого дослідження на групу контрольованих речовин. Крім цього, застосовуючи одночасно два механізми поділу в методі ХТШС, підвищується і достовірність отриманих результатів. Слід зазначити, що запропоновані системи розчинників можуть конкурувати з системами, запропонованими

Міжнародним Комітетом з токсикологічного аналізу у часі хроматографування і за відсутності у складі систем розчинників прекурсорів [15].

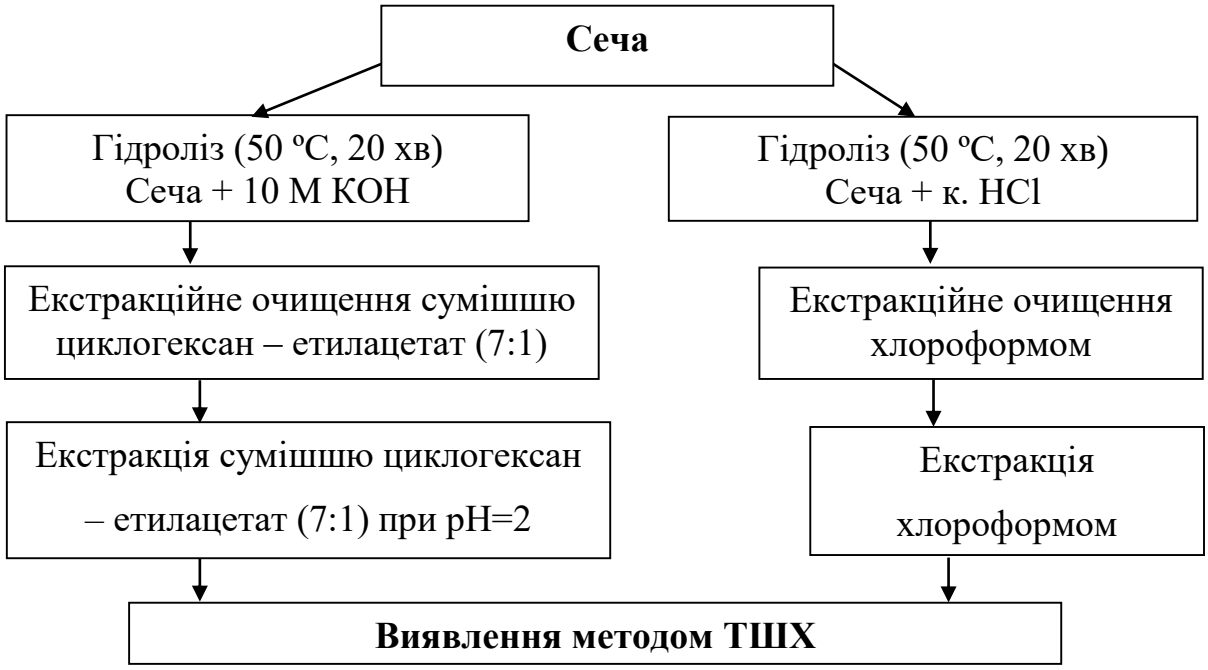
2.11 Дослідження речовин з третинною аміногрупою та їх метаболітів

Ненаправлене дослідження, як відмічалось вище, є предметом судово-медичної токсикології. Починається воно завжди зі скринінгу, що дозволяє достатньо швидко обмежити круг речовин, присутність яких можлива у біологічних об'єктах. Розглянемо детальніше вітчизняну систему скринінгу з ціллю внесення необхідних коректив, що розширюють її можливості у виявленні нових речовин, зокрема, декстропропоксифену (див. Схеми 4, 5).

За приведеною схемою ізолюються тільки токсиканти, що знаходяться у зазначених об'єктах у нативному вигляді. Продукти їх простого метаболізму – глюкуроніди, у цих умовах ізолюватися не будуть. Тому, паралельно при скринінгу на «загальне невідоме» з частиною біологічних об'єктів для переводу глюкуронидів цільових речовин у придатну для аналізу форму, проводять гідроліз – кислотний та лужний (див. Схему 10).

Схема 10

Алгоритм скринінгу на невідому речовину за метаболітами



Ряд речовин, що знаходяться у нативному вигляді, при цьому не руйнуються, що дає можливість їх виявлення у гідролізаті. У випадку з декстропропоксифеном (ДПФ) це суттєво могло б спростити задачу скринінгу, але ДПФ, який є складним естером, дуже лабільний як до кислот, так і до лугів і його виявлення у вказаних гідролізатах є неможливим.

Тому виявлення ДПФ з метою токсикологічних досліджень слід проводити за схемою виявлення нативних речовин. Вибір об'єктів дослідження при судово-токсикологічних дослідженнях традиційний – тканини внутрішніх органів, насамперед нирок, печінки, шлунку та кишківника; з біологічних рідин – сеча та кров (переважно для кількісного визначення). З метою наркологічної експертизи використовують переважно сечу. В останньому випадку, дослідження може починатися з використання імунохроматографічних тест-систем на наркотики, враховуючи ДПФ. При негативном результаті, дослідження вважається закінченим і робиться висновок про відсутність ДПФ у пробі. При позитивному результаті, враховуючи що тести на декстропропоксифен мають перехресну чутливість до трамадолу та його метаболітів, слід провести підтверджуюче дослідження методом ХТШС так, як описано нижче у алгоритмі.

Враховуючи, що при летальних отруєннях, концентрація ДПФ в органах достатньо велика, його виявлення в екстрактах, отриманих методом Васильєвої, при загальному ході судово–токсикологічних досліджень цілком можливе. А приймаючи до уваги його основні властивості, досліджувати слід «лужний» екстракт. Знайдено, що внаслідок метаболізму, у сечі, поруч з ДПФ, в значних кількостях виявляється його дезметильоване похідне – нордекстропропоксифен (див. Додаток 5 метод А). Останній також має основні властивості і виявляється у «лужному» екстракті.

Дослідження проводили методами нормально-фазової хроматографії на хроматографічних пластинках «Сорбфіл ПТСХ-П-А» в загальновідомих системах скринінгу наркотичних та лікарських речовин основного характеру (див. Табл. 33):

1) бензол – етанол – діетиламін (90:10:10);

2) циклогексан – толуол – діетиламін (75:15:10);

3) хлороформ – метанол (90:10);

4) гексан – діетиловий ефір – діетиламін (50:50:5);

5) гексан – ацетон – 25% розчин аміаку (50:50:5);

6) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5);

7) метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5);

8) метанол;

9) толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5);

10) ізопропанол – вода – 25% розчин аміаку (60:30:0,2).

Таблиця 33

Значення *hRf* аналізованих речовин

Рухома фаза	**Речовина**					
	Морфін	**Кодеїн**	**ДПФ**	**Нор-ДПФ**	**Трамадол**	**Метаболіти трамадолу**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	25	63	84	76	84	68 49
2	6	30	81	54	84	80 14
3	36	36	57	14	33	58 52 43 14
4	6	19	85	88	88	76 14
5	10	30	81	91	72	65 23

1	2	3	4	5	6	7
6	13	26	82	73	81	91 74 0,49
7	46	55	69	81	44	69
8	15	17	69	89	44	41
9	23	38	80	63	69	79 51 32
10	33	33	74	88	43	76 45 20

та обернено-фазової хроматографії на пластинках «Плазмохром RP-3» у системах (див. Таблицю 34):

11) петролейний ефір – метанол – вода (10:8:2);

12) оцтова кислота – вода (15:85);

13) н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:5);

14) етанол – вода (8:2).

Таблиця 34

Значення *hRf* аналізованих речовин

Система	**Речовина**			
	ДПФ	**Нор-ДПФ**	**Метаболіти трамадолу**	**Трамадол**
1	**2**	**3**	**4**	**5**
11	38	14	38	45
12	8	0	25	31
13	33	80 10	38	44

1	2	3	4	5
14	53	85	80 75 30	40

Візуалізацію речовин проводили реактивами (див. Додаток 5) Драгендорфа за Мун'є, Бургера, Маркі, Саймона, кислим розчином калію йодплатинату, 1% розчином нінгідрину в ацетоні з подальшою обробкою пластинок реактивом Маркі, розчином тривкого чорного К (див. Табл. 35, 36, 37).

Таблиця 35

Результати візуалізації препаратів проявниками

№ з/п	Реактив	Речовина			
		ДПФ	**Нор-ДПФ**	**Трамадол**	**Метаболіти трамадолу**
1.	Реактив Маркі	чорно-фіолетове → зелене	чорно-фіолетове → зелене	буре	буре
2.	Послідовне нанесення реактиву Маркі та води	чорно-фіолетове → зелене	чорно-фіолетове → зелене	буро-коричневе → смарагдово-зелене	буро-коричневе → смарагдово-зелене
3.	Розчин йодплатинату кислий	жовто-коричневе	жовто-коричневе	жовто-коричневе	жовто-коричневе
4.	1% розчин нінгідрину в ацетоні + реактив Маркі	рожеве → чорно-зелене	фіолетове → чорно-зелене	темно-блакитне → буро-коричневе	темно-блакитне → буро-коричневе

Була визначена чутливість зазначених реагентів відповідно ДПФ (див. Табл. 36).

Таблиця 36

Забарвлення плям декстропропоксифену та чутливість реакцій його відкриття

№ з/п	Реагент	Забарвлення плям	Межа виявлення (мкг у пятні)
1	**2**	**3**	**4**
1.	Реактив Драгендорфа (за Мун'є)	жовто-гаряче	0,2
2.	Реактив Бургера	коричневе	0,2
3.	Розчин йодплатинату кислий	жовто-коричневе	0,2
4.	Реактив Маркі	чорно-фіолетове → зелене	4
5.	Реактив Лібермана	коричневе	2
6.	Реактив Манделіна	зелено-коричневе	2
7.	Ферроціанід купруму	рожеве	2
8.	Бромкрезоловий зелений	блакитне	2

Реактиви 1 – 6 (див. Додаток 5).

Ферроціанід купруму: до 7 мл розчину гексаціанофериту калію додавали по краплях 3 мл розчину сульфату купруму.

Бромкрезоловий зелений: до 25 мл 0,03 % розчину бромкрезолового зеленого в 80% водному метанолі додавали 2 краплі 3% розчину гідроксиду натрію. Реактив використовували свіжовиготовленим.

Результати проведених досліджень показали, що визначення ДПФ в сечі можливе тільки після кислотного гідролізу його метаболіту.Таким чином, при

проведенні скринінгу на невідому отруту, виявлення ДПФ слід проводити після гідролізу в тій пробі, що і для опіатів.

Вивчення хроматографічної рухливості (Табл. 33) свідчить про те, що ДПФ та його метаболіти добре відділяються від морфіну та кодеїну у всіх системах та при одночасній присутності можуть бути легко ідентифіковані. При одночасній присутності трамадолу та його метаболітів розділити їх у системах № 6 та № 9, які використовують для первинного скринінгу речовин основного характеру, не вдається. Задовільне розділення зебезпечують системи № 5 та № 8. Найбільш селективною є система № 8, в якій трамадол та його метаболіти виходять практично однією плямою та добре відділяються від ДПФ та нордекстропропоксифену. Остаточно диференціювати ДПФ та нордекстропропоксифен від трамадолу та його метаболітів можна, використовуючи для проявлення реактив Маркі або послідовне нанесення розчину нінгідрину в ацетоні та реактиву Маркі (Табл. 35).

На пластинках «Плазмохром RP-3» (Табл. 34) деяка інформація може бути отримана в системі № 12, в якій ДПФ та його метаболіти залишаються практично на старті, на відміну від трамадолу та його метаболітів. В інших системах ці речовини не розділяються.

Вивчення реагентів для візуалізації ДПФ показало, що найбільш чутливими з них є реактиви Драгендорфа, Бургера та кислий йодплатинат калію, а найбільш селективним – реактив Маркі (Табл. 36).

Крім того, ряд рухомих фаз селективних для ДПФ і нор-ДПФ можуть розглядатися як не корелюючи (наприклад, пари 2, 3, 6 та 7 – 10). Як відомо, застосування в токсикологічному аналізі не корелюючих рухомих фаз прирівнюється до використання іншого методу дослідження, що у результаті значно підвищує достовірність ідентифікації.

Так як у нордекстропропоксифені присутня вторинна аліфатична аміногрупа, яка дає характерне забарвлення з розчином нінгідрину в ацетоні, що може призводити до хибно позитивного відкриття амфетамінів, було проведене дослідження, спрямоване на вивчення хроматографічної рухливості

нордекстропропоксифену в присутності фенілалкіламінів у системах, які зазвичай використовуються для виявлення амфетамінів (Табл.37):

1) етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5);

2) метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5);

3) толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5).

Таблиця 37

Значення *hRf* аналізованих речовин

№ з/п	Речовина	Рухома фаза		
		1	2	3
1	2	3	4	5
1.	ДПФ	82	69	8
2.	Нор-ДПФ	73	81	63
3.	Метамфетамін	53	34	33
4.	Амфетамін	70	66	62
5.	Меткатинон	70	66	53
6.	Ефедрин	44	30	30
7.	Псевдоефедрин	68	63	65
8.	Норпсевдоефедрин	50	60	70
9.	Фенілефрин	63	50	56
10.	МДМА	53	49	33
11.	ДМА	42	40	66

Значення *hRf* фенілалкіламінів у запропонованих системах відрізняються від *hRf* речовин, що вивчаються, а візуалізація цих речовин реактивами для внутрішньогрупової ідентифікації фенілалкіламінів (див. Табл. 38) допомагає надійно відрізнити фенілалкіламіни від ДПФ та його метаболіту.

Таблиця 38

Результати візуалізації препаратів

№ з/п	Речовина	1% розчин нінгідрину в ацетоні	Реактив тривкий чорний К	Реактив Саймона
1	**2**	**3**	**4**	**5**
1.	Декстропропоксифен	рожеве	–	–
2.	Нордекстропропоксифен	фіолетове	–	–
3.	Метамфетамін	фіолетове	жовто-гаряче	блакитне
4.	Амфетамін	фіолетове	фіолетове	коричневе
5.	Меткатинон	фіолетове	фіолетове	блакитне
6.	Ефедрин	фіолетове	жовто-гаряче	блакитне
7.	Псевдоефедрин	фіолетове	жовто-гаряче	блакитне
8.	Норпсевдоефедрин	фіолетове	фіолетове	блакитне
9.	Фенілефрин	фіолетове	жовто-гаряче	блакитне
10.	МДМА	фіолетово-коричневе	жовто-гаряче	темно-блакитне
11.	ДМА	жовте	фіолетове	рожеве

Таким чином, результати проведених досліджень дозволяють на стадії скринінгу ідентифікувати ДПФ та його метаболіт у присутності опіатів, трамадолу та похідних фенілалкіламінів, використовуючи метод ТШХ в поєднанні з наведеними реактивами проявниками [42-46].

Ще одним препаратом, метаболіти якого досліджувались, є бензидамін – це протизапальний препарат, який є предметом немедичного використання [47].

Бензидамін та його метаболіт порівнювались з хроматографічними параметрами нестероїдних протизапальних засобів, до яких належать диклофенак, мефенамінова кислота, пропифеназон, індометацин, німесулід, піроксикам, мелоксикам.

Ці азотвмісні нестероїдні протизапальні препарати, в біологічних рідинах людини, досліджувались з використанням декількох реактивів проявників (див. Табл. 39) в стандартних системах.

Відомим є спосіб визначення деяких азотвмісних нестероїдних протизапальних препаратів в біологічних рідинах людини, в основу якого покладено метод ТШХ та визначення їх з використанням декількох реактивів проявників (див. Табл. 39), що дозволяє візуалізувати ці лікарські засоби. Як видно з отриманих даних, в разі присутності в одній пробі суміші досліджуємої речовини (бензідаміну) та лікарських засобів (наприклад, індометацину), неможливо вірогідно встановити присутність в екстрактах здобутих з сечі людини останнього, так як його забарвлення з реактивом проявником та хроматографічна рухливість співпадає з вищенаведеними препаратами.

Таблиця 37

Результати хроматографічного розподілу нестероїдних протизапальних лікарських засобів

№ з/п	Речовина	Забарвлення з реактивами			hRf в системах		
		8*	6*	12*	1	2	3
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Бензидамін	коричневе	помаран-чеве	коричнево-зелене	41	47	45
2.	Диклофенак	сіро-коричневе	коричневе	буро-чорне	10	12	81
3.	Індометацин	світло-коричневе	жовте	коричневе	43	8	71
4.	Мелоксикам	жовте	–	жовте	16	11	45

1	2	3	4	5	6	7	8
5.	Мефенамінова кислота	сіре	–	синьо-блакитне	78	20	77
6.	Німесулид	жовте	помаран-чеве	помаран-чеве	77	33	82
7.	Піроксикам	–	помаран-чеве	–	71	10	83
8.	Пропіфеназон	жовте	жовте	світло-сіре	73	80	78

Системи:

1) хлороформ – ацетон (9:1);

2) толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (4,5:4,5:0,75:0,25);

3) метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5).

Реактиви – проявники (8*, 6*, 12*): див. Додаток 4.

Крім цього в рекомендованих системах розчинників 1, 2 та 3 неможливо підвищити ефективність розподілу для речовин, які підлягають аналізу.

Тому, ці препарати були проявлені реактивами 1 – 5 [48] (див. Табл. 40).

Таблиця 40

Результати забарвлення нестероїдних протизапальних лікарських засобів

№ з/п	Речовина	Реактиви				
		1	2	3	4	5
1	2	3	4	5	6	7
1.	Диклофенак	–	коричневе	фіолетове	жовте	–
2.	Німесулід	жовте	жовте	жовте	зелене	–
3.	Мефеномінова к-та	–	коричневе	фіолетове	жовте	–
4.	Пропіфеназон	–	блакитне	червоне	–	–
5.	Індометацин	–	жовте	фіолетове	жовте	–
6.	Бензидамін стандарт	–	синє	–	–	синє

1	2	3	4	5	6	7
7.	Витяг бензидаміну з кислого екстракту	–	синє *hRf*=5 синє *hRf*=57	–	–	синє *hRf*=5 синє *hRf*=57
8.	Витяг бензидаміну з лужного екстракту	–	синє *hRf*=5 синє *hRf*=57	–	–	синє *hRf*=5 синє *hRf*=57

Реактиви – проявники:

1. Суміш 10% розчину міді сульфату та 2% аміаку (5:1).

2. 1% розчин о-толідину після 0,3 М розчину міді сульфату.

3. 0,1% розчин метилового червоного в етанолі, після нанесення витримують при 100°С 5 хв.

4. 0,03% розчин бромкрезолового зеленого в 80% водному розчині метанолу, до якого додають 8 крапель 3% натрію гідроокису.

5. 0,1% спиртовий розчин бромкрезолового зеленого, до якого додають 1% оцтову кислоту до жовтого забарвлення.

Спосіб виявлення бензидаміну разом з його метаболітом N-оксидом бензидаміну серед нестероїдних протизапальних речовин в сечі людини вдалося поліпшити за рахунок дослідження двох екстрактів – кислого та лужного та проявленням останніх бромкрезоловим зеленим в уксусній кислоті [49-51].

Дослідження проводять наступним чином:

20 мл сечі пацієнта підкислюють хлороводневою кислотою до pH=1-2 та проводять екстракцію 20 мл хлороформу. Верхній ефірний шар відокремлюють і використовують для визначення речовин кислої природи (екстракт 1). Водну

фазу підлужують 25% розчином аміаку до pH=9-10 та екстрагують двічі з 20 мл суміші хлороформ – 2-пропанол (9:1). Отримані екстракти 1та 2 випарюють на повітрі й сухі залишки розчиняють у 0,5 мл хлороформу. По 50 мкл екстрактів наносять на лінію старту хроматографічних платстинок «Сорбфіл». Після закінчення хроматографування в системі 2 або 3 пластинки проявляють реактивом 5 (бромкрезоловим зеленим в уксусній кислоті) та визначають величину *hRf*. При співпадінні величини *hRf* речовин, що досліджуються, з табличними, а також виникненням відповідного забарвлення (див. Табл. 40) роблять попередній висновок про наявність бензидаміну.

Для остаточної ідентифікації 50 мкл розчину екстрактів 1 та 2 та стандартні розчини лікарського засобу бензидаміну та його метаболіту наносять на лінію старту двох хроматографічних пластинок «Сорбфіл». Після закінчення хроматографування в системах розчинників пластинки витягають, висушують та знов проявляють реактивом 5, фіксуючи забарвлення та величини hRf. Отримані величини для плям речовини, яку виявляють, та стандартних речовин повинні співпадати в межах 2%. При дослідженні паралельно проводили аналіз як екстрактів отриманих з сечі, так і фармакопейних стандартів (Бензидаміну гідрохлориду (ВР) – категорія № 610, серія – 3984; Бензидаміну N-оксиду (LGC) – категорія № MM0142.08, серія – 142.08.09.02). Дослідження підтверджено методом ВЕРХ (метод В).

ПІСЛЯМОВА

Наведені в цій роботі данні є маленьким внеском в безперервний потік розвитку аналітичної токсикології, позаяк нітрогенвмісні сполуки в подальшому будуть предметом досліджень, в тому числі і методом ХТШС. Невпинно зростаюча кількість лікарських засобів з одного боку, а з іншого – контрольованих нових психоактивних речовин, таких як катинони, похідні фентанілу, бензодіазепіни [52, 53] ще чекають свого виявлення різноманітними методами анлізу.

ВИСНОВКИ

У монографії здійснено узагальнення теоретичних та практичних питань токсикологічного аналізу окремих груп токсикантів методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

1. Наведено погляди авторів в застосуванні методу хроматографії в тонких шарах сорбенту відносно вирішення практичних аспектів в здійснені токсикологічного аналізу нітрогенвмісних сполук.

2. Наведені данні по виявленню нітрогенвмісних сполук в залежності від присутності в них первинної, вторинної та третинної аміногруп.

3. Методом тонкошарової хроматографії були отримані задовільні результати в проведенні загальногрупових досліджень речовин, поєднаних хімічною структурою або фармакологічною дією.

4. Показано, що для невеликих груп речовин, поєднаних кислотно-лужними властивостями, можливо, методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, здійснювати виявлення окремих токсикологічно важливих речовин з залученням нових реактивів проявників.

5. Застосування нових систем розчинників та залучення розрахункових методів для отримання відповідних індексів, по яким здійснюють ідентифікацію, значно підвищує вибірковість у виявленні нітрогенвмісних речовин, що підтверджує переваги данного способу у проведенні токсикологічних досліджень.

6. Залучення нового варіанту розподілу в методі хроматографії в тонких шарах сорбенту – міцелярної рухомої фази, дозволило отримати задовільні результати, які в подальшому можуть бути використані в токсикологічному аналізі.

7. Усі практичні здобутки, які наведені в монографії, були опубліковані у наукових статтях та захищені патентами України.

8. Отримані практичні дані та їх застосування в методології «ТШХ – скринінгу» або у виявленні окремих речовин, можуть бути використані фахівцями з аналітичної токсикології.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Специфічність реактивів

Реактив	Речовини або групи речовин які дають позитивний результат
Браттона–Маршалла	Первинні ариламіни, піразолони та їх метаболіти, кінуренин, триптофан та його аналоги, креатинін, уроканова, аміногіппурова кислоти
β– або α–Нафтол	
Бромфеноловий синій – срібла нітрат	Азотовмісні сполуки які містять третинний азот, тіоли, сульфони, фульфоксиди тощо
Ван–Урка	Карбамати (мепробамат та ін.), сульфонаміди, фенілсечовини, феноламіни, феноли, первинні та вторинні ароматичні аміни, гідразиди (ізоніазид та ін.)
Дифеніламін	Галогенвмісні сполуки та речовини, які містять нітрильну групу (фоксим)
Драгендорфа за Мун'є	Всі азотовмісні сполуки, які містять четвертинний (модифікація III), третинний та іноді і вторинний азот
Заліза (III) хлорид	Саліцилати, феноли, нафтоли, амінофеноли, піразолони, фенотіазини, алкалоїди які містять фенольні фрагменти (морфін)
Йодоплатинат підкислений	Всі азотовмісні сполуки, які містять третинний та іноді і вторинний азот
Йоду розчин – хлоридної кислоти спиртовий розчин	Похідні пурину, азотовмісні сполуки
Калію перманганат підкислений	Речовини які мають ненасичені (кратні) хімічні зв'язки, всі органічні сполуки
Лібермана	Різноманітні органічні сполуки

Продовження Додатку 1

Реактив	**Речовини або групи речовин які дають позитивний результат**
Манделіна	Різноманітні органічні сполуки
Маркі	Різноманітні органічні сполуки
Міді сульфат – калію йодид	Різноманітні органічні сполуки
Тривкий синій Б	Каннабіноїди, феноли, нафтоли, єноли, гетероциклічні сполуки
Тривкий чорний К	Аміни, феноли, єноли, нафтоли, гетероциклічні сполуки
Натрію гідроксид 5% розчин	Нітросполуки (переважно ароматичні)
Натрію молібдат	Неорганічний фосфат
Нінгідрин	Алкіламіни, амінокислоти, піразолони, гетероциклічні сполуки
Нінгідрин в концентрованій сульфатній кислоті	Трамадол, його метаболіти, інші органічні сполуки
п–Нітроаніліну діазатований розчин	Аміни, феноли, нафтоли, єноли, гетероциклічні сполуки
Паладію (II) хлорид	Тіосполуки, речовини у яких в бензольному ядрі поруч дві гідроксогрупи (адреналін, карбідопа, добутамін та ін.)
FPN	Фенотіазини, дибензазепіни, феноли, аріламіни, арілзаміщені амфетаміну
Симона	Первинні та вторинні алкіламіни, α,β–ненасичені лактони, тіоли, гетероциклічні сполуки, продукти метаболізму та розкладу амінокислот, біогенні аміни

Продовження Додатку 1

Реактив	**Речовини або групи речовин які дають позитивний результат**
Резорцину лужний розчин	Сполуки які мають галогенметильну групу
Срібла нітрат аміачний розчин	Галогенвмісні сполуки, діоли, єноли, феноли, нафтоли, амінофеноли
Сульфат ртуті – дифенілкарбазон	Похідні барбітурової кислоти, сульфаніламіди, пурини, мепробамат
Сульфатної кислоти 50 % розчин в етанолі	Фенотіазини, піразолони, амінофеноли, антибіотики групи тетрацикліну, доксициклін, доксиламін, димедрол, амітриптилін
о-Толідин	Галогенвмісні сполуки, ліпіди, ненасичені сполуки.
Фурфурол	Карбамати (окрім N–заміщених похідних) кетазолам, мефеназим, метилпентинол

Додаток 2

Застосування реактивів в токсикологічному скринінгу лікарських, наркотичних засобів та психотропних препаратів

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ІЗОЛЮЮТЬСЯ ПРИ pH 2 – 3	**РЕЧОВИНИ, ЯКІ ІЗОЛЮЮТЬСЯ ПРИ pH 8 – 12**
Сульфат ртуті – дифенілкарбазон (барбітурати, ноксирон, сульфаніламіди, мепробамат)	**Сульфатної кислоти 50 % розчин в етанолі, Реактив FPN** (фенотіазини)
Заліза (III) хлорид (саліцилати, піразолони)	**Заліза (III) хлорид** (піразолони, фенотіазини)
Ван–Урка реактив (карбамати, сульфаніламіди, піразолони)	**Драгендорфа реактив, Йодоплатинат підкислений** (алкалоїди, азотовмісні речовини)
Фурфурол (підтвердження мепробамату)	**Нінгідрин** (фенілетил–, фенілпропіламіни)
Драгендорфа реактив (похідні пурину, піразолони та інші азотовмісні речовини – слабкі основи)	**Маркі реактив, Манделіна реактив, Лібермана реактив** (алкалоїди, азотовмісні речовини)
Маркі реактив, Манделіна реактив, Лібермана реактив (димедрол, амітриптилін, ноксирон, папаверин, інші слабкі основи, нестероїдні протизапальні засоби)	**Тривкий чорний К, реактив Симона** (з'ясування деталей будови похідних фенілетил– та фенілпропіламінів)
Йоду розчин–хлоридної кислоти спиртовий розчин (підтвердження похідних пурину)	**Срібла нітрат аміачний розчин** (галогенвмісні препарати та засоби)
Тривкий синій Б (каннабіноїди)	**Міді сульфат – калію йодид** (відкриття клофеліну)
Браттона–Маршалла реактив, β– або α–Нафтол (амінобензофенони, амінопохідні препарати та засоби)	

Додаток 3

Реактиви, які мають судово–негативне значення

РЕАКТИВ (його порядковий №)	**ГРУПА РЕЧОВИН**
Браттона–Маршалла реактив (№ 1)	Амінобезофенони, первинні аріламіни
Ван–Урка реактив (№ 4)	Індоламіни, мепробамат та інші карбамати
Драгендорфа за Мун'є реактив (№ 6)	Алкалоїди, азотовмісні лікарські, наркотичні речовини та психотропні засоби
Заліза (III) хлорид (№ 7)	Саліцилати
Йодоплатинат підкислений (№ 8)	Алкалоїди, азотовмісні лікарські, наркотичні речовини та психотропні засоби
Міді сульфат – калію йодид (№ 14)	Клофелін
Тривкий синій Б (№ 15)	Каннабіноїди
Натрію гідроксид 5% розчин (№ 17)	Нітропохідні пестициди
Натрію молібдат (№ 18)	ФОП
Нінгідрин (№ 19)	Алкіламіни
п–Нітроаніліну діазатований розчин (№ 21)	Пестициди з групи карбаматів
Реактив FPN (№ 23)	Фенотіазини
Срібла нітрат аміачний розчин (№ 26)	Галогенвмісні лікарські, наркотичні речовини та психотропні засоби
Сульфат ртуті – дифенілкарбазон (№ 27)	Барбітурати
Сульфатної кислоти 50 % розчин в етанолі (№ 28)	Фенотіазини
о–толідин (№ 29)	Галогенвмісні пестициди

Додаток 4

Поділ реактивів за інформативністю отримуваної аналітичної інформації

Інформативні	**Неінформативні**
Браттона–Маршалла реактив	Бромфеноловий синій – срібла нітрат
β– або α–Нафтол	Дифеніламін
Ван–Урка реактив (відносно похідних індолу)	Драгендорфа реактив
Заліза (III) хлорид	Йодоплатинат підкислений
Лібермана реактив	Йоду розчин – хлоридної кислоти спиртовий розчин
Манделіна реактив	Калію перманганат підкислений
Маркі реактив	Міді сульфат – калію йодид
Тривкий синій Б	Тривкий чорний К
Натрію гідроксид 5% розчин	Нінгідрин
Натрію молібдат	Нінгідрин в концентрованій сульфатній кислоті
п–Нітроаніліну діазатований розчин (в лужному розчині на феноли)	Реактив Симона
Паладію (II) хлорид	Резорцину лужний розчин
Реактив FPN	Сульфат ртуті – дифенілкарбазон
Срібла нітрат аміачний розчин	о–Толідин
Сульфатної кислоти 50 % розчин в етанолі	Фурфурол

Додаток 5

РЕЦЕПТУРНИЙ РОЗДІЛ

1. БРАТТОНА–МАРШАЛЛА РЕАКТИВ

Приготування:

а) 17 мл концентрованої хлоридної кислоти перенести в колбу із 40 мл дистильованої води та довести загальний об'єм до 100 мл. Розчин зберігати в скляному посуді при кімнатній температурі (далі к.т.)[1]. Термін придатності необмежений.

б) 1 г натрію нітриту ($NaNO_2$) розчини в 100 мл дистильованої води. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності один рік.

в) Розчинити 5 г сульфамата амонію в 100 мл дистильованої води. Розчин зберігати в скляному посуді в умовах холодильника[1]. Термін придатності один рік.

Примітка:

Як альтернатива сульфамату амонію може використовуватись насичений розчин сечовини (Увага! При розчиненні розчин сильно охолоджується). Готовий розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності необмежений

г) Розчинити 0,1 г N–(1–нафтил)–етилендіаміну дигідрохлориду в 10 мл дистильованої води. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати розчинами (а) та (б), витримати 5хв та потім розчинами (в) та (г). При обприскуванні необхідно запобігати рясному зволоженню хроматографічної пластинки.

Візуальний ефект:

Амінобензофенони, сульфаніламіди і продукти їх гідролізу та інші первинні ароматичні аміни дають червоне та червоно–фіолетове забарвленя.

Піразолони та пїх родукти гідролізу дають переважно сине забарвлення.

<u>Специфічність:</u>

Утворення кольорових продуктів реакції засновано на утворенні азобарвника між діазатованим первинним аріламіном, на хроматографічній пластинці, та N–(1–нафтил)–етилендіаміном. Також азобарвник може утворюватися в наслідок окислювального азосполучення із нітрозосполуками (піразолони), N–нітрозоамінами, і нітрозофенолами які утворю після взаємодіїї із нітритом натрію. Разом із первинними ароматичними амінами позитивний результат дають кінуренин, триптофан та його аналоги, креатинін, уроканова, аміногіппурова кислоти та інші природні метаболіти.

Увага! N–(1–нафтил)–етилендіамін чутливий до окисників та дуже легко окиснюється з утворенням продуктів червоного та малинового кольору які можуть дати хибно–позитивний результат, тому при використанні необхідно контролювати присутність окисників, в тому числі і нітриту натрію. Реактив інформативний та має судово–негативне значення відносно амінобензофенонів та сполук із первинною ароматичною аміногрупою.

2. β– або α–НАФТОЛ

<u>Приготування:</u>

а) 17 мл концентрованої хлоридної кислоти перенести в колбу із 40 мл дистильованої води та довести загальний об’єм до 100 мл. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності необмежений.

б) 1 г натрію нітриту ($NaNO_2$) розчини в 100 мл дистильованої води. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності один рік.

в) Розчинити 0,01 г β– або α–нафтолу в 10 мл 2М розчину калій або натрій гідроксиду. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати розчинами (а) та (б), витримати 5хв та потім розчином (в). При обприскуванні необхідно запобігати рясному зволоженню хроматографічної пластинки.

Візуальний ефект:

Амінобензофенони, сульфаніламіди і продукти їх гідролізу, продукти гідролізу піразолонів та інші первинні ароматичні аміни дають забарвлення від червоного до коричнево–червоного.

Специфічність:

Дивись Браттона–Маршалла реактив.

3. БРОМФЕНОЛОВИЙ СИНІЙ–СРІБЛА НІТРАТ

Приготування:

а) 0,25 г бромфенолового синього розчинити в 50 мл ацетону. Розчин зберігати в скляному посуді із щільно загвинченою поліетиленовою кришкою. Термін зберігання один рік.

б) 0,15 г срібла нітрату розчинити в 3 мл дистильованої води, додати 6 мл ацетону та 1 мл розчину (а). Використовувати свіжовиготвлений розчин.

в) 0,5 г кислоти лимонної моногідрату розчинити в 25 мл дистильованої води. Розчин зберігати в скляному посуді з темного скла. Термін придатності п’ятнадцять днів.

Послідовність застосування:

Хроматографічну зону обприскати розчином (б) та через п’ять хвили розчином (в).

Візуальний ефект:

Плями блакитного кольору на жовтому фоні.

Специфічність:

Утворення кольорових продуктів взаємодії засновано на осадженні забарвленого іонного асоціату в якому катіоном є комплекс срібла із речовиною яка містить гетероатоми з вільною парою електронів, а аніоном бромфеноловий синій. Використовується для виявлення азотовмісних речовин, тіоФОП. Реактив не специфічний та малоінформативний. Позитивний результат дають всі речовини які містять гетероатоми (N, S, O) (органічні основи, алкалоїди, тіоли, сульфони, фульфоксиди тощо). Реактив не специфічний та неінформативний.

4. ВАН–УРКА РЕАКТИВ

Приготування:

0,1 г п–диметиламінобензальдегіду (ПДАБ) розчинити в 10 мл етанолу та додати 1 мл концентрованої хлоридної кислоти. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

Обприскати хроматографічну зону та нагріти хроматографічну пластинку при 100 °С впродовж 5–10 хвилин.

Візуальний ефект:

Жовті, оранжеві, рожеві, червоні, сірі, фіолетові та сині плями.

Специфічність:

Утворення кольорових продуктів засновано на реакціях конденсації альдегіду (ПДАБ) з різноманітними сполуками. Реактив інформативний відносно похідних індолу завдяки утворенню характерного синього забарвлення. Мепробамат та сульфонаміди дють жовте забарвлення. Багато інших сполук, таких як фенілсечовини, карбамати, феноламіни, феноли, первинні та вторинні ароматичні аміни, гідразиди (ізоніазид) та інші, також дають різноманітне забарвлення. Реактив має судово–негативне значення відносно мепробамату, інших карбаматів та індоламінів.

5. ДИФЕНІЛАМІН

Приготування:

а) 1 г дифеніламіну розчинити в 5 мл ацетону. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

б) 1 г цинку хлориду розчинити в 10 мл ацетону. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

в) змішати розчини (а) та (б). Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

Обприскати хроматографічну зону розчином (в) та витримати хроматографічну пластинку в промінях кварцевої лампи без фільтру впродовж 5–10 хвилин.

Візуальний ефект:

Зелені, фіолетові, блакитні, сірі, червоні, коричневі та лилові плями.

Специфічність:

Поява кольорових плям засновано на утворенні кольорових продуктів окиснення дифеніламіну атомарним галогеном який утворюється внаслідок фотолітично відщеплення від молекул досліджуваної речовини. Аналогічний ефект дають деякі нітрили. Реактив інформативний відносно галогенів. Позитивний результат дають галогенвмісні сполуки та речовини які містять нітрильну групу (фоксим).

6. ДРАГЕНДОРФА ЗА МУН'Є РЕАКТИВ

І. Для хроматографічних пласти із алюмінієвою основою.

а) 1,7 г бісмуту нітрату основного (субнітрату) або карбонату основного (субкарбонату) перенести в мірний стакан, розчинити в 20 мл концентрованої оцтової кислоти та довести загальний об'єм до 100 мл дистильованою водою. Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла (к.т.) поки не з'явиться осад.

б) 15 г калію йодиду перенести в мірний стакан та розчинити в 30 мл дистильованої води та довести загальний об'єм до 50 мл. Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла (к.т.), в захищеному від світла та парів кислот і окисників місті. Термін придатності розчину три місяці.

в) перед використанням змішати по 5мл розчинів (а) та (б), додати 10 концентрованої оцтової кислоти та 50 мл дистильованої води. Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла (к.т.), в захищеному від світла місті. Термін придатності розчину два дні.

ІІ. Для хроматографічних пласти із скляною та полімерною основою.

2 г бісмуту нітрату основного (субнітрату) або карбонату основного (субкарбонату) перенести в мірний стакан, розчинити в 6 мл концентрованої хлоридної кислоти (при необхідності нагріти, але не до кипіння) і додати 40 мл

дистильованої води. В охолоджений розчин невеликими порціями при постійному перемішуванні додати 5 г калій йодиду (Увага! Можливе випадіння чорного осаду який не впливає на якість реактиву). Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла (к.т.) в захищеному від світла місті. Термін придатності розчину один місяць.

III. Модифікація Брегоффа–Дельвіче для виявлення четвертинних основ.

а) 8 г бісмуту нітрату пентагідрату розчинити в 25 мл розчину нітратної кислоти із масовою часткою кислоти 25 % (питома вага 1,147 г/мл). До розчину при постійному перемішуванні, невеликими порціями додати послідовно 20 г калію йодиду, 1 мл 6 М розчину хлоридної кислоти та 5 мл дистильованої води.

До утвореного темного осаду додати 95 мл дистильованої води, при цьому розчин повинен забарвитись в оранжево–червоний колір. У випадку якщо залишиться нерозчинний осад його необхідно відфільтрувати а загальний об'єм довести дистильованою водою до 100 мл. Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла в умовах побутового холодильнику. Термін придатності розчину два тижні.

б) До 20 мл дистильованої води при перемішуванні послідовно додати: 5 мл 6 М розчину хлоридної кислоти, розчину (а) та 6 мл 6 М розчину натрію гідроксиду. У випадку якщо при перемішуванні не весь бісмуту гідроксид розчиниться, необхідно додати кілька крапель 6 М розчину хлоридної кислоти до його розчинення. **Перед використанням готовий розчин необхідно витримати в умовах побутового холодильнику 10 діб**!

Застосування:

Обприскати хроматографічну зону одним з трьох приготовлених розчинів (I(в), II або III (б)).

Візуальний ефект:

Оранжеві або червоно–оранжеві плями.

Специфічність:

Утворення кольорових плям засновано на осадженні забарвлених комплексів тетрайодобісмутату та органічних сполук переважно із третинним азотом. Реактив не специфічний і неінформативний, але має судово–негативне значення відносно речовин із третинним азотом, а у випадку модифікації Брегоффа–Дельвіче з четвертинним азотом та клофеліну. Позитивний результат дають всі основи які містять в своїй структурі третинний, а іноді і вторинний азот. Неспецифічне жовте або блідо–жовте забарвлення можуть давати ліпіди та інші природні компоненти з біологічних екстрактів.

7. ЗАЛІЗА (III) ХЛОРИДУ РОЗЧИН

Приготування:

8,3 г заліза (III) хлорид гексагідрату перенести в мірний стакан, розчинити в 50 мл дистильованої води та довести загальний об’єм до 100 мл. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності готового розчину три місяці. Випадіння осаду не впливає на якість реактиву.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Червоні, сині, зелені та фіолетові плями

Специфічність:

Поява забарвлення засновано на утворенні кольорових комплексів заліза (III) (саліцилати, феноли, піразолони) та забарвлених продуктів оксинення (фенотіазини). Реактив інформативний, має судово–негативне значення

відносно саліцилатів але малочутливий. Сине забарвлення дають саліцилати. Червоне, фіолетове, зелене та їх відтінки дають феноли, нафтоли, амінофеноли, піразолони, фенотіазини, алкалоїди які містять фенольні фрагменти (морфін).

8. ЙОДОПЛАТИНАТ ПІДКИСЛЕНИЙ

Приготування:

0,25 г зневодненої платини (IV) хлориду, або 0,38 г дигідроген гексахлорплатинату гексагідрату ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$), та 5 г калію йодиду розчинити в 100 мл дистильованої води. До отриманого розчину додати 5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Розчин зберігати в скляному посуді з темного скла (к.т.). Термін придатності готового розчину один рік.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Фіолетові, сині, рожеві, червоні та коричневі плями.

Специфічність:

Принцип утворення забарвлення, інформативність та значення див. реактив Драгендорфа за Мун'є. Позитивний результат дають всі основи які містять в своїй структурі четвертинний, третинний та вторинний азот. Коричневе забарвлення дають нікотин, його метаболіти. Тіорідазин коричневу із синьою каймою. Метадон дає рожеву пляму із сірою каймою, бутриптилін просто рожеву пляму.

9. ЙОДУ РОЗЧИН–ХЛОРИДНОЇ КИСЛОТИ СПИРТОВИЙ РОЗЧИН

Приготування:

а) В мірному стакані розчинити 4 г йодиду калію в 30 мл дистильованої води, в отриманому розчині 1,27 г кристалічного йоду після чого загальний об’єм довести до 100 мл. Розчин зберігати в скляному посуді з темного скла (к.т.). Термін придатності необмежений.

б) Додати до 17 мл дистильованої води 33 мл концентрованої хлоридної кислоти і після охолодження до розчину додати 50 мл етилового спирту. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.) із щільно підігнаною пробкою. Термін придатності необмежений.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати розчинами (а) та (б).

Візуальний ефект:

Плями фіолетового та коричневого кольору.

Специфічність:

Кольорове забарвлення виникає внаслідок утворення забарвлених молекулярних комплексів йоду. Використовується для виявлення кофеїну, теофіліну та теоброміну які утворюють плями фіолетового кольору. Інші похідні пурину, в тому числі і природні компоненти біологічних екстрактів, також дають аналогічне забарвлення. Реактив неінформативний та неспецифічний, багато інших сполук дають забарвлення від фіолетового до коричневого.

10. КАЛІЮ ПЕРМАНГАНАТ ПІДКИСЛЕНИЙ

Приготування:

1 г калію перманганату розчинити в 100 мл 0,25 М розчині сульфатної кислоти. Розчин зберігати в скляному посуді з темного скла (к.т.). Термін придатності три місці.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями жовтого та жовто–коричневого кольору на рожевому фоні.

Специфічність:

Забарвлення плям зумовлене відновленням перманганату, який має фіолетове забарвлення, до форм з нижчими ступенями окиснення які мають коричневе забарвлення або зовсім безбарвні. Реактив не специфічний та неінформативний, позитивний результат дають практичні всі органічні сполуки особливо ті, які мають ненасичені (кратні) хімічні зв'язки.

11. ЛІБЕРМАНА РЕАКТИВ

Приготування:

1 г натрію нітриту розчинити в 10 мл концентрованої сульфатної кислоти (Обережно виділення нітрозних газів! Працювати під тягою!). Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону крапельно обробити готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями різноманітних кольорів та відтінків.

Специфічність:

Поява кольорових плям обумовлена утворенням забарвлених продуктів окиснення досліджуваних речовин нітрзосульфатною кислотою. Реактив досить інформативний, забарвлення залежить від будови досліджуваної речовини, але неспецифічний. Багато різноманітних органічних сполук, дають позитивний результат.

12. МАНДЕЛІНА РЕАКТИВ

Приготування:

0,1 г амонію метаванадату (NH_4VO_3) розчинити в 0,30 мл дистильованої води та довести до 20 мл концентрованою сульфатною кислотою. Реактив зберігається в герметично закритому скляному посуді з пришліфованою пробкою не більше трьох діб (к.т.).

Послідовність застосування.

Реактив можна застосовувати двома способами:

I. хроматографічну зону крапельно обробити готовим розчином.

II. Спочатку витримати хроматографічну пластинку 15 хв в камері насиченій парами формальдегіду, а потім хроматографічну зону крапельно обробити готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями різноманітних кольорів та відтінків.

Специфічність:

Поява кольорових плям обумовлена утворенням забарвлених продуктів окиснення досліджуваних речовин ванадієвою кислотою. За інформативністю реактив аналогічний р. Лібермана. Не специфічний реактив, багато різноманітних органічних сполук, дають позитивний результат. Попереднє

витримування в парах формальдегіду дозволяє отримувати позитивний результат з речовинами які за звичайних умов не утворюють забарвлення. Наприклад: після застосування формальдегіду метадон дає синьо–фіолетове забарвлення, лідокаїн – червоне.

13. МАРКІ РЕАКТИВ

Приготування:

0,05 г параформу розчинити в 10 мл концентрованої сульфатної кислоти. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону крапельно обробити готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями різноманітних кольорів та відтінків.

Специфічність:

Поява кольорових плям обумовлена конденсацією, завдяки присутності формальдегіду, та подальшому утворенню забарвлених продуктів дегідратації досліджуваних речовин під дією сульфатної кислоти. За інформативністю реактив аналогічний р. Лібермана. Багато різноманітних органічних сполук, дають позитивний результат. Чорне забарвлення, сине або синьо–фіолетове характерне для похідних морфіну.

14. МІДІ СУЛЬФАТ – КАЛІЮ ЙОДИД

Приготування:

а) 4,8 г міді сульфата пентагідрату ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) розчинити в 50 мл дистильованої води та довести загальний об’єм до 100 мл. Розчин зберігати при в скляному посуді (к.т.). Термін придатності необмежений.

б) 5 г калію йодиду розчинити в 50 мл дистильованої води та довести загальний об’єм до 100 мл. Розчин зберігати в скляному посуді з темного скла в захищеному від світла місці (к.т.). Термін придатності три місяці.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати розчинами (а) та (б).

Візуальний ефект:

Плями коричневого кольору.

Специфічність:

Поява забарвлення обумовлена утворенням молекулярних комплексів між органічною речовиною та йодом, який вивільняється при взаємодії міді (II) сульфату із калій йодидом. Досить чутливий але не специфічний та не інформативний реактив. Багато різноманітних органічних сполук, дають позитивний результат. Зазвичай використовується для виявлення речовин які присутні в досить малих кількостях (наприклад клофеліну для якого має судово–негативне значення).

15. ТРИВКИЙ СИНІЙ Б (FAST BLUE B SALT)

Приготування:

0,01 г реактиву розчинити в 10 мл 0,01 М розчину натрію або калію гідроксиду. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

В зоні локалізації каннабіноїдів спостерігаються плями рожевого або червоно–рожевого кольору.

Специфічність:

Забарвлення обумовлене утворенням азобарвника між реактивом, який є діазосполукою, та досліджуваною речовиною. В лужному середовищі реактив є інформативним і специфічним на феноли, та має судово–негативне значення відносно каннабіноїдів. Позитивний результат, окрім каннабіноїдів дають всі речовини які за хімічною природою є фенолами або мають рухливий атом гідрогену.

16. ТРИВКИЙ ЧОРНИЙ К (FAST BLACK K SALT)

Приготування:

а) 0,01 г реактиву розчинити в 10 мл дистильованої води. Використовується свіжовиготовлений розчин.

б) 2 г натрія или калія гідроксиду розчинити в 50 мл дистильованої води. Зберігати розчин в пластиковому посуді з поліетилену. Термін придатності шість місяців. Утворення карбонатів впродовж зберігання не впливає на властивості розчину.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону спочатку обприскати розчином а) потім розчином (б). Після підсушування хроматографічної пластинки в тоці повітря кімнатної температури повторно обприскати розчином (а).

Для отримання адекватного візуального ефекту важливо перед застосування реактиву видалити всі залишки амоніаку з шару сорбенту!

Візуальний ефект:

Після обприскування тільки розчином а) проявляються переважно вторинні алкіламіни (метамфетамін та його похідні). Після обприскування розчином (б) проявляються переважно первинні алкіламіни (амфетамін та його похідні). Повторне обприскування реактивом (а) сприяє посиленню забарвлення плям. Колір плям первинних алкіламінів переважно фіолетовий, вторинних – переважно оранжевий. Реактив необхідно застосовувати лише після встановлення групи досліджуваної речовини для з'ясування деталей структури (первинний чи вторинний алкіламін)

Специфічність:

Забарвлення обумовлене утворенням азобарвника між реактивом, який є діазосполукою, та досліджуваною речовиною. Реактив використовується для диференціації первинних та вторинних алкіламінів але не є специфічним для цієї групи. Позитивний результат дають всі речовини із рухливим атомом гідрогену (наприклад аміни, феноли, єноли, гетероцикли тощо).

17. НАТРІЮ ГІДРОКСИД 5% РОЗЧИН

Приготування:

5 г натрія гідроксиду розчинити в 95 мл дистильованої води. Зберігати розчин в пластиковому посуді з поліетилену. Термін придатності шість місяців.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Зразу, або після нагрівання (ФОП) пластинки при 100–120 °С впродовж 10 хв, спостерігаються плями яскраво жовтого або жовто–оранжевого кольору.

Специфічність:

Поява забарвлення обумовлена утворенням аціформ нітросполук в лужному середовищі. Забарвленні плями утворюють сполуки які містять нітрогрупу пов'язану із бензольним кільцем або системою кратних хімічних зв'язків. Інтенсивність забарвлення збільшується із збільшеннями кількості нітрогруп. Реактив специфічний та інформативний відносно нітросполук та має відносно їх судово–негативне значення.

18. НАТРІЮ МОЛІБДАТ НА ФОП (для пластинок на алюмінієвій та скляній основі)

Приготування:

а) 5 г натрія молібдату розчинити в 60 мл 2М розчину сульфатної кислоти. 0,1 г калію антимонілтартрату напівгідрату (калій сурм'яновиннокислий, $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 0{,}5H_2O$) розчинити в 20 мл 2М розчину сульфатної кислоти. З'єднати обидва розчини та додати 20 мл 2М розчину сульфатної кислоти. Зберігати готовий розчин в скляному посуді з темного скла. Розчин придатний до використання поки відсутнє блакитне забарвлення, але не більше шести місяців.

б) 0,5 г аскорбинової кислоти розчинити в 20 дистильованої води. Використовується свіжовиготовлений розчин.

в) 0,15 г кристалічного фіолетового розчинити в 50 мл 2М розчину хлоридної кислоти.

Послідовність застосування:

перед застосування реактиву, хроматографічну пластинку на скляній основі витримати 1,5 год при 300 °С (муфельна піч), пластинку на алюмінієвій основі витримати 4 год при 200 °С.

Хроматографічну зону обприскати послідовно розчинами (а) та (б). Після появи плям хроматографічну зону обприскати розчином (в).

Візуальний ефект:

Після обприскування розчинами (а) та (б) поступово, впродовж 30 хв, з'являються сині плями на білому або блакитному фоні. Після обприскування розчином (в) фон стає жовтим а сині плями більш контрастні.

Специфічність:

Реактив виявляє зони локалізації фосфат іонів переважно неорганічної природи. Використовується для виявлення ФОП після переведення їх в неорганічний фосфат (спалювання). Реактив специфічний та інформативний відносно ФОП та має судово–негативне значення.

19. НІНГІДРИНУ РОЗЧИН.

Приготування:

0,1 г нінгідрину розчинити в 10 мл ацетону. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та витримати 5–10 хв при 100–120 °С.

Увага! В процесі прогрівання хроматографічної пластинки потрібен постійний візуальний контроль для запобігання надмірного потемніння фону.

Візуальний ефект:

в процесі прогрівання з'являються плями рожевого або фіолетового кольору.

Для отримання адекватного візуального ефекту важливо перед застосування реактиву видалити всі залишки амоніаку з шару сорбенту!

Специфічність:

Забарвлення обумовлене утворення забарвлених продуктів конденсації нінгідрину та аміну по аміногрупі. Використовується для виявлення речовин які містять аліфатичну аміногруп (переважно амінокислоти та амфетаміни).

Увага! реактив неінформативний та неспецифічний, багато органічних речовин дають позитивний результат, але має судово–негативне значення відносно алкіламінів.

20. НІНГІДРИН В КОНЦЕНТРОВАНІЙ СУЛЬФАТНІЙ КИСЛОТІ

0,1 г нінгідрину розчинити в 10 мл концентрованої сульфатної кислоти. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону крапельно обробити готовим розчином.

Візуальний ефект:

плями вишневого кольору.

Специфічність:

Хімізм реакціїї невідомий. Використовується для підтвердження виявлення трамадолу та його метаболітів.

Увага! реактив неінформативний та неспецифічний, багато інших речовин дають позитивний результат.

21. п–НІТРОАНІЛІНУ ДІАЗАТОВАНИЙ РОЗЧИН

Приготування:

а) 0,1 г п–нітроаніліну розчинити в 50 мл 2М розчину хлоридної килоти. Зберігати розчин в скляному посуді з темного скла. Термін придатності готового розчину три роки.

б) 2,5 г натрію нітриту розчинити в 50 мл дистильованої води. Зберігати розчин в скляному посуді з темного скла. Термін придатності готового розчину один рік.

в) 17 г натрія ацетату тригідрат розчинити в 50 мл дистильованої води. Зберігати розчин в скляному посуді з темного скла. Термін придатності готового розчину шість місяців.

г) 10 г зневодненого калію карбонату розчинити в 40 мл дистильованої води. Зберігати розчин в пластиковому посуді з поліетилену. Термін придатності три місяці.

д) до 5 мл розчину (а) додати 0,2–0,5 мл розчину (б), до зникнення жовтого забарвлення, та 3 мл розчину (в). Розчин готується безпосередньо перед використанням.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати розчином (д) та (г).

Візуальний ефект:

Плями від оранжевого до темно–червоного кольору.

Специфічність:

Забарвлення обумовлене утворенням азобарвника між реактивом, який є діазосполукою, та досліджуваною речовиною. Використовується для виявлення пестицидів з групи карбаматів (після гідролізу до відповідних фенолів та

нафтолів). Позитивний результат дають багато інших речовин які здатні вступати в реакцію азосполучення (феноли, нафтоли, ароматичні аміни та ін.). В лужному середовищі реактив є інформативним і специфічним на феноли, та має судово–негативне значення відносно пестицидів з групи карбаматів (після їх термічного розкладання до відповідних фенолів).

22. ПАЛАДІЮ (II) ХЛОРИД

Приготування:

0,25 г паладію (II) хлориду розчинити в 50 мл розчину хлоридної кислоти із масовою часткою кислоти 10 %. Зберігати розчин в скляному посуді з темного скла. Термін придатності необмежений.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та витримати при 100–120 °С продовж 5–10 хв.

Візуальний ефект:

Плями жовтого, темно–оранжевого та коричневого кольору.

Специфічність:

Поява забарвлення обумовлена утворенням комплексної сполуки паладію та досліджуваної речовини. Використовується для виявлення пестицидів з групи тіо– та дитіофосфатів. Позитивний результат дають речовини які містять атом сульфуру (тіобарбітурати, фенотіазини, антибіотики з групи пеніцилінів, анальгін, каптоприл тощо) а також речовини у яких в бензольному ядрі поруч дві гідроксогрупи (адреналін, карбідопа, добутамін та ін). Реактив інформативний відносно тіосполук.

23. РЕАКТИВ FPN (Ferric(III)chloride–Perchloric acid–Nitric acid)

Приготування:

Змішати разом 5 мл розчину заліза(III)хлориду із масовою часткою солі 5 %, 45 мл розчину хлорної кислоти із масовою часткою кислоти 20 %, і 50 мл нітраної кислоти із об'ємною часткою кислоти 50 %. Термін придатності готового розчину необмежений.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями оранжевого, рожевого, червоного, зеленого, синього кольору та їх відтінки.

Специфічність:

Поява кольорових плям обумовлена утворенням забарвлених продуктів окиснення досліджуваних речовин. Використовується для виявлення фенотіазинів та дибензазепінів. Позитивний результат можуть давати заміщені в бензольному ядрі амфетаміни, феноли, ароматичні аміни, хлорфенірамін (сине), димедрол та дифенілпіралін (рожеве) а також продукти гниття білків та амінокислот. Реактив інформативний та має судово–негативне значення відносно фенотіазинів.

24. РЕАКТИВ СИМОНА

Приготування:

а) 0,1 г натрію нітропрусиду розчинити в 10 мл розчину натрію карбонату із масовою часткою солі 10 %. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та помістити в камеру насичену парами ацетальдегіду.

Візуальний ефект:

Плями синього, рожевого та вишнево–червоного та фіолетового кольору.

Для отримання адекватного візуального ефекту важливо перед застосування реактиву видалити всі залишки амоніаку з шару сорбенту!

Специфічність:

Забарвлення обумовлене утворенням кольорових комплексів досліджуваних речовин із залізом (II) в присутності ацетальдегіду. Використовується для диференціації первинних алкіламінів від вторинних. Вторинні алкіламіни та незаміщені гетероциклічні аміни дають сине забарвлення, первинні – від рожевого до вишнево–червоного. Реактив вкрай не специфічний, велика кількість речовин (α,β–ненасичені лактони, тіоли, гетероциклічні сполуки, продукти метаболізму та розкладу амінокислот, біогенні аміни тощо) дають схоже забарвлення. Реактив необхідно застосовувати лише після встановлення групи досліджуваної речовини для з'ясування деталей структури (первинний чи вторинний алкіламін).

25. РЕЗОРЦИНУ ЛУЖНИЙ РОЗЧИН

Приготування:

0,1 г резорцину розчинити в 10 мл розчину натрію гідроксиду із масовою часткою лугу 5 %. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та через 2–5 хв витримати при 80–100°С продовж 5 хв.

Візуальний ефект:

Плями рожевого кольору.

Специфічність:

Забарвлення виникає завдяки конденсації та подальшій дегідратації в лужному середовищі продукту конденсації резорцину із досліджуваними речовинами. Використовується для виявлення та підтвердження речовин які мають галогенметильну групу (хлорофос, ДДВФ). ДДВФ дає позитивний результат при кімнатній температурі, хлорофос після нагрівання. Реактив неінформативний та неспецифічний.

26. СРІБЛА НІТРАТ АМІАЧНИЙ РОЗЧИН

І. Для виявлення галогенвмісних сполук

Приготування:

0,1 г срібла нітрату розчинити в мінімальній (1–1,5 мл) кількості дистильованої води, додати концентрований розчин амоніаку до розчинення спочатку утвореного осаду, та довести загальний об'єм до 10 мл ацетоном. У випадку помутніння розчину після додавання ацетону додати 0,1–0,5 мл дистильованої води до зникнення помутніння. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та витримати в промінях кварцевого опромінювача 10–15 хв.

Візуальний ефект:

Плями від світло–коричневого та сірого кольору до чорного.

Специфічність:

Поява плям обумовлена утворенням металічного срібла внаслідок фотолітичним розкладу срібла галогеніду, який в свою чергу утворюється з галогену відірваного від органічної речовини під дією УФ–опромінення. Використовується для виявлення речовин які мають галоген. Позитивний результат дають також органічні відновники (амінофеноли, поліфеноли, гідрохінони, єноли та аналогічні сполуки). Реактив не специфічний але інформативний відносно присутності ковалентно–з'язанного галогену та має судово–негативне значення.

II. Для виявлення багатоатомних спиртів

Приготування:

0,45 г срібла нітрату розчинити в 9 мл дистильованої води та додати 1 мл концентрованого розчину амоніаку. У випадку недостатнього розчинення осаду по краплях додати ще концентрованого розчину амоніаку до повного розчинення. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та витримати при 100 – 120 °С 15–20 хв.

Візуальний ефект:

Плями від темно–коричневого до чорного кольору на жовто–коричневому фоні.

Специфічність:

Поява плям пов'язана з утворенням металічного срібла внаслідок відновлення срібла аміакату досліджуваними сполуками. Використовується для виявлення багатоатомних спиртів які мають не менше двох вільних гідроксигруп. Позитивний результат дають органічні відновники (амінофеноли, поліфеноли, гідрохінони, єноли та аналогічні сполуки) та багато інших природних речовин. Реактив не специфічний та неінформативний.

27. СУЛЬФАТ РТУТІ–ДИФЕНІЛКАРБАЗОН

Приготування:

а) 5 г ртуті (II) оксиду (червоного або жовтого) перенести в конічну колу на 250 мл, додати 100 мл дистильованої води і при постійному помішуванні обережно 10 мл концентрованої сульфатної кислоти. Після розчинення та охолодження загальний об'єм довести до 250 мл. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.). Термін придатності необмежений.

б) Розчинити 0,1 г дифенілкарбазону в 100 мл хлороформу. Розчин зберігати в скляному посуді (к.т.), із щільно підігнаною пробкою для запобігання випаровування хлороформу. Термін придатності необмежений.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати спочатку розчином (а), потім розчином (б).

Візуальний ефект:

Після нанесення розчину (а) зони локалізації похідних барбітурової кислоти спостерігаються як матово–білі плями які після нанесення розчину (б) набувають синьо– або червоно–фіолетового кольору і залишаються після поступового знебарвлення фону.

Специфічність:

Забарвлення плям обумовлене утворенням потрійних комплексів досліджуваних речовин із ртуттю та дифенілкарбазоном. Разом із похідними барбітурової кислоти позитивний результат можуть давати сульфаніламіди, пурини, мепробамат, та інші аналогічні за хімічною будовою сполуки. Реактив неінформативний але має судово–негативне значення відносно похідних барбітурової кислоти.

28. СУЛЬФАТНОЇ КИСЛОТИ 50 % РОЗЧИН В ЕТАНОЛІ

Приготування:

а) 5 мл охолодженої сульфатної кислоти обережно додати до 5 мл охолодженого до температури –10 °С та нижче етилового спирту та дуже обережно перемішати охолоджуючи під струменям холодної води.

Увага! При змішуванні речовин суміш дуже нагрівається, що може викликати закипання спирту та розбрискування кислотно–спиртової суміші. Розчин зберігати в скляному посуді із скляною пробкою (к.т.). Термін придатності п’ять днів.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином.

Візуальний ефект:

Плями червоного, зеленого, синього кольорів та їх відтінків.

Специфічність:

Виникнення забарвленя обумовленене утворенням карбкатіонів із системою хромофорів та продуктів окиснення досліджуваних речовин. Використовується для виявлення похідних фенотіазину. Позитивний результат в залежності від кількості можуть давати метаболіти анальгіну, амінофеноли, антибіотики групи тетрацикліну, доксициклін, доксиламін, димедрол, амітриптилін та багато інших речовин. Реактив неспецифічний але має судово–негативне значення відносно похідних фенотіазину.

29. о–ТОЛІДИН

Приготування:

а) 0,05 г о–толідину розчинити в 10 мл ацетону. Використовується свіжовиготовлений розчин.

Застосування:

хроматографічну зону обприскати готовим розчином та витримати в промінях кварцевого опромінювача 5–10 хв.

Візуальний ефект:

Плями від жовто–зеленого до синього кольору.

Увага! Адекватний візуальний результат можливий лише після використання нейтральних хроматографічних сумішей розчинників які не містять амоніаку та кислот. В іншому випадку, з аналогічною метою необхідно використовувати срібла нітрат аміачний розчин.

Специфічність:

Утворення забарвлених плям обумовлене утворенням забарвлених продуктів окиснення о–толідину галогеном та/або оксигеном, які утворюються та вивільняються внаслідок опромінення досліджуваних речовин. Позитивний результат дають галогенвмісні сполуки та речовини які в процесі опромінення утворюють органічні перекиси та озоніди (ліпіди, сполуки із кратними зв'язками тощо). Реактив неспецифічний але має судово–негативне значення відносно галогенвмісних пестицидів.

30. ФУРФУРОЛ

Приготування:

а) 0,2 мл фурфуральдегіду розчинити в 10 мл ацетону. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

б) 0,4 мл концентрованої сульфатної кислоти розчинити в 10 мл ацетону. Використовувати свіжовиготовлений розчин.

Послідовність застосування:

хроматографічну зону послідовно обприскати спочатку розчином (а), потім розчином (б).

Візуальний ефект:

Плями від фіолетового до темно–синього кольору.

Специфічність:

Поява кольорових плями обумовлена утворенням забарвлених продуктів конденсації та дегідратації фурфуролу з досліджуваними речовинами. Використовується для виявлення неароматичних похідних карбамінової кислоти (карбаматів). N–заміщені карбамати не реагують Мепробамат дає фіолетове забарвлення. Позитивний результат дає кетазолам, мефеназим, метилпентинол. Реактив неінформативний та неспецифічний.

Додаток 3

Умови проведення досліджень

Наведені дослідження проводились на пластинках для нормально–фазної хроматографії: тип силікагель СТХ – 1А, зерняння 5-17 мкм, товщина шару 90-120 мкм, люмінофор 254 нм; для обернено-фазної хроматографії: тип силікагель з прищепленою фазою С3, зерняння 5-17 мкм, товщина шару 90-120 мкм, люмінофор 254 нм. Рухомі фази складались з розчинників класу «для хроматографіі» та «ОСЧ»), речовини які досліджувались готувались у вигляді основ, які були отримані з лікарських препаратів, або речових доказів в концентрації 0,1%. Для перевірки працездатності отриманих результатів аналізували біологічний матеріал (сечу), яку отримували від живих пацієнтів.

Зразки порівняння отримувались із лікарських засобів рідинно-рідинною екстракцією. Із отриманих екстрактів готували 0,1% розчини шляхом їх розчинення в підходящіх розчинниках.

У якості об'єктів дослідження були використані екстракти, отримані з біологічного матеріалу пацієнтів спеціалізованої медичної установи. Присутність в екстрактах відповідних речовин доводили методом ІФА та наступними методами:

Метод А. Хроматомасспектрометрії на Agilent 6890N/5973N/FID виробництва Agilent Technologies з пневматичним мікропотоковим перемикачем Діна та додатковим детектором іонізації в полум'ї. Колонка №1 – кварцова капілярна HP-5 MS 0,25 мм х 30 м, вихід колонки приєднаний до детектора іонізації в полум'ї. Колонка №2 – кварцова капілярна DB-17 MS 0,25 мм х 30 м, кінець колонки безпосередньо входить у масспектрометр. Температура інжектора – 250 ^{0}С, інтерфейсу масспектрометра (Transfer line) – 280 ^{0}С, джерела іонів – 230 ^{0}С, квадруполя – 150 ^{0}С, детектора іонізації у полум'ї – 250 ^{0}С. Режим іонізації масспектрометра – електронний удар, енергія електронів – 70 еВ. Діапазон сканування 40 – 700 а.о.м., поріг – 100, швидкість сканування – 4.29 скан/сек. Режим програмування температури термостата:

70 ^{0}C – 2 хв., потім підвищення до 210 ^{0}C зі швидкістю – 45 ^{0}C/хв., потім підвищення до 320 ^{0}C зі швидкістю – 15 ^{0}C/хв., та витримка за цієї температури 17,56 хв. Тиск газу – носія (гелію) на вході в першу колонку – 26,06 psi, другу – 19,30 psi. Режим введення проби: 1мкл без дільника потоку.

Метод В. Високоефективної рідинної хроматографії за домомогою рідинного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автосамплером, дегазатором і чотирьох канальним насосом. Програмне забезпечення LC Solution було використано для збору даних.

Хроматографування проводили за наступних умов:

- колонка GraceAlltima C18 розміром 250мм*4,6мм, з разміром частинок 5 мкм;
- рухома фаза: 3,0 г натрію перхлорату Р розчиняли в 500 мл води Р, додавали 1,0 мл триетиламіну Р, доводили pH кислотою хлорною Р до 3,0, додавали 500 мл ацетонітрилу Р;
- швидкість потоку – 1 мл/хв;
- детектування при довжині хвилі 320 нм;
- температура термостату колонки 25 ºС;
- в якості розчинника використовували суміш вода Р : ацетонітрил Р в співвідношенні 1:1.

ЛІТЕРАТУРА

1. Current NPS Threats. (2021). UNODC : Early Warning Advisory Toxicology Highlights. Vol. IV. Vienna. 6 p.

2. О.В. Чубенко, Л.М. Грень, О.В. Чорна. Нові психоактивні речовини – соціальні та медичні загрози для держави, пов'язані з ними. / Вісник Національного технічного університету «ХПІ». Серія: Актуальні проблеми розвитку українського суспільства, № 1, 2024. – с. 72-77.

3.Чорна О.В., Чубенко О.В., Качалова Т.Є. Деякі аспекти немедичного використання ліків в Україні: соціальний аспект. Вісник Національного технічного університету «ХПІ». Серія: 64 Актуальні проблеми розвитку українського суспільства, 2022. № 1:64-71. ISSN 2227-6890. doi: 10.20998/2227-6890.2022.1.11.

4. Stimpft T. Screening in postmortem toxicology / Stimpft T., Vycudilik W. // Journal Forensic Sci. − 2004. − Vol. 142, Issues 2-3. − P. 115-225.

5.Петюнин Г.П. Скрининг токсических веществ органической природы в биологических жидкостях / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Ж.В.Дмитриевская // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції «Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій», 16-18.10.2004 р. – Чернівці: Медик. – С.64 – 65.

6. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / Fourth Editions. Consulting Editions Anthony C. Moffat, M. David Osselton, Brian Widdop / © Pharmaceutical Press. – 2011.

7. Розробка методів аналітичної діагностики отруєнь декстропропоксифеном : дис. ... канд. фарм. наук : 15.00.02. Харків, 2013. 132 с.

8. Методичні рекомендації. Приготування та застосування хромогенних реактивів у судово- токсикологічному дослідженні методом тонкошарової хроматографії. Київ, 2019. Журавель І.О., Кахановський Ф.М., Чубенко О.В., Савченко М.А. – 35с.

9. Карташов В.А. Вариант ТСХ–скрининга ядовитых и сильнодействующих азотсодержащих оснований / Карташов В.А., Овсяников В.М., Куприкова Д.Е. // Суд.–мед. экспертиза. – 1982. – №3. – С. 39–41.

10. Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems. Second, Revised and Enlarged Edition/ Deutshe Forschungsgemeinschaft, The International Association of Forensic Toxicologists. Report XVII of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis Special Issue of the TIAFT Bulletin. – VCH. – 311 P.

11. Методичні рекомендації. Виявлення лікарських, наркотичних речовин та психотропних препаратів методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту після гідролізу біологічного матеріалу. Київ – 2019. Журавель І.О., Кахановський Ф.М.,Чубенко О.В., Савченко М.А. – 35с.

12. Пат. України на корисну модель № 25975, МПК G01N 33/493. Спосіб визначення заборонених наркотиків в суміші з лікарськими засобами в сечі людини / Г.П. Петюнін, О.В.Чубенко, Н.В. Гузенко; заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2007 705116; заявл. 10.05.2007 р.; опубл. 27.08.2007 р., Бюл. № 1312.

13. Г.П. Петюнин. Идентификация производных фенилалкиламинов и некоторых лекарственных препаратов при их совместном присутствии / Г.П. Петюнин, О.О. Чубенко. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб. наук. праць. – 2004. – Вип. 4. – С.291 – 294.

14. Г.П. Петюнин. Методика идентификации амфетамина, его синтетических производных и кустарно изготовляемых аналогов. / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Ж.В. Дмітрієвська. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2002. – Вип. 2. – С.335 – 337.

15. Петюнин Г.П. Использование новых реактивов – проявителей при исследовании некоторых психотропних препаратов методом хроматографии в тонких слоях сорбента / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2013. – Вип. 13. – С.300 – 305.

16. Петюнин Г.П. Модификация метода «ТСХ-скрининга» для некоторых контролируемых соединений / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2014. – Вип. 14. – С.258 – 264.

17. Петюнин Г.П. Исследование некоторых лекарственных и наркотических препаратов – аналогов по структуре и действию методом хроматографии в тонких слоях сорбента / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб. Наук. Праць. – 2011. Вип. 11. – С.378 – 384.

18. Пат. України на корисну модель № 107780, МПК G01N 33/493. Спосіб виявлення деяких похідних тетрациклічних антидепресантів у біологічному матеріалі / Петюнін Г.П., Баюрка С.В., Карпушина С.А., Чубенко О.В.; заявник і патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2015 11789; заявл. 30.11.2015 р.; опубл. 24.06.2016 р., Бюл. № 12.

19. Петюнин Г.П. Химико-токсикологическое исследование кустарно изготовленных фенилалкиламинов / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Ж.В. Дмітрієвська, Л.О. Буткова // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2006. – Вип. 6. – С.277 – 282.

20. Пат. України на корисну модель № 62664, МПК G01N 33/493. Спосіб визначення кустарно виготовлених заборонених похідних ефедрину у сечі людини. / Г.П.Петюнін, О.В.Чубенко, Ж.В. Дмітрієвська; заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2007 705116; заяв. 24.04.2003 р.; опубл. 15.12.2003 р., Бюл. № 12.

21. Пат. України на корисну модель № 5670, МПК G01N 33/493. Спосіб визначення заборонених похідних фенілалкіламіну в сечі людини / Г.П.Петюнін, О.В.Чубенко, Ж.В. Дмітрієвська; заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2007 705116; заявл. 30.07.2004 р.; опубл. 15.03.2005 р., Бюл. № 3.

22. Г.П. Петюнин. Идентификация производных фенилалкиламинов и некоторых лекарственных препаратов при их совместном присутствии / Г.П.

Петюнин, О.О. Чубенко. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб. наук. праць. – 2004. – Вип. 4. – С.291 – 294.
23. Г.П. Петюнин. Методика идентификации амфетамина, его синтетических производных и кустарно изготовляемых аналогов. / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Ж.В. Дмітрієвська. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2002. – Вип. 2. – С.335 – 337.
24. Пат. України на корисну модель № 56025, МПК G01N 33/493. Спосіб визначення заборонених наркотиків та сильнодіючих лікарських засобів у біологічному матеріалі людини / Г.П.Петюнін, О.В.Чубенко, Н.В.Гузенко; заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2012 05636; заявл. 11.05.2010 р.; опубл. 27.12.2012 р., Бюл. № 24.
25. Гузенко Н.В. Химико-токсикологическое исследование нових препаратов – потенциальніх обьектов немедицинского использования методом хроматографи в тонких слоях сорбента / Гузенко Н.В., Хижниченко О.В., Соломаха О.А. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2007. – Вип. 7. – С.277 – 281.
26. О.О. Соломаха. Исследование декстрометорфана методом хроматографии в тонких слоях сорбента / О.О. Соломаха // Теорія та практика судової і криміналістики: зб.наук.праць. – 2006. – Вип. 6. – С. 283 – 289.
27. Хіжніченко О. В., Гузенко Н. В., Чубенко О. В. Хіміко-токсикологічне дослідження нових лікарських засобів – потенційних об’єктів немедичного використання методом хроматографії у тонких шарах сорбенту. Фармацевтичний журнал, №6. – 2012. – с.74.
28. Гузенко Н.В. Определение кетамина при проведении судебно-токсикологического анализа / Гузенко Н.В. // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: Збірник науково-практ. матеріалів Харківського НДІ судових експертиз ім.Засл.проф. М.С.Бокаріуса. – Випуск 6, 2006. − С. 298-302.
29. Гузенко Н.В. Оптимізація рухомої фази при визначенні кетаміну, фенциклідину та трамадолу методом тонкошарової хроматографії / Гузенко

Н.В. // В Матеріалах XIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених. – Тернопіль, 2010. – С. 225.

30. Гейсс Фридрих. Основы тонкослойной хроматографии / Гейсс Фридрих. – М, 1999. – Т. 1.– 404 с.

31. Петюнин Г.П. Визначення кетаміну методом хроматографії в тонких шарах сорбенту / Петюнин Г.П., Гузенко Н.В. // Журнал Вісник фармації. – Харків, 2007. − С. 21-23.

32. Rees D.K. The identification and quantitation of ketamine hydrochloride / Rees D.K., Wasem S.E. // Journal Microgram. − 2000. − Vol. 33, № 7. − P. 163.

33. Гузенко Н.В. Химико-токсикологическое определение кетамина / Гузенко Н.В., Петюнин Г.П. // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Збірник наукових статей ЗДМУ. – Випуск XX. – Запоріжжя, 2007. – С.279-280.

34. Systematic Toxicological Analysis: Recommendations on Sample Collection / Bulletin TIAFT. – 2009. – V. 39, № 1. – P. 11-14.

35. Петюнин Г.П. Исследование некоторых лекарственных и наркотических препаратов – аналогов по структуре и действию методом хроматографии в тонких слоях сорбента / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб. Наук. Праць. – 2011. Вип. 11. – С.378 – 384.

36. Новые направления развития тонкослойной хроматографии на кафедре химической метрологии. Логинова Л.П, Бойченко А.П., Фролова А. М. И др. // В зб. Річна сесія наукової ради з проблеми “Аналітична хімія” Національної академії наук України”, АР Крим. – 2009. – С. 32.

37. Контроль содержания п-гидроксибензойной кислоты и парабенов в косметических средствах методом мицелярной тонкослойной хроматографии. Л.П. Логинова, Д.В. Едаменко, А.Ю. Куликов. Вісник Харківського національного університету. – 2006. – №731. – Хімія. Вип.14 (37). – С.127-134.

38. Аделшвили-Андгуладзе Л.В. Разработка методов химико-токсикологического анализа клофелина / Аделшвили-Андгуладзе Л.В.,

Махарадзе Р.В., Курцикидзе М.Ш. и др. // Georgian Medical News. – 2007. – №9 (150). – С.46 – 49.

39. Пат. України на корисну модель № 64698, МПК G01N 33/493. Спосіб виявлення кетаміну та сильнодіючих лікарських засобів в біологічному матеріалі / Гузенко Н.В., Петюнін Г.П., Чубенко О.В.; заявник і патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2011 06325; заявл. 20.05.2011 р.; опубл. 10.11.2011 р., Бюл. № 21.

40. Петюнин Г.П. Использование метода мицеллярной тонкослойной хроматографии для анализа наркотических и психотропных веществ / Г.П.Петюнин, А.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб.наук.праць. – 2012. – Вип. 12. – С.262 – 266.

41. Петюнин Г.П. Використання методу міцелярної хроматографії у судово-токсикологічних дослідженнях / Г.П.Петюнин, О.В.Чубенко, Н.В.Гузенко // В Матеріалах Всеукраїнської конференції «Актуальні питання судово-медичної науки, освіти і практики», 18-19 жовтня 2012 р., Алушта. – С. 94.

42. Пат. України на корисну модель № 103040, МПК G01N 33/493. Спосіб виявлення деяких лікарських засобів, які містять в своїй структурі третинну аміногрупу / Г.П.Петюнін, О.В.Чубенко, Н.В. Гузенко; заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти – № u 2015 103040; заявл. 30.06.2015 р.; опубл. 25.11.2015 р., Бюл. № 22.

43. О.В. Хижниченко. Обнаружение декстропропоксифена, трамадола их метаболитов в биологическом материале методом хроматографии в тонких слоях сорбента / О.В. Хижниченко // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: зб. наук. праць. – 2006. – Вип. 6. – С. 287 – 291.

44. Г.П. Петюнін, О.В. Хіжніченко. Виявлення декстропропоксіфену та його метаболітів методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. // Вісник фармації № 4(56). – 2008. – С. 9 – 12.

45. О.В. Хіжніченко, Г.П. Петюнін, Розробка алгоритму аналітичної діагностики факту вживанняя. Або отруєння декстропропосіфеном. Український медичний альманах, т.16, №1. – 2013. – с.103-104.

46. О.В. Хіжніченко Идентификация декстропропоксифена и некоторых запрещенных веществ. / О.В. Хижниченко // Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень. – Х., 2005. − С. 55, 56.

47. Хіміко-токсикологічне дослідження методом хроматографії в тонких шарах сорбенту бензидаміну – потенційного об'єкту немедичного застосування / Чорна О.В., Чорний В.А., Журавель І.О., Чубенко О.В. //Тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (12-13 квітня 2018 р.). – Х. : НФаУ, 2018.– с. 372.

48. Исам Насер. Изучение хроматографического поведения вальпроевой кислоты в смеси с другими веществами кислого характера // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: Збірник науково-практичних матеріалів. – Харківській НДІ судових експертиз, «Право» 2006. – Вип. 6. – С.302-305.

49. Патент №142803 МПК 601NN3/49 2020 р. Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів. Чорний В., Чорна О., Чубенко О.,Георгіянц В.

50. Chorna, O., Chornyi V., Chubenko, A., Hrubnyk, I., Mishchenko, V. (2021). Identification of benzydamine and its metabolit in the presence of certainanti-inflammatory non-steroidal drugs. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 6 (34), 43–50. doi: http://doi.org/10.15587/2519- 4852.2021.249634

51. Vasyl A. Cherniy, Svitlana N. Gureeva, Victoriya A. Georgiyants. Development and Validation of Alternative Analytical Method for Determination of Related Substances of Benzydamine Hydrochloride in Oral Spray by HPLC. // *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry*. – Vol. 2, No. 6, 2016. – pp. 65-73. doi: 10.11648/j.jddmc.20160206.12].

52. Синтетичні актинони: структура, токсикодинаміка, токсикокінетика, токсикологічний аналіз / Чубенко О.В., Чорна О.В., Гузенко Н.В., Слюсар В.В. // Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Національний фармацевтичний університет Фармацевтичний часопис, №2 (66). – 2023. – С.71-83. ISSN 2312-0967.

53. «Краткая история новых психоактивных веществ в Украине». УПРАВЛЕНИЕ ООН ПО НАРКОТИКАМ И ПРЕСТУПНОСТИ // Вена UN, Украина. – 2020. – С.29.

Чубенко *Олександр Владкорович, кандидат фармацевтичних наук, доцент.*

Гузенко *Наталя Валеріївна, кандидат фармацевтичних наук, доцент.*

Чорна *Ольга Володимирівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент.*

Наукове видання

Чубенко Олександр Владкорович, **Гузенко** Наталя Валеріївна,
Чорна Ольга Володимирівна

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ХРОМАТОГРАФІЇ В ТОНКИХ ШАРАХ СОРБЕНТУ ДЛЯ АНАЛІЗУ НІТРОГЕНВМІСНИХ СПОЛУК

Монографія

Редактор
Комп’ютерна верстка

Підп. до друку 14.11.2024р. Формат.. Папір офсетний. Гарнітура
Обл.-вид. арк……
Наклад прим. Вид. № Зам №……
ХНМУ, 61022, м. Харків, пр. Науки, 4
www.knmu.edu.ua
Свідоцтво про реєстрацію …….