

Copyright © 2022 by Cherkas Global University



Published in the USA
European Reviews of Chemical Research
Issued since 2014.
E-ISSN: 2413-7243
2022. 9(1): 3-12

DOI: 10.13187/erchr.2022.1.3
<https://erchr.cherkasgu.press>



Chemical Research

Innovations in the Preliminary Preparation of Biological Samples in Chemical and Toxicological Researches

Viktor N. Bekhterev ^{a, *}, Svetlana N. Gavrilova ^a, Eugenia G. Neskubina ^a, Igor N. Shipanov ^a

^a Krasnodar Bureau of Forensic Medical Expertise №2, Ministry of Health of the Krasnodar Region, Sochi, Russian Federation

Abstract

The results and experience of applying the new principle of extraction of target organic substances from water-containing matrices, extractive freezing-out, at the stage of preliminary preparation of biological objects for instrumental analysis in chemical-toxicological and forensic chemical studies are demonstrated. It is shown that the proposed method is much cheaper than the traditionally used methods of liquid extraction and sorption extraction. The technology allows the use of hydrophilic, water-soluble extractants without any chemical modification of the sample. It compares favorably with liquid and solid-phase extraction in that it makes it possible to extract organic compounds from highly contaminated, dispersed systems immediately without the additional manipulations necessary in this case. The developed methods for the determination of drugs and narcotic substances in combination with various types of chromatographic identification are selective, significantly reduce the background of extractive components and take less time due to the one-stage sample preparation procedure. This is beneficial in terms of improving the quality and reliability of expert research. A minimum amount of reagents and consumables is required, which meets the requirements of green chemistry. To date, the extractive freezing-out technique under the influence of a field of centrifugal forces has already been implemented as a laboratory device – a cryoextractor EFC. The introduction of extractive freezing-out into the practice of forensic chemical laboratories does not require special professional training of personnel.

Keywords: drugs, narcotics, extractive freezing-out, analysis, chemical toxicology, chromatography.

Самый важный и самый ответственный этап при решении практических задач химической токсикологии, судебно-химических исследований связан с извлечением, концентрированием и фракционированием определяемых химических соединений из биологических жидкостей (мочи, крови, слюны и др.) или водных вытяжек (Еремин и др., 1993; Вергейчик, 2009). Несмотря на существенные достижения в данной области химии в отношении средств идентификации (Коваленко и др., 2007; Шевырин, 2015), предварительная подготовка биологических объектов к этапу физико-химического анализа, как правило, является очень затратной (реактивы, химическая посуда и прочие материалы)

* Corresponding author

E-mail addresses: vic-bekhterev@yandex.ru (V.N. Bekhterev)

и трудоемкой. При этом, наиболее актуально стоит вопрос расширения перечня методов выделения из водосодержащих сред, в первую очередь, полярных, хорошо растворимых в воде органических веществ. С учетом отмеченной тенденции роста доли медико-криминалистических экспертиз в общем числе исследований при насильственной смерти, изучаемых в системе Бюро СМЭ России за последнее время (Золотенкова и др., 2022), крайне важно и сокращение временных затрат. Главными критериями должны быть рост эффективности извлечения целевого компонента, снижение химического и термического воздействия на анализируемый образец, удовлетворительные экономические показатели, сокращение стадий.

Обычно применяемыми способами выделения органических соединений из водных сред, до сих пор, остаются сорбция (динамический вариант – твердофазная экстракция), жидкостная и газовая экстракция. Они основаны на извлечении конкретного вещества или нескольких компонентов из одной среды в другую, имеющую с ней границу раздела. Их объединяет то, что необходимо привести в контакт заранее приготовленные несмешивающиеся фазы: водный раствор (водосодержащая жидкость) и экстрагент (сорбент, нерастворимая в воде органическая жидкость, газ).

Предложенный метод экстракционного вымораживания (ЭВ, EF) (Бехтерев, 2007) использует новый другой подход. Он сочетает вымораживание с экстракцией и базируется на низкотемпературном выделении аналитов (определяемых компонентов) с помощью перераспределения органических соединений между жидкой фракцией предварительно добавленного незамерзающего гидрофильного растворителя и образующейся твердой фазой льда во время замораживания. В этом случае, граница раздела фаз в исходно гомогенной смеси экстрагента с водным раствором появляется при охлаждении, когда образуется лед. Дальнейшим развитием данного подхода является осуществление экстракционного вымораживания в условиях воздействия поля центробежных сил (ЭВЦ, EFC) (Бехтерев, 2015). Это позволило значительно увеличить степень концентрирования целевых компонентов в получаемом экстракте благодаря сокращению доли растворителя в экстракционной системе. Об ее уникальности в международном масштабе свидетельствуют успешное прохождение рассмотрения Заявки на изобретение в системе РСТ (Bekhterev, 2015) и полученные в последствии патенты на изобретение в Европе (Bekhterev, 2019), Индии (Bekhterev, 2021) и Кыргызской Республике (Бехтерев, 2020).

Способ ЭВЦ существенно расширяет возможности химического анализа, в частности, химической токсикологии, так как можно использовать гидрофильные и растворимые в воде экстрагенты без какой-либо химической модификации пробы (высаливание, дериватизация и т.п.). Это очень важно, поскольку такого рода манипуляции с исследуемыми пробами могут сопровождаться изменением молекулярной структуры определяемых веществ и даже их деструкцией.

К настоящему времени на базе полученных экспериментальных результатов и выявленных закономерностей при изучении органических кислот и фенолов, ряда других веществ создана теоретическая модель ЭВ (Bekhterev, 2016; Bekhterev, 2007). В ее основе сорбционный механизм перераспределения растворенных органических соединений между незамерзающим, в данных условиях, предварительно добавленным растворителем (экстрагентом) и поверхностью кристаллической фазы льда, появляющейся в результате охлаждения. В итоге, получено математическое выражение, связывающее концентрацию целевого компонента в экстракте C_{org} с его исходной массой в пробе M_o и объемом экстрагента V_{extr} .

$$c_{org} = \left(\frac{K_{eq} \times \beta}{\alpha} \right) \times \left(\frac{M_o}{V_{extr}} \right) = K_{eq} \times \left(\frac{M_o}{V_{extr}} \right)$$

где K_{eq} это константа адсорбционно-десорбционного равновесия, устанавливающегося в отношении концентрации вещества в экстракте и на формирующейся поверхности льда;

α – коэффициент пропорциональности, связывающий концентрацию свободных адсорбционных центров с объемом добавленного в пробу экстрагента V_{extr} , [см⁵];

β – коэффициент пропорциональности, связывающий концентрацию занятых адсорбционных центров с исходной массой экстрагируемого вещества в анализируемой пробе M_0 , [$\text{мкг}^{-1}\text{см}^{-2}$].

Модель дает возможность количественно оценивать эффективность экстракционного вымораживания того или иного вещества из водных растворов с помощью введенного параметра $*K_{eq}$. По физическому смыслу, он является коэффициентом распределения аналита между объемом жидкого экстрагента и поверхностью льда, так как прямо пропорционален константе адсорбционно-десорбционного равновесия K_{eq} , в свою очередь, зависящей от природы извлекаемого компонента, экстрагента и условий проведения процедуры. На примере гомологической серии одноосновных карбоновых кислот $\text{C}_2 - \text{C}_8$ установлено, что рост гидрофобности с удлинением молекулы на $-\text{CH}_2$ -группу сопровождается увеличением коэффициента распределения $*K_{eq}$ (Bekhterev, 2021). С учетом этих закономерностей, а также установленной зависимости коэффициента распределения $*K_{eq}$ от pH среды (Bekhterev, 2016; Bekhterev, 2008; Bekhterev, 2020a; Bekhterev, 2021a) появилась возможность прогнозирования эффективности и повышения селективности извлечения целевых компонентов методом ЭВ, в т.ч. в режиме центрифугирования образца.

Объектами изучения в судебно-химических исследованиях, химической токсикологии, как правило, являются биологические жидкости (кровь, моча, слюна и пр.), водные вытяжки органов и биологических тканей, содержимое желудка и пр. По этой причине предварительная подготовка проб, использующая жидкостную и твердофазную экстракцию (сорбцию) обычно состоит из целого ряда последовательных операций (Еремин и др., 1993; Вергейчик, 2009; Коваленко и др., 2007, Шевырин, 2015; Швайкова, 1975). Применение метода газовой экстракции ограничено тем, что определяемые вещества должны обладать достаточной летучестью и термической устойчивостью (Виттенберг, 2003; Kolb, Ettore, 1997). Одним из важнейших достижений и преимуществ разработанной технологии ЭВЦ над указанными способами экстракции является то, что извлечение целевых веществ из очень загрязненных и дисперсных объектов выполняется в одну стадию без дополнительных, в этом случае, операций, фильтрования, перегонки и пр. (Bekhterev, 2015; Bekhterev, 2019; Bekhterev, 2021; Бехтерев, 2020; Bekhterev, 2016; Bekhterev, 2007; Bekhterev, 2008; Bekhterev, 2020a; Bekhterev, 2021a; Bekhterev, 2023; Бехтерев и др., 2010; Бехтерев и др., 2007; Бехтерев и др., 2017).

Пример приведенной на Рисунке 1 схемы анализа мочи на предмет присутствия бензодиазепинов (оксазепам, феназепам) (Бехтерев и др., 2007) или пировалерона (Бехтерев и др., 2017) является, практически, универсальной процедурой пробоподготовки, включающей добавление растворителя-экстрагента непосредственно в вialу с пробой, регулирование pH с помощью кислоты или щелочи и последующее экстракционное вымораживание в условиях центрифугирования образца.

схема анализа

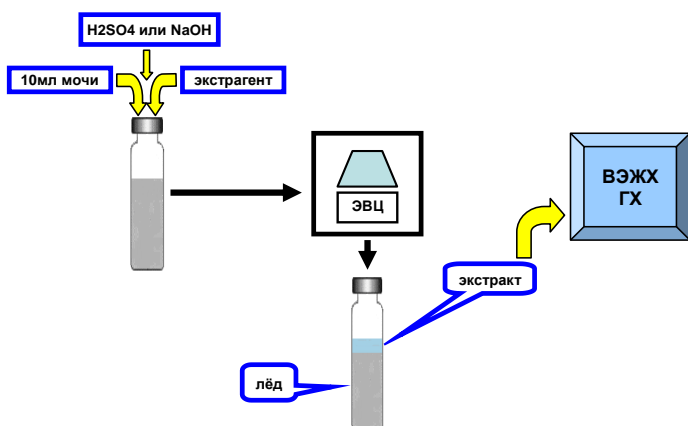


Рис. 1. Схема определения бензодиазепинов (оксазепам и феназепам) в моче методом ЭВЦ в комбинации с ВЭЖХ (Бехтерев и др., 2007) или пировалерона (Бехтерев и др., 2017)

После чего, без фильтрования, обезвоживания и прочего, экстракт сливают с замерзшей части пробы и напрямую подвергают физико-химическому исследованию. При определении бензодиазепинов, например, применен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детекцией (ВЭЖХ-УФ). Получаемые ацетонитрильные экстракты совместимы с обращенно-фазным режимом ВЭЖХ. Как видно из [Рисунка 2](#), предложенная методика обеспечивает хорошую селективность определения указанных ксенобиотиков, применяемых в медицине в качестве седативных средств.

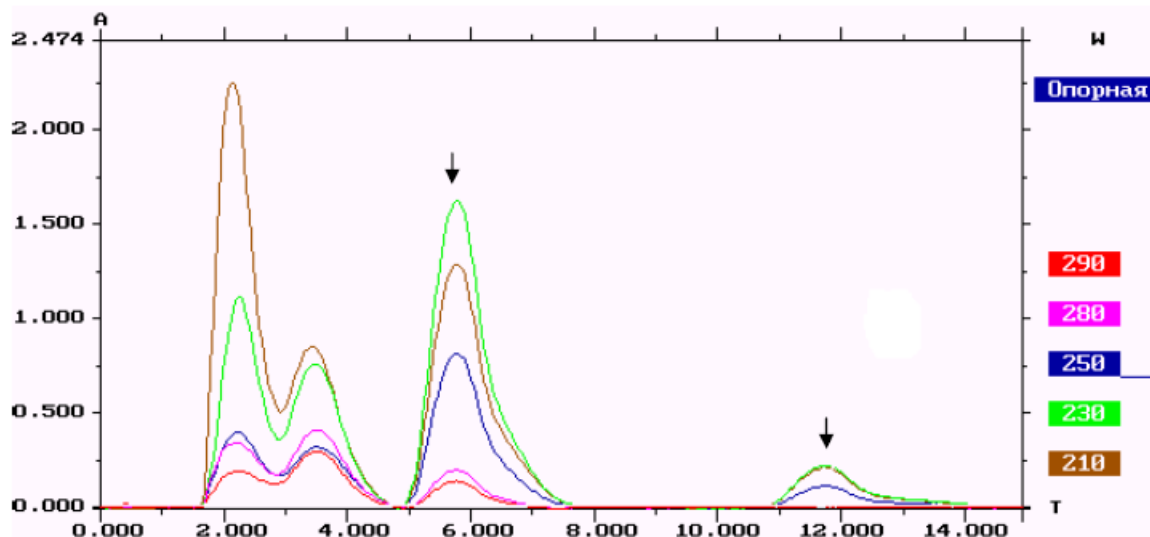


Рис. 2. ВЭЖХ-УФ-хроматограмма эфирного экстракта мочи пациента Б., полученного в результате экстракционного вымораживания, в которой обнаружены оксазепам (6,5 мкг/мл), время удерживания 5,6 мин, и феназепам (0,8 мкг/мл), время удерживания 11,7 мин ([Бехтерев и др., 2007](#))

Используемые экстрагенты (ацетонитрил, этилацетат, этоксиэтан и др.) после этапа ЭВЦ при температурах порядка $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ практически не содержат воду и каких-либо дисперсий, поэтому полученные экстракты сразу направляют на физико-химическое исследование, например, с помощью газовой или жидкостной хроматографии с различными видами детектирования ([Виттенберг, 2003](#); [Kolb, Ettre, 1997](#); [Bekhterev, 2023](#); [Бехтерев и др., 2010](#); [Бехтерев и др., 2007](#); [Бехтерев и др., 2017](#)). Вполне возможно также применение спектральных методов анализа (ИК-, УФ- и видимой области) и без хроматографирования, фракционирования, если обеспечена соответствующая избирательность.

Кроме того, одностадийность пробоподготовки резко сокращает сроки проведения исследований, экспертиз, повышает их надежность и качество за счет снижения случайной составляющей погрешности результата анализа, поскольку нет дополнительных манипуляций с пробой и экстрактом.

Необходимо отметить еще одно важное выгодное качество ЭВ по сравнению с другими традиционными методами предварительной подготовки проб в химико-токсикологических исследованиях это извлечение аналитов при низких температурах, порядка (минус) $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Исследование биологических проб при отрицательных температурах благоприятна в целях улучшения условий труда и техники безопасности, так как в этом случае значительно снижается летучесть растворителя и извлекаемых токсикантов. Кроме того, пониженные температуры дают возможность изучать термолабильные органические вещества, например, физиологически активные компоненты ([Bekhterev, Malyarovskaya, 2019](#); [Бехтерев, Маляровская, 2018](#)). Способ экстракционного вымораживания реализован в серийно выпускаемом с 2021 г. в России (НПФ «Мета-хром», г. Йошкар-Ола) лабораторном устройстве – криоэкстрактор ЭВЦ. Его применение активно набирает силу в системе отечественной судебной-медицинской экспертизы.

Оптимизация режима экстракционного вымораживания дает возможность исключить уже на стадии выделения определяемых веществ ионный фон минеральных компонентов и эндогенный фон мешающих анализу органических соединений: белковых, липидных и углеводных фракций био.пробы. При этом, уменьшение количества соэкстрагируемых при ЭВЦ веществ положительно влияет на обнаружении и идентификации определяемых компонентов, увеличивая параметр «сигнал/шум» в случае применения газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). В качестве примера можно привести результаты из практики работы Бюро судебно-медицинской экспертизы г. Сочи, когда в биоматрице, подвергшейся значительному биологическому разложению, удалось обнаружить наркотическое вещество (Бехтерев и др., 2019). Как следует из сравнения ГХ-МС-хроматограмм на Рисунке 3 применение ЭВЦ вместо используемой жидкость-жидкостной экстракции (Швайкова, 1975) позволило практически полностью устранить интенсивный «химический фон» соэкстрактивных веществ (сравни хроматограммы «а» и «б»). После чего стало возможным выявить присутствие в экстракте кетамина (наркотическое средство, применяемое в ветеринарии), как это следует из хроматограммы «в».

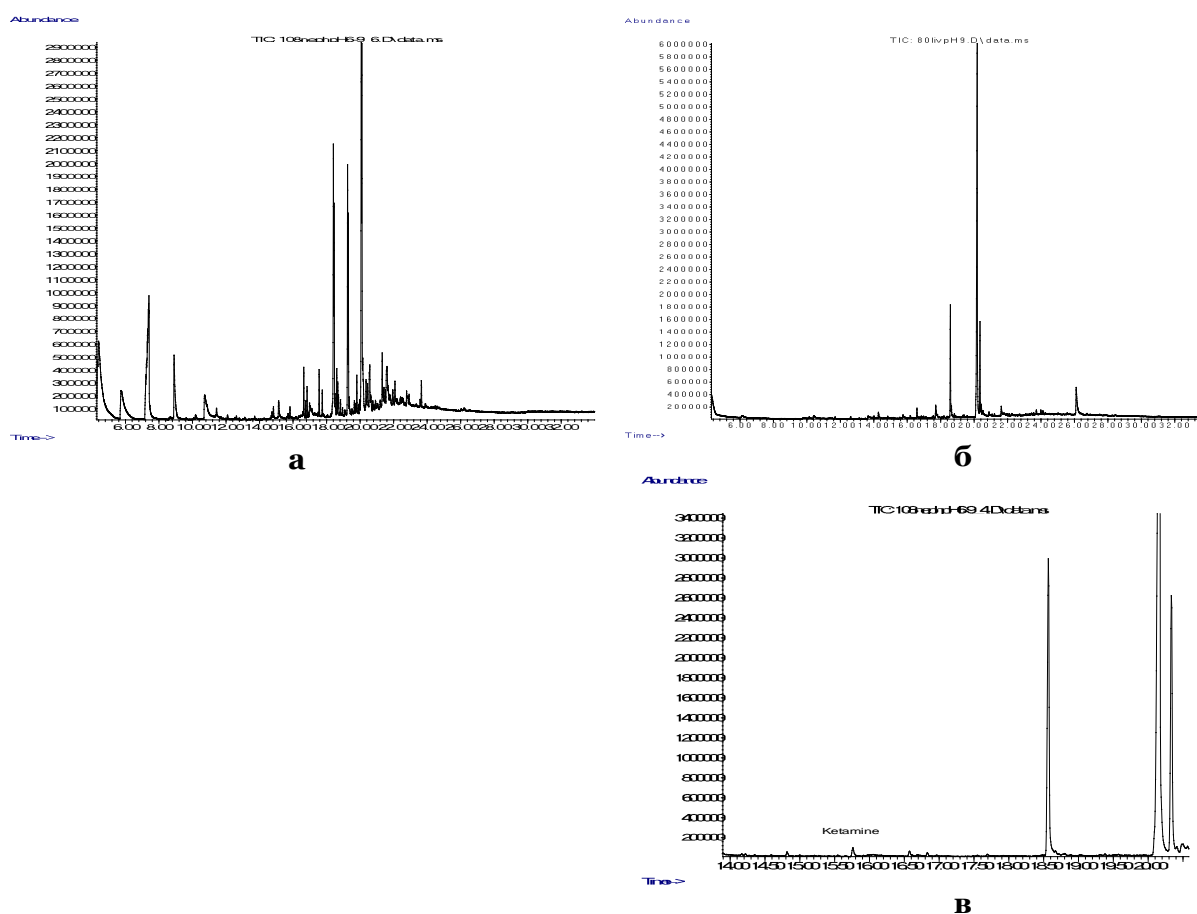


Рис. 3. ГХ-МС-хроматограммы (Бехтерев и др., 2019):

а – экстракта почки от трупа в результате жидкостной экстракции по методу (Швайкова, 1975);

б – экстракта почки от трупа, полученного методом ЭВЦ (Бехтерев и др., 2019);

в – фрагмент хроматограммы «б», подтверждающий присутствие кетамина в пробе.

Использование ЭВЦ вместо жидкостной и твердофазной экстракции, в т.ч. QuEChERS, позволяет также значительно улучшить экономические показатели. Существенно минимизируется количество экстрагента и химической посуды. Так, например, при определении в крови пировалерона (PVP – психоактивное, наркотическое вещество) уже на одной пробе, как видно из анализа представленных данных в Таблице 1, экономия только в реактивах и расходных материалах составляет более, чем в 120-крат в сравнении с

применяемой сейчас в лабораториях страны адаптированной зарубежной методикой (Москалева и др., 2017). А простота процедуры методики и отсутствие необходимости в специальной подготовке персонала лаборатории делают разработанный метод весьма привлекательным, открывая широкие перспективы его внедрения.

Таблица 1. Сравнение методов ЭВЦ (Бехтерев и др., 2017) и Vetex-Q Tox (QuEChERS) (Москалева и др., 2017) при газохроматографическом определении пировалерона (PVP) в моче

№/п	Этап процедуры анализа	Vetex-Q Tox (QuEChERS) (Москалева и др., 2017)			ЭВЦ (Бехтерев и др., 2017)		
		Реактивы	Стоимость руб.	Время мин	Реактивы	Стоимость руб.	Время мин
1	Экстракция	5 мл ацетонитрила	11,15	1	1,5 мл ацетонитрила + 0,25 мл изоаминола ⇒ ЭВЦ извлечение	3,36	5
2		0,1 мл HCl + набор буф.солей Vetex-Q Tox + УЗ ванна		20			25
3	Центрифуга			10			
4	Очистка экстракта (высаливание + осушка)	Набор Vetex-Q Tox + встряхивание	400	5			
5	Центрифуга			10			
	Итого:		411,15	≥ 46		3,36	30
	Примечание	После центрифугирования (п. 3) часть экстракта переносят в другую пробирку для очистки (п. 4), возможны погрешности. Переход от этапа к этапу требует еще дополнительного времени.			Погрешности минимальны, т.к. вся процедура выполняется в одном пенициллиновом флаконе.		

В заключение можно добавить также, что метод экстракционного вымораживания в значительной мере отвечает требованиям зеленой химии, т.к. в результате применения нет отходов, требующих специальной утилизации, например, ТФЭ-картриджи, фильтры, реактивы-осушители, мембраны и пр.

Таким образом, подводя итог сказанному, следует отметить, что, несмотря на относительно небольшой срок применения, продемонстрированные выгодные качества экстракционного вымораживания в предварительной подготовке биологических проб дают основания полагать на дальнейшее расширение его использования в химической токсикологии и судебной химии. Разработанные схемы анализа и методики определения целевых веществ в биологических объектах одностадийны, существенно повышают экспрессность анализа, не предъявляют дополнительных требований к квалификации персонала, значительно снижают материальные и трудовые затраты, улучшают условия труда.

Литература

Бехтерев и др., 2007 – Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Маслаков И.В. Использование экстракционного вымораживания для анализа 1,4-бензодиазепинов в моче // Судебно-медицинская экспертиза. 2007. №2. С. 32-35.

Бехтерев и др., 2010 – Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Козина Е.П., Маслаков И.В. Экспресс-определение кофеина в крови методом экстракционного вымораживания // Судебно-медицинская экспертиза. 2010. №5. С. 22-24.

Бехтерев и др., 2017 – Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Кошкарева Е.В., Шипанов И.Н. Газохроматографическое определение пировалерона в моче методом экстракционного

вымораживания в сочетании с центрифугированием // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т. 60. №3. С. 27-31.

Бехтерев и др., 2019 – *Бехтерев В.Н., Гаврилова С.Н., Шипанов И.Н.* Применение экстракционного вымораживания на этапе предварительной подготовки биопроб в ГХ-МС химико-токсикологическом анализе // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019. Т. 62. №6. С. 53-57.

Бехтерев, 2007 – *Бехтерев В.Н.* Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракцией в сочетании с вымораживанием / Патент РФ RU N2303476/2007.

Бехтерев, 2015 – *Бехтерев В.Н.* Способ извлечения органических веществ из водных сред экстракционным вымораживанием в поле центробежных сил / Патент РФ RU N2564999/2015.

Бехтерев, 2020 – *Бехтерев В.Н.* Способ извлечения органических веществ из водной среды / Патент Кыргызской Республики № 388/2020.

Бехтерев, Маляровская, 2018 – *Бехтерев В.Н., Маляровская В.И.* Экстракционное вымораживание в качестве нового технологического подхода к получению растительных биологически активных веществ // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2018. Т. 8. № 4. С. 73-82.

Вергейчик, 2009 – *Вергейчик Т.Х.* Токсикологическая химия: Учебник. Под ред. Е.Н. Вергечика. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 400 с.

Виттенберг, 2003 – *Виттенберг А.Г.* Равновесная модель в описании газовой экстракции и парофазного анализа // *Ж. аналит. химии*. 2003. Т. 58. № 1. С. 6-21.

Еремин и др., 1993 – *Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В.* Анализ наркотических средств: Руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств; под ред. Б.Н. Изотова. М.: Издательство «Мысль», 1993. 271 с.

Золотенкова и др., 2022 – *Золотенкова Г.В., Герасимов А.Н., Золотенков Д.Д., Ковалев А.В.* Статистический анализ показателей медико-криминалистических подразделений бюро СМЭ в Российской Федерации // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2022. №5. С. 5-10.

Коваленко и др., 2007 – *Коваленко А.Е., Кардонский Д.А., Еганов А.А., Гришин Д.А.* Современные подходы к анализу наркотических веществ в биологических объектах // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2007. № 50: 2. С. 28-32.

Москалева и др., 2017 – *Москалева Е.В., Ерощенко Н.Н., Кирюшин А.Н., Кардонский Д.А., Еганов А.А.* Обнаружение α -пирролидиновалерофенона (α -PVP) и его метаболитов в объектах судебно-химического исследования // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т. 60. №1. С. 19-22.

Швайкова, 1975 – *Швайкова М.Д.* Токсикологическая химия. Изд. 3-е, испр. М.: Медицина, 1975. 376 с.

Шевырин, 2015 – *Шевырин В.А.* Синтетические каннабиноиды в качестве новых психоактивных соединений. Установление структур, аналитические характеристики, методы определения и идентификации в объектах анализа наркотических средств. М.: Изд. «Перо», 2015. 608 с.

Bekhterev, 2007 – *Bekhterev V.N.* Extractive freezing-out in the analysis of organic compounds in the aqueous media // *Mendeleev Comm.* 2007. V. 17. P. 241.

Bekhterev, 2008 – *Bekhterev V.N.* Recovery of phenols from water by extraction freezing // *Journal of Analytical Chemistry*. 2008. Т. 63. № 10. Pp. 950-953.

Bekhterev, 2015 – *Bekhterev V.* A Method of Recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze-out Extraction under the Action of Centrifugal Force / PCT/RU2015/000615, 28.09.2015.

Bekhterev, 2016 – *Bekhterev V.N.* Freeze-Out Extraction of Monocarboxylic Acids from Water into Acetonitrile under the Action of Centrifugal Forces // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2016. V. 90(10). Pp. 2055-2059.

Bekhterev, 2019 – *Bekhterev V.* A Method of Recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze-out Extraction under the Action of Centrifugal Force / Patent EPO N3357873/2019.

[Bekhterev, 2020a](#) – *Bekhterev V.N.* Extractive Freezing-out of Caffeine from Aqueous Solutions in a Centrifugal Force Field // *Journal of Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 75. No. 9. Pp. 1103-1107.

[Bekhterev, 2021](#) – *Bekhterev V.* A Method of recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze out Extraction under the Action of a centrifugal Force / Indian Patent N370406/2021.

[Bekhterev, 2021a](#) – *Bekhterev V.N.* Extractive Freezing-Out with Centrifugation – A New Technology of Sample Preparation in Chemical Analysis on an Example of Organic Bases // *Journal of Analytical Chemistry*. 2021. Vol. 76. No. 9. Pp. 1106-1110.

[Bekhterev, 2023](#) – *Bekhterev V.N.* Rapid Gas-Chromatographic Determination of Phenol and Cresols in Water by Extractive Freezing-out // *Journal of Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 78. No. 6. Pp. 776-782.

[Bekhterev, Malyarovskaya, 2019](#) – *Bekhterev V.N., Malyarovskaya V.I.* Rapid HPLC method of scopoletine determination in Weigela leaves based on one-step sample preparation by extractive freezing-out // *Mendeleev Communications*. 2019. Vol. 29. Pp. 592-594.

[Kolb, Ettre, 1997](#) – *Kolb B., Ettre L.S.* Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice. N.Y.: Wiley – VCH. 1997. 276 p.

References

[Bekhterev i dr., 2007](#) – *Bekhterev, V.N., Gavrilova, S.N., Maslakov, I.V.* (2007). Ispol'zovanie ekstraktsionnogo vymorazhivaniya dlya analiza 1,4-benzodiazepinov v moche [The use of extraction freezing for the analysis of 1,4-benzodiazepines in urine]. *Sudebno-medsinskaya ekspertiza*. 2: 32-35. [in Russian]

[Bekhterev i dr., 2010](#) – *Bekhterev, V.N., Gavrilova, S.N., Kozina, E.P., Maslakov, I.V.* (2010). Ekspress-opredelenie kofeina v krovi metodom ekstraktsionnogo vymorazhivaniya [Express determination of caffeine in blood using extraction freezing method]. *Sudebno-medsinskaya ekspertiza*. 5: 22-24. [in Russian]

[Bekhterev i dr., 2017](#) – *Bekhterev, V.N., Gavrilova, S.N., Koshkareva, E.V., Shipanov, I.N.* (2017). Gazokhromatograficheskoe opredelenie pirovalerona v moche metodom ekstraktsionnogo vymorazhivaniya v sochetanii s tsentrifugirovaniem [Gas chromatographic determination of pyrovalerone in urine by extraction freezing in combination with centrifugation]. *Sudebno-medsinskaya ekspertiza*. 60(3): 27-31. [in Russian]

[Bekhterev i dr., 2019](#) – *Bekhterev, V.N., Gavrilova, S.N., Shipanov, I.N.* (2019). Primenenie ekstraktsionnogo vymorazhivaniya na etape predvaritel'noi podgotovki bioprob v GKh-MS khimiko-toksikologicheskom analize [Application of extraction freezing at the stage of preliminary preparation of biosamples in GC-MS chemical-toxicological analysis]. *Sudebno-medsinskaya ekspertiza*. 62(6): 53-57. [in Russian]

[Bekhterev, 2007](#) – *Bekhterev, V.N.* (2007). Extractive freezing-out in the analysis of organic compounds in the aqueous media. *Mendeleev Comm*. 17: 241.

[Bekhterev, 2007](#) – *Bekhterev, V.N.* (2007). Sposob izvlecheniya organicheskikh veshchestv iz vodnykh sred ekstraktsiei v sochetanii s vymorazhivaniem [Method for extracting organic substances from aqueous media by extraction in combination with freezing]. Patent RF RU N2303476/2007. [in Russian]

[Bekhterev, 2008](#) – *Bekhterev, V.N.* (2008). Recovery of phenols from water by extraction freezing. *Journal of Analytical Chemistry*. 63(10): 950-953.

[Bekhterev, 2015](#) – *Bekhterev, V.* (2015). A Method of Recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze-out Extraction under the Action of Centrifugal Force. PCT/RU2015/000615, 28.09.2015.

[Bekhterev, 2015](#) – *Bekhterev, V.N.* (2015). Sposob izvlecheniya organicheskikh veshchestv iz vodnykh sred ekstraktsionnym vymorazhivaniem v pole tsentrobezhnykh sil [Method for extracting organic substances from aqueous media by extraction freezing in a field of centrifugal forces]. Patent RF RU N2564999/2015. [in Russian]

[Bekhterev, 2016](#) – *Bekhterev, V.N.* (2016). Freeze-Out Extraction of Monocarboxylic Acids from Water into Acetonitrile under the Action of Centrifugal Forces. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 90(10): 2055-2059.

[Bekhterev, 2019](#) – *Bekhterev, V.* (2019). A Method of Recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze-out Extraction under the Action of Centrifugal Force. Patent EPO N3357873/2019.

[Bekhterev, 2020](#) – *Bekhterev, V.N.* (2020). Sposob izvlecheniya organicheskikh veshchestv iz vodnoi sredy [Method for extracting organic substances from the aquatic environment]. Patent Kyrgyzskoi Respubliki № 388/2020. [in Russian]

[Bekhterev, 2020a](#) – *Bekhterev, V.N.* (2020). Extractive Freezing-out of Caffeine from Aqueous Solutions in a Centrifugal Force Field. *Journal of Analytical Chemistry*. 75(9): 1103-1107.

[Bekhterev, 2021](#) – *Bekhterev, V.* (2021). A Method of recovery of Organic Substances from Aqueous Media by Freeze out Extraction under the Action of a centrifugal Force. Indian Patent N370406/2021.

[Bekhterev, 2021a](#) – *Bekhterev, V.N.* (2021). Extractive Freezing-Out with Centrifugation – A New Technology of Sample Preparation in Chemical Analysis on an Example of Organic Bases. *Journal of Analytical Chemistry*. 76(9): 1106-1110.

[Bekhterev, 2023](#) – *Bekhterev, V.N.* (2023). Rapid Gas-Chromatographic Determination of Phenol and Cresols in Water by Extractive Freezing-out. *Journal of Analytical Chemistry*. 78(6): 776-782.

[Bekhterev, Malyarovskaya, 2018](#) – *Bekhterev, V.N., Malyarovskaya, V.I.* (2018). Ekstraktsionnoe vymorazhivanie v kachestve novogo tekhnologicheskogo podkhoda k polucheniyu rastitel'nykh biologicheskii aktivnykh veshchestv [Extraction freezing as a new technological approach to obtaining plant biologically active substances]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. 8(4): 73-82. [in Russian]

[Bekhterev, Malyarovskaya, 2019](#) – *Bekhterev, V.N., Malyarovskaya, V.I.* (2019). Rapid HPLC method of scopoletine determination in Weigela leaves based on one-step sample preparation by extractive freezing-out. *Mendeleev Communications*. 29: 592-594.

[Eremin i dr., 1993](#) – *Eremin, S.K., Izotov, B.N., Veselovskaya, N.V.* (1993). Analiz narkoticheskikh sredstv: Rukovodstvo po khimiko-toksikologicheskomu analizu narkoticheskikh i drugikh odurmanivayushchikh sredstv [Analysis of narcotic drugs: Guide to the chemical and toxicological analysis of narcotic and other intoxicating drugs]; pod red. B.N. Izotova. M.: Izdatel'stvo «Mysl'», 271 p. [in Russian]

[Kolb, Ettre, 1997](#) – *Kolb, B., Ettre, L.S.* (1997). Static Headspace – Gas Chromatography: Theory and Practice. N.Y.: Wiley – VCH. 276 p.

[Kovalenko i dr., 2007](#) – *Kovalenko, A.E., Kardonskii, D.A., Eganov, A.A., Grishin, D.A.* Sovremennye podkhody k analizu narkoticheskikh veshchestv v biologicheskikh ob'ektakh [Modern approaches to the analysis of narcotic substances in biological objects]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 50(2): 28-32. [in Russian]

[Moskaleva i dr., 2017](#) – *Moskaleva, E.V., Eroshchenko, N.N., Kiryushin, A.N., Kardonskii, D.A., Eganov, A.A.* (2017). Obnaruzhenie α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP) i ego metabolitov v ob'ektakh sudebno-khimicheskogo issledovaniya [Detection of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) and its metabolites in objects of forensic chemical research]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 60(1): 19-22. [in Russian]

[Shevyrin, 2015](#) – *Shevyrin, V.A.* (2015). Sinteticheskie kannabinoidy v kachestve novykh psikhoaktivnykh soedinenii. Ustanovlenie struktur, analiticheskie kharakteristiki, metody opredeleniya i identifikatsii v ob'ektakh analiza narkoticheskikh sredstv [Synthetic cannabinoids as new psychoactive compounds. Establishment of structures, analytical characteristics, methods of determination and identification in objects of analysis of narcotic drugs]. M.: Izd. «Pero», 608 p. [in Russian]

[Shvaikova, 1975](#) – *Shvaikova, M.D.* (1975). Toksikologicheskaya khimiya [Toxicological chemistry]. Izd. 3-e, ispr. M.: Meditsina, 376 p. [in Russian]

[Vergechik, 2009](#) – *Vergechik, T.Kh.* (2009). Toksikologicheskaya khimiya: Uchebnik [Toxicological chemistry: Textbook]. Pod red. E.N. Vergechika. M.: MEDpress-inform, 400 p. [in Russian]

[Vittenberg, 2003](#) – *Vittenberg, A.G.* (2003). Ravnovesnaya model' v opisaniy gazovoi ekstraktsii i parofaznogo analiza [Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis]. *Zh. analit. khimii*. 58(1): 6-21. [in Russian]

Zolotenkova i dr., 2022 – Zolotenkova, G.V., Gerasimov, A.N., Zolotenkov, D.D., Kovalev, A.V. (2022). Statisticheskii analiz pokazatelei mediko-kriminalisticheskikh podrazdelenii byuro SME v Rossiiskoi Federatsii [Statistical analysis of indicators of medical and forensic units of the Bureau of Medical Examiners in the Russian Federation]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 5: 5-10. [in Russian]

Инновации в предварительной подготовке биологических проб в химико-токсикологических исследованиях

Виктор Николаевич Бехтерев ^{a, *}, Светлана Николаевна Гаврилова ^a,
Евгения Геннадьевна Нескубина ^a, Игорь Николаевич Шипанов ^a

^a Бюро судебно-медицинской экспертизы №2 Минздрава Краснодарского края, Сочи, Российская Федерация

Аннотация. Продемонстрированы результаты и опыт применения нового принципа экстракции целевых органических веществ из водосодержащих матриц, экстракционного вымораживания, на этапе предварительной подготовки биологических объектов к инструментальному анализу в химико-токсикологических и судебно-химических исследованиях. Показано, что предложенный способ значительно дешевле традиционно используемых методов жидкостной экстракции и сорбционного извлечения. Технология позволяет применять гидрофильные, водорастворимые экстрагенты без какой-либо химической модификации пробы. Она выгодно отличается от жидкостной и твердофазной экстракции тем, что дает возможность сразу без необходимых в этом случае дополнительных манипуляций извлекать органические соединения из сильно загрязненных, дисперсных систем. Разработанные методики определения лекарственных и наркотических веществ в комплексе с различными видами хроматографической идентификации, обладают избирательностью, значительно снижают фон соэкстрактивных компонентов и занимают меньше времени за счет одноэтапности процедуры пробоподготовки. Это благоприятно в отношении повышения качества и надежности проводимых экспертных исследований. Требуется минимальное количество реактивов и расходных материалов, что отвечает требованиям зеленой химии. К настоящему времени техника экстракционного вымораживания в условиях воздействия поля центробежных сил уже реализована в качестве лабораторного устройства – криоэкстрактора ЭВЦ. Внедрение экстракционного вымораживания в практику судебно-химических лабораторий не требует специальной профессиональной подготовки персонала.

Ключевые слова: лекарственные, наркотические вещества, экстракционное вымораживание, анализ, химическая токсикология, хроматография.

* Корреспондирующий автор
Адреса электронной почты: vic-bekhterev@yandex.ru (В.Н. Бехтерев)