

ТЕМА 1. ГРУППА ВЕЩЕСТВ, ИЗОЛИРУЕМЫХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ЭКСТРАКЦИЕЙ И СОРБЦИЕЙ

Цель: сформировать навыки химико-токсикологического анализа веществ, изолируемых из биологического материала экстракцией и сорбцией.

Группа веществ, изолируемых из объектов экстракцией и сорбцией, включает в себя органические вещества различной химической структуры, прежде всего, наркотики, лекарственные средства и пестициды.

К группе веществ, изолируемых из биологического материала экстракцией и сорбцией (их ещё называют «нелетучие» яды), относятся соединения кислотного, нейтрального и основного характера, различные по своему химическому строению. Номенклатура их очень велика и постоянно расширяется по мере синтеза новых соединений. Наибольшее токсикологическое значение в настоящее время имеют:

Вещества кислотного характера:

1. Органические кислоты: бензойная, салициловая, ацетилсалициловая, пикриновая.
2. Барбитураты: барбитал, фенобарбитал, барбамил, этаминал-На, бутобарбитал, гексенал, бензонал, бензобамил, циклобарбитал и др.

Вещества нейтрального характера:

1. Небарбитуровые снотворные: ноксирон, тетридин.
2. Сердечные гликозиды.
3. Многоатомные фенолы: гидрохинон, пирогаллол.
4. Полинитропроизводные: м-динитробензол, динитротолуолы, тринитротолуол.
5. Производные анилина и п-аминофенола: фенацетин, п-фенилендиамин.

Вещества основного характера:

1. Алкалоиды: производные пиридина и пиперидина (жидкие алкалоиды); тропана (атропин, кокаин и др.); хинолина (хинин); изохинолина (опийные); индола (стрихнин, бруцин, резерпин); пурина (кофеин, теобромин, теofilлин); пирролизидина (платифиллин, саррацин); ациклические (эфедрин); стероидоподобные (вератрин); неуставленного строения (аконитин).

2. Синтетические вещества основного характера: производные пиразола (антипирин, амидопирин); производное пиперидина (промедол); производные аминокислот ароматического ряда (новокаин и дикаин); изониазид; производные фенотиазина (аминазин и др.); производные бензодиазепина и т.д.

МЕТОДЫ ИЗОЛИРОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ И ИХ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

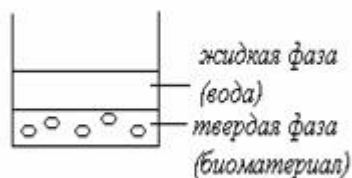
Изолирование «нелетучих» ядов из биологического материала основано на различной растворимости их ионизированной и молекулярной форм в воде и органических растворителях и на коэффициенте распределения молекулярной формы между водной и органической фазами.

В процессе изолирования «нелетучих» ядов из биологического материала взаимодействуют 3 компонента: яд, биологический материал и экстрагент.

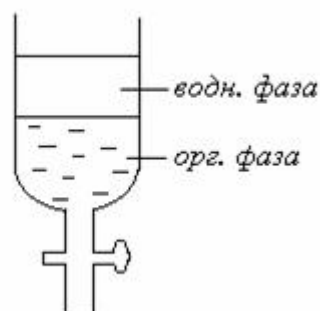
При исследовании тканевого материала (внутренние органы трупа) изолирование состоит из двух стадий: извлечение яда из твердой фазы (объект) в водную, и извлечение яда из водной фазы в органический растворитель.

Схематично это может быть представлено следующим образом:

I стадия экстракции



II стадия экстракции



В лабораторных условиях экстракцию обычно проводят с помощью делительной воронки. В воронку помещают исследуемый раствор, содержащий растворенное вещество, подлежащее экстрагированию, и не смешивающийся с водой органический растворитель, которым извлекается экстрагируемое вещество из водного раствора. Воронка энергично встряхивается (обычно 2-5 мин). При этом обе жидкие фазы диспергируются друг в друга, образуя капли различного размера. Экстрагируемое вещество через границу раздела водной и органической фаз переходит из водной фазы в органическую до тех пор, пока в системе не наступит межфазное равновесие, при котором достигаются равновесные концентрации экстрагируемого вещества в водной и в органической фазах. При достижении межфазного равновесия скорость перехода растворенного вещества из водной фазы в органическую становится равной скорости перехода того же вещества из органической фазы в водную, т.е. осуществляется состояние динамического равновесия. После прекращения встряхивания обе жидкие фазы расслаиваются, причем тем быстрее, чем больше разница в плотности воды (водного раствора) и применяемого органического растворителя, плотность которого может быть как выше, так и ниже плотности воды.

При исследовании биологических жидкостей (кровь, моча, промывные воды) необходимость в первой стадии изолирования отпадает и сразу проводится экстракция в органический растворитель.

Факторы, влияющие на эффективность изолирования «нелетучих» ядов из биоматериала

Эффективность изолирования веществ на I и II стадиях определяется рядом факторов.

На *первой* стадии на эффективность изолирования вещества будут влиять такие факторы, как:

1. Растворимость яда в используемом экстрагенте.
2. Экстрагент

Вторая стадия изолирования «нелетучих» ядов заключается в выделении их из водного раствора путём экстрагирования органическим растворителем, не смешивающимся с водой, при различных значениях pH среды. Этим достигается концентрирование вещества в извлечении и его частичная очистка от нормальных компонентов биоматериала (не растворимых в данном растворителе).

На второй стадии изолирования продолжают играть свою роль такие факторы, как:

- 1) растворимость яда, которая определяется степенью ионизации и регулируется величиной pH среды;

2) природа экстрагента, его объём, время и кратность экстракции.

Очистка изолируемых веществ от сопутствующих компонентов

При изолировании ядовитых веществ из биоматериала совместно с ними экстрагируются т.н. соэкстрактивные вещества – примеси белков, продуктов их гидролиза – пептидов и аминокислот, липидов и ряда других соединений, которые являются естественными компонентами биоматериала.

Соэкстрактивные вещества в дальнейшем мешают проведению анализа:

1. Маскируют окраску при проведении реакций окрашивания (обугливание соэкстрактивных веществ под действием концентрированной серной кислоты).

2. Снижают чувствительность микрокристаллических реакций и приводят к образованию кристаллов неправильной формы, либо к их полиморфизму (многообразие форм).

3. Искажают спектры веществ при спектральном исследовании в УФ - и ИК-областях.

4. Дают искаженные результаты количественного определения веществ.

5. Многие продукты гнилостного разложения биоматериала дают такие же реакции, как и некоторые ядовитые вещества (например, трупные алкалоиды – путресцин, кадаверин – дают реакции с общеалкалоидными реактивами).

Для получения надежных результатов необходима очистка исследуемых веществ от соэкстрактивных веществ биоматериала. Очистка может быть проведена при подготовке объекта, в процессе изолирования или после него.

На 1 этапе изолирования возможна только грубая очистка, которая проводится путем:

1 – удаления механических загрязнений (мелких частиц биоматериала) фильтрованием, центрифугированием;

2 – осаждения примесей при добавлении соответствующих реагентов, например, осаждение белков абсолютным спиртом, ацетоном, трихлоруксусной кислотой, вольфрамовой, фосфорно-вольфрамовой, фосфорно-молибденовой кислотами, насыщение электролитами (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl). При этом возможно соосаждение искоемых веществ, что ведет к их частичной потере;

3 – изменения состава фаз, т.е. введения другого органического растворителя (связано с большими потерями веществ).

На 2 этапе изолирования или после него возможна более тонкая очистка, которая может осуществляться путем:

1 – рекстракции, т.е. переведения веществ из одной жидкой фазы в другую при изменении pH раствора (например, очистка барбитуратов и алкалоидов за счет различной растворимости их солеобразных и молекулярных форм в воде и органических растворителях).

2 – сублимации – для веществ, способных возгоняться без разложения при нагревании (салициловая, бензойная кислоты, барбитураты, жидкие алкалоиды).

3 – хроматографии – ионообменной, гель-хроматографии, адсорбционной хроматографии на колонках, тонкослойной хроматографии. Последний вид хроматографии используется часто, т.к. наряду с очисткой дает возможность разделить вещества (их метаболиты) при комбинированных отравлениях и провести их предварительную идентификацию по величинам R_f (хроматографический скрининг «нелетучих» ядов).

ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ МЕТОДЫ ИЗОЛИРОВАНИЯ

В зависимости от поставленной перед задачи, исследование может носить общий или частный характер, т.е. анализ может быть ненаправленным (общим) или направленным (частным).

Частное исследование предусматривает проведение анализа на какое-то определенное вещество или группу веществ. Например, на производные барбитуровой кислоты, на алкалоиды или даже на одно конкретное вещество. При частном исследовании метод изолирования подбирается с учётом физико-химических свойств того соединения (или группы соединений), на которое производится анализ.

Общий анализ включает исследование на несколько групп веществ (3 группы), подлежащих обязательному судебно-химическому исследованию, в том числе и на группу «нелетучих» ядов. В этом случае используются общие для всей группы веществ (универсальные) методы изолирования.

Общими методами изолирования «нелетучих» ядов являются:

1. Изолирование подкисленным этанолом.
2. Изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой..
3. Изолирование нейтральным ацетоном.

1. Изолирование подкисленным этанолом

Самый первый метод изолирования подкисленным спиртом, названный по имени авторов метода Стаса – Отто, применялся только для алкалоидов. В дальнейшем это метод претерпел серьёзные изменения и стал использоваться не только для алкалоидов, но и для многих других ядовитых и сильнодействующих веществ, имеющих токсикологическое значение.

Современная модификация метода состоит из этапов:

- Настаивание измельчённого объекта с этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой до pH 2 – 3, в течение суток. Спирт берётся в количестве, необходимом для покрытия объекта до «зеркала». Спиртовое извлечение сливается и вся операция повторяется трехкратно.

- Упаривание объединённых спиртовых извлечений при температуре 40 – 50 0C до густого остатка, в который по каплям добавляют абсолютный этанол для коагуляции белков. Осадок отфильтровывают и всю операцию осаждения повторяют по мере необходимости до полного удаления белковых соединений.

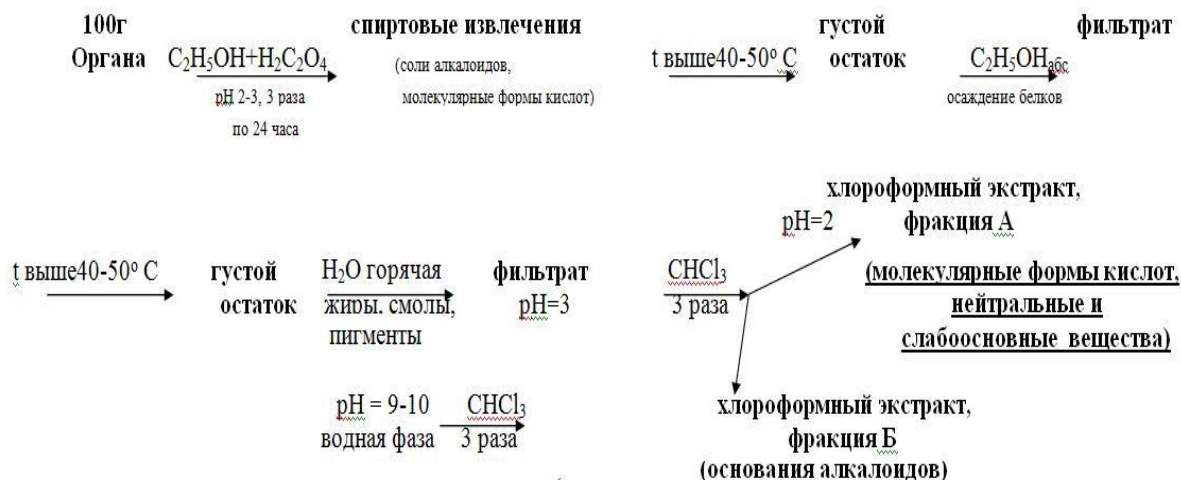
- Упаривание фильтрата при той же температуре до густого остатка и разбавление горячей водой для удаления смолистых веществ, жиров и пигментов. Осадок отфильтровывают.

- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата хлороформом при pH = 2 (трёхкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).

- Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя до pH 9 – 10, экстрагирование веществ сильноосновного характера (трёхкратная экстракция) хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

- Изолирование «нелетучих» ядов из биологического материала подкисленным спиртом (метод Стаса-Отто) проводится по следующей схеме:

Рисунок 1. Схема проведения анализа методом «Стаса-Отто»



Достоинства метода заключаются в следующем:

1. Метод универсален, т.к. этанол является хорошим растворителем для многих веществ этой группы (как ионизированных, так и молекулярных форм).
2. Метод предусматривает очистку извлечения от балластных веществ, в результате чего получают чистые хлороформные извлечения, не дающие эмульсий при экстрагировании веществ из водной фазы хлороформом. Метод даёт возможность изолировать до 30 % барбитуратов и 20 – 25 % алкалоидов.

К недостаткам метода следует отнести:

1. Длительность (8 – 10 рабочих дней) и многостадийность. Большое количество операций, связанных с осаждением белков и фильтрованием, ведёт к значительным потерям искоемых веществ (алкалоиды теряются на 25 – 50 %).
2. Сравнительная дороговизна метода (на 1 исследование тратится до 500 мл этанола).

Все это приводит к тому, что классический метод Стаса – Отто теряет своё былое значение и постепенно заменяется более быстрыми, эффективными и экономными методами извлечения подкисленной водой.

Изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой

Схема изолирования по методу Васильевой заключается в следующем:

- Настаивание измельчённого объекта с водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH = 2 – 3, в течение двух часов. Вода берётся в количестве 1:2 по отношению к навеске объекта. Водное извлечение фильтруется.
- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата хлороформом при pH = 2 (трёхкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).

Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя раствором аммиака до pH 9 – 10, экстрагирование веществ основного характера трёхкратной экстракцией хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

По сравнению с изолированием подкисленным спиртом извлечение водой, подкисленной щавелевой кислотой, обладает рядом преимуществ:

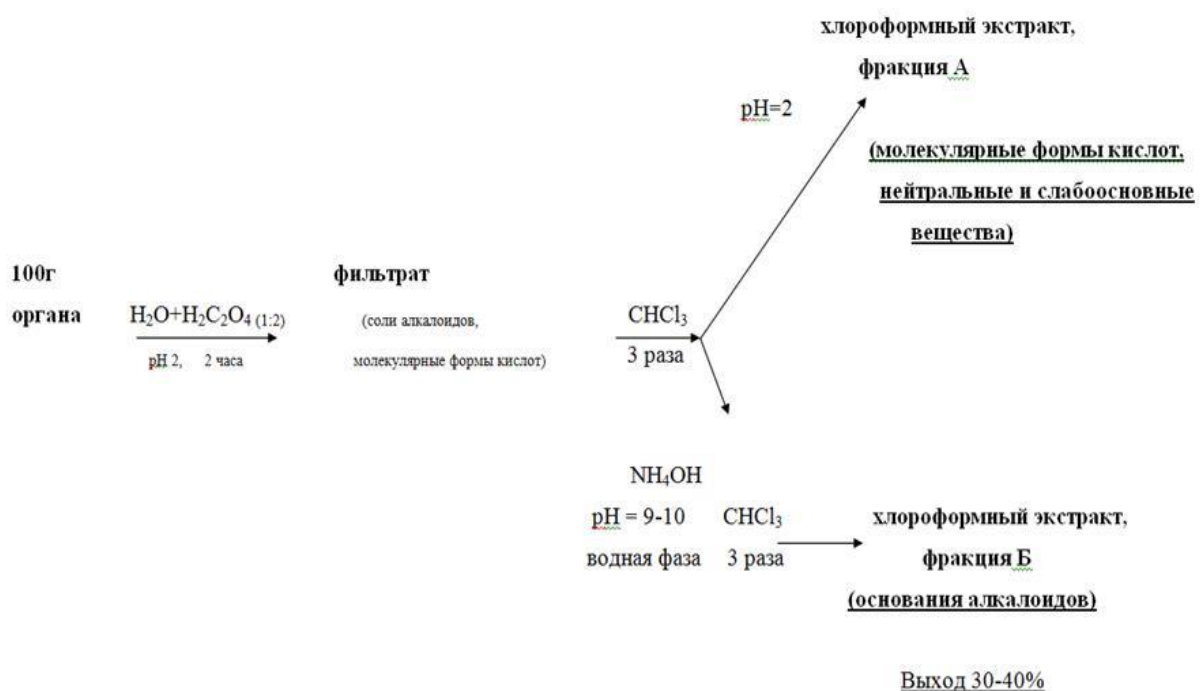
1. Быстрота (анализ можно провести в течение одного рабочего дня).

2. Меньшее количество операций, меньшие потери искоемых веществ (алкалоиды извлекаются на 30 – 40 %).

3. Экономичность и дешевизна, т.к. дорогой спирт заменён водой.

Недостатком метода является образование стойких эмульсий при экстрагировании веществ из водной фазы хлороформом, особенно при исследовании гнилостного биоматериала, т.к. метод не предусматривает очистки извлечений

Рисунок 2. Схема проведения анализа методом Васильевой



3. Изолирование нейтральным ацетоном

Метод предложен проф. Карташовым В.А. (г. Барнаул) в 1990 году.

Измельченную навеску биологического материала массой 5 г экстрагируют 10 мл ацетона в течение 10 минут, центрифугируют. Полученное извлечение сливают, операцию экстрагирования ацетоном повторяют ещё 2 раза по 5 мл. Извлечения объединяют.

К объединенному извлечению добавляют 20 мл 0,5 М. раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают и экстрагируют гексаном дважды. Гексановые извлечения, содержащие примеси, отбрасывают.

Из очищенного водно-ацетонового извлечения (pH=1) эфиром экстрагируют вещества кислотного характера. Далее водно-ацетоновую фазу подщелачивают аммония гидроксидом до pH=9, добавляют 5 г натрия хлорида (высаливающий агент) и экстрагируют вещества основного характера эфиром.

Преимущество метода:

1. Высокий выход ядовитых веществ (до 60-70%). Это достигается за счет использования в качестве экстрагента нейтрального ацетона, который извлекает вещества кислотного и основного характера как в ионизированной, так и в молекулярной формах. Высокий выход веществ позволяет уменьшить массу навески до 5 граммов, что упрощает операции и снижает расход реактивов и времени пробоподготовки.

Недостатки метода:

Ацетон, извлекает из биоматериала большое количество примесей, что требует дополнительной очистки извлечения. К недостаткам метода относится и его многостадийность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белова, А.В. Руководство к практическим занятиям по токсикологической химии / А.В. Белова. - М. «Медицина», 1976, 232с.
2. Крамаренко, В.Ф., Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко К. Выща. школа. 1989, 447с.
3. Токсикологическая химия / Под ред. Т.В. Плетневой. - М.: Геотар-Медиа, 2008.- 512 с