

## Лекція 5

### ГРУПА РЕЧОВИН, ЯКІ ІЗОЛЮЮТЬСЯ ПОЛЯРНИМИ РОЗЧИННИКАМИ (ПІДКИСЛЕНИМ СПИРТОМ АБО ПІДКИСЛЕНОЮ ВОДОЮ)

1. Загальна характеристика групи. Фізичні та хімічні властивості речовин
2. Сучасні загальні та окремі методи ізолювання речовин з біологічного матеріалу.
3. Методи очистки витяжок від домішок і концентрування виділених речовин
4. Ідентифікація і кількісне визначення речовин, що ізолюються екстракцією полярними розчинниками

#### 1. Загальна характеристика групи. Фізичні та хімічні властивості речовин

До групи речовин, які ізолюються з біологічного матеріалу полярними розчинниками (водою, спиртом), належать лікарські речовини рослинного походження (алкалоїди) і синтетичні препарати (саліцилова кислота та її похідні, барбітурати, похідні піразолону, фенотіазину, 1,4-бензодіазепіну та ін.). Лікарські препарати мають різну дію на організм (наркотичні і ненаркотичні анальгетики, нейролептики, спазмолітики, анестетики, снодійні речовини тощо). «Лікарські» отрути посідають одне з перших місць серед токсичних речовин за кількістю смертельних отруєнь, що обумовлено: - доступністю препаратів в аптечній мережі, в рослинах; - передозуванням лікарських препаратів; - самолікуванням хворих; - індивідуальною несприйнятністю окремих препаратів; - поєднанням з алкоголем та іншими лікарськими препаратами, що сповільнює метаболізм, потенціює токсичну дію речовин; - явищами наркоманії і токсикоманії; - випадками суїциду. За фізико-хімічними властивостями «лікарські» отрути – це переважно білі чи жовтуваті кристалічні порошки, які характеризуються різною розчинністю, кислотно-основними властивостями. У полярних розчинниках – воді, спирті – добре розчинні солі речовин кислого й основного характеру (солі алкалоїдів, імідольна форма барбітуратів), які утворюють заряджені іони в розчинах. В органічних розчинниках – хлороформі, ефірі – добре розчинні лі- карські речовини в неіонізованій формі (основи алкалоїдів, імідна форма барбітуратів). Окремі «лікарські» отрути мають властивість леткості (похідні піри- дину і піперидину). «Лікарські» отрути потрапляють в організм: - через рот (таблетки, порошки, частини рослин); - дихальні шляхи (нікотин, анабазин – при палінні; кокаїн – при явищі «кокаїнізму»); - можуть бути введені парентерально, ректально. Всмоктування, розподіл і локалізація отрут залежать від їх фізико- хімічних властивостей.

#### 2. Сучасні загальні та окремі методи ізолювання речовин з біологічного матеріалу.

Поділ «лікарських» отрут на підгрупи Для ізолювання «лікарських» отрут з біологічного матеріалу використовують загальні і часткові методи. До загальних методів ізолювання на- лежать екстракція водою (метод Васильєвої) чи спиртом (метод Стаса– Отто), попередньо підкисленими щавлевоюкислотою; екстракція амфіфільними

розчинниками – ацетонітрилом (метод Шведзинського) чи ацетоном (метод Карташова). Широко впроваджені в практику хіміко-токсикологічного аналізу методи екстракції «лікарських» отрут водою чи спиртом, підкисленими щавлевою кислотою. Методи екстракції амфільними розчинниками є перспективними і мають подальший розвиток. Ізолювання отрут екстракцією полярними розчинниками включає такі етапи: 1. Підготовка зразка до дослідження: подрібнення органів трупа за допомогою ножиць, м'ясорубки, гомогенізатора. 2. Взяття наважки (1 – 100 г залежно від вмісту отруйної речовини в об'єкті і чутливості методів дослідження). 3. 2–3-разова екстракція отрути підкисленим розчинником або розчинником без підкислення. 4. З'єднання, проціжування і центрифугування екстракту. 5. Екстракція отрут із кислотної водної фази органічними розчинниками – одержання «кислої» хлороформної витяжки. 6. Екстракція отрут з лужної водної фази органічними розчинниками – одержання «лужної» хлороформної витяжки. При використанні етанолу як екстрагента передбачено осадження білків абсолютним етанолом з концентрованої спиртової витяжки з наступним фільтруванням витяжки і розведенням водою. При використанні ацетонітрилу як екстрагента передбачено висолування отрут, для чого до ацетонітрильної витяжки додається розчин натрію сульфату перед екстракцією отрут неполярними чи малополярними розчинниками (гексаном, ефіром, хлороформом). При використанні ацетону як екстрагента домішки екстрагуються гексаном після розведення ацетонової витяжки розчином хлористоводневої кислоти. «Лікарські» отрути екстрагуються хлороформом чи ефіром у присутності висолювача – натрію хлориду чи натрію сульфату. Метод О. О. Васильєвої не прийнятний для аналізу біологічного Метод О. О. Васильєвої не прийнятний для аналізу біологічного матеріалу, який піддався гнилісним змінам, у зв'язку з утворенням стійких емульсій на стадії екстракції речовин із водної витяжки органічним розчинником і недостатнім очищенням екстрактів. Зазначений метод мало придатний для аналізу барбітуратів і інших речовин, погано розчинних у підкисленій воді. Цих недоліків не мають методи Стаса–Отто, Шведзинського і В.А. Карташова. Однак метод ізолювання підкисленою водою дешевший і безпечніший, ніж методи ізолювання «лікарських» отрут органічними екстрагентами, і застосовується при дослідженні лише свіжих біологічних об'єктів. Часткові методи ізолювання потрібні при направленому хіміко-токсикологічному аналізі на визначену хімічну групу отрут чи індивідуальні речовини, з огляду на їх фізико-хімічні особливості.

Фактори, що впливають на ступінь екстракції речовин з водних витяжок органічними розчинниками До них належать: 1. Природа екстрагованої речовини. 2. Значення рН середовища. 3. Природа екстрагента. 4. Температура. 5. Наявність висолювачів. 6. Співвідношення об'єму водної та органічної фаз. 7. Кількість повторних екстракцій.

### 3. Методи очистки витяжок від домішок і концентрування виділених речовин

Для очищення аналізованих сполук від співекстрактивних речовин (білки, жири, пігменти та ін.) існують різні методи: 1. Фільтрування і центрифугування. 2. Осадження білків різними реактивами і способами. 3. Екстракція. 4. Хроматографія – на папері, колонкова, у тонких шарах сорбенту (ТШХ-метод), гель-хроматографія. 5. Електрофорез. 6. Дистиляція з водяною парою. 7. Сублимація. 8. Діаліз.

4. Ідентифікація і кількісне визначення речовин, що ізолюються екстракцією полярними розчинниками

Принципова схема аналізу «лікарських» отрут Вибір схеми аналізу «лікарських» отрут залежить від ряду факторів: 1. Біологічного об'єкту дослідження (органи і тканини, біологічні рідини трупа, біологічні рідини живої людини); 2. Проведення спрямованого або неспрямованого аналізу препаратів; 3. Устаткування судово-хімічної або хіміко-токсикологічної лабораторії (апаратура, розчинники і реактиви). Залежно від вищезгаданих факторів аналіз «лікарських» отрут проводиться у двох напрямках: Судово-хімічне дослідження біологічного матеріалу, взятого з трупа (аналіз «лікарських» отрут в токсичних і летальних дозах - 104 - 106 г в пробі); Хіміко-токсикологічне дослідження біологічних рідин живої людини (аналіз «лікарських» отрут в терапевтичних і токсичних дозах - 106 - 1012 г в пробі). Оцінка різних методів по чутливості: 1. Хімічні методи -104 - 106 г в пробі;

2. Ф методи: УФ – спектрометрія – 106 -107 г пробі; ТШХ – 106 -107 г пробі; ГРХ – 108 - 1010 г в пробі; ВЕРХ – 108 -1010 г в пробі; 3. Імунохімічні методи – 1010 -1012 г в пробі. Схема не спрямованого дослідження «лікарської» отрути в біологічному об'єкті.

ТШХ - скринінг «лікарських» отрут. Процес ідентифікації невідомої лікарської , яка стала причиною отруєння, складається з двох, етапів: попереднього і підтверджуючого.

Попередній етап дозволяє віднести отруту до певної групи хімічних сполук і заснований на використанні методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) і системи «скринінгу», тобто системи відбору, просіювання. Вибір методу тонкошарової хроматографії для пошуку «лікарської» отрути при неспрямованому дослідженні обумовлений багатofункціональністю методу: розділення препаратів і їх метаболітів; очищення від домішок; ідентифікація групи препаратів або індивідуальної речовини; кількісна оцінка аналізованого препарату. Попередній етап складається з двох стадій: 1 стадія – застосовуються загальні системи розчинників, що дозволяють розділити проаналізовані речовини на групи, що локалізуються в певних хроматографічних зонах: В разі позитивного результату при використанні загальних систем розчинників приступають до другої стадії.

2 стадія - застосовуються індивідуальні системи розчинників, що дозволяють ефективно розділити сполуки, що входять в ту або іншу хроматографічну зону. Підтверджуючий етап - після проведення двох стадій попереднього етапу проводять підтверджуючі дослідження, що включають комплекс хімічних, фізико-хімічних методів, а також фармакологічні проби. Негативний результат попереднього дослідження навіть на першій стадії свідчить про відсутність токсичних доз лікарських препаратів в екстрактах з біологічного матеріалу. Попереднє хроматографічне дослідження ефективно за умови аналізу біологічного матеріалу, що не піддався процесам гнильного розкладання.