

**Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького**

**Кафедра токсикологічної та аналітичної хімії**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ  
ДО ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ  
З ТОКСИКОЛОГІЧНОЇ ХІМІЇ**

**(Частина 2)**

**для студентів V курсу фармацевтичного факультету  
(спеціальність «Фармація»)**

**Львів – 2015**

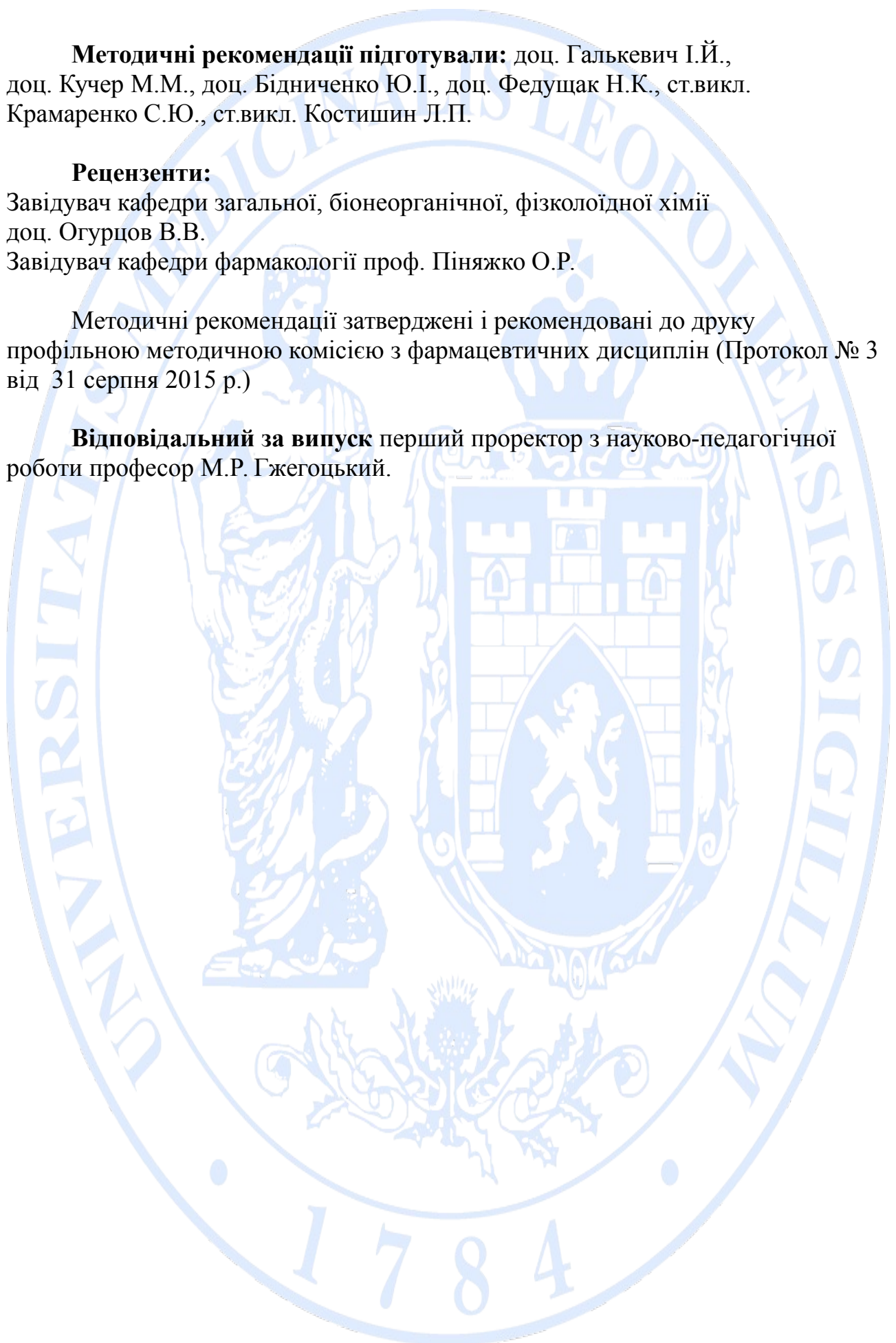
**Методичні рекомендації підготували:** доц. Галькевич І.Й., доц. Кучер М.М., доц. Бідниченко Ю.І., доц. Федущак Н.К., ст.викл. Крамаренко С.Ю., ст.викл. Костишин Л.П.

**Рецензенти:**

Завідувач кафедри загальної, біонеорганічної, фізикоїдної хімії  
доц. Огурцов В.В.  
Завідувач кафедри фармакології проф. Піняжко О.Р.

Методичні рекомендації затверджені і рекомендовані до друку профільною методичною комісією з фармацевтичних дисциплін (Протокол № 3 від 31 серпня 2015 р.)

**Відповідальний за випуск** перший проректор з науково-педагогічної роботи професор М.Р. Гжегоцький.



## Зміст

Розділ V. Група отруйних речовин, які виділяються із біологічного матеріалу шляхом ізолювання полярними розчинниками (підкисленою водою, підкисленим етиловим спиртом, ацетонітрилом тощо). Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного дослідження лікарських речовин та отрут природного походження (отрут рослин, грибів, тварин, комах, водоростей).....	5
Заняття 1. МЕТОДИ ІЗОЛЮВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІДКИСЛЕНИМ СПИРТОМ ЧИ ПІДКИСЛЕНОЮ ВОДОЮ.....	5
Заняття 2. РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ ПОХІДНИХ ПІРАЗОЛОНУ, КСАНТИНУ, БАРБИТУРОВОЇ ТА САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТ У ВИТЯЖКАХ.....	8
Заняття 3. ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛИХ ВИТЯЖОК ФІЗИКО-ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ	22
Заняття 4. РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ АЛКАЛОЇДІВ У ВИТЯЖКАХ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	25
Заняття 5. РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ЯКІ ЕКСТРАГУЮТЬСЯ З ЛУЖНОГО СЕРЕДОВИЩА.....	35
Заняття 6. АНАЛІЗ ВИТЯЖКИ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРУ ФІЗИКО-ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ. ТШХ - СКРИНІНГ.....	40
Заняття 7. ВИДІЛЕННЯ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ ОТРУТ ГРИБІВ.....	42
Розділ VI . Експрес-аналіз гострих інтоксикацій лікарськими речовинами (алкалоїдами і їх синтетичними аналогами) та отрутами природного походження.....	46
Заняття 8. ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ БАРБИТУРАТАМИ.....	51
Заняття 9. ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ПОХІДНИМИ.....	57
1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ.....	57
Заняття 10. ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ПОХІДНИМИ ФЕНОТІАЗИНУ.....	62
Заняття 11. ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ОПАТАМИ ТА КАНАБІНОЇДАМИ.....	67
Розділ VII. Група отруйних речовин, які ізолюються з біологічного матеріалу неполярними (малополярними) органічними розчинниками. Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного дослідження пестицидів (отрутохімікатів).....	80
Заняття 12. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ (ФОП) ТА ІНШИХ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ СПОЛУК (ФОС) ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ. ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕСТИЦИДІВ У	

ВИТЯЖКАХ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЕНЗИМНИМИ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ.....	82
Заняття 13. ДОСЛІДЖЕННЯ ВИТЯЖОК ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ВМІСТ ФОС ХІМІЧНИМИ РЕАКЦІЯМИ.....	87
Розділ VIII. Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного аналізу групи отруйних речовин, які визначаються безпосередньо в біологічному матеріалі - карбону (II) оксид (чадний газ) та отрут які потребують особливих методів виділення (фториди, кремнійфториди, бром, йод).....	92
Заняття № 14. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАДНОГО ГАЗУ, ОСОБЛИВОСТІ ЙОГО ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДЕЙ. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ.....	92
Заняття 15. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ ОТРУТ, ЯКІ ПОТРЕБУЮТЬ ОСОБЛИВИХ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ (ФТОРИДИ, КРЕМНІЙФТОРИДИ, БРОМІДИ (БРОМ), ЙОДИДИ (ЙОД)).....	96
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	101

*Розділ V. Група отруйних речовин, які виділяються із біологічного матеріалу шляхом ізолювання полярними розчинниками (підкисленою водою, підкисленим етиловим спиртом, ацетонітрилом тощо). Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного дослідження лікарських речовин та отрут природного походження (отрут рослин, грибів, тварин, комах, водоростей)*

### **Заняття 1**

## **МЕТОДИ ІЗОЛЮВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІДКИСЛЕНИМ СПИРТОМ ЧИ ПІДКИСЛЕНОЮ ВОДОЮ**

Актуальність теми: Результати судово-токсикологічного аналізу залежать від методу ізолювання отруйних речовин із біологічних об'єктів. Тому вивчення методів виділення, очистки та концентрування є необхідними для засвоєння основних методик, які використовуються в практиці хіміко-токсикологічного аналізу.

Мета: Навчити студентів ізолювати лікарські сполуки із біологічного матеріалу підкисленою водою або підкисленим спиртом.

Навчальні цілі: В процесі лабораторного заняття навчити студентів:

1. техніки ізолювання отруйних речовин, що характеризуються різними кислотно-основними властивостями із біологічного матеріалу водою, підкисленою оксалатною кислотою чи підкисленим етанолом;
2. проводити очистку витяжок шляхом осадження білкових домішок;
3. проводити очистку та концентрування методом екстракції;
4. проводити очистку методами реекстракції та хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати:

- шляхи попадання лікарських засобів в організм та шляхи їх виведення з організму (фармакологія);
- розподіл у внутрішніх органах і тканинах (фармакологія);
- шляхи біотрансформації ліків (біологічна хімія, фармакологія),
- властивості білків, способи їх денатурації та осадження (біологічна хімія), теоретичні основи екстракції (фізична і аналітична хімія).

Однією з причин гострих отруєнь, які є поширеними серед населення – це отруєння лікарськими засобами. Найчастіше отруєння зумовлені снодійними та психотропними препаратами, одурманюючими та наркотичними сполуками.

Отруєння ліками відбувається:

- при свідомому вживанні великих кількостей фармацевтичних препаратів у дозах, які перевищують терапевтичну дозу з метою суїциду;
- в результаті помилкового або випадкового вживання (стосується дітей);
- передозування внаслідок помилкового вживання.

Про отруєння також свідчать симптоми, що виникають в результаті довготривалого вживання певного лікарського засобу в терапевтичних дозах. Причиною отруєнь теж може бути індивідуальна непереносимість лікарського засобу.

Токсичні прояви отруєнь залежать від віку, маси людини, стану здоров'я, взаємодії лікарського засобу з іншими чинниками чи препаратами. Гострі отруєння спостерігаються при вживанні алкоголю, який потенціює токсичний ефект, одночасному прийомі декількох лікарських препаратів одного з одним чи з іншими ксенобіотиками (наприклад, пестицидами, металами, наркотичними сполуками, СО тощо). Деякі випадки отруєнь є смертельними.

З метою встановлення причини отруєння в хімічні відділення бюро судово-медичної експертизи направляють внутрішні органи та біологічні рідини трупів (печінка, нирки, мозок, шлунок з кишківником, кров, сеча та ін.). При цьому необхідно проводити ізолювання отруйної сполуки із досліджуваного матеріалу. Метод ізолювання залежить від природи

сполуки, яка стала причиною смертельного отруєння. При дослідженні внутрішніх органів та тканин на наявність «лікарської отрути» у вітчизняних судово-токсикологічних лабораторіях для ізолювання використовують настоювання з водою, підкисленою оксалатною кислотою (у випадку свіжого біологічного матеріалу), чи настоювання з підкисленим спиртом (якщо на дослідження поступає гнилий зразок біологічного матеріалу).

### **Лабораторна робота студентів**

*Методика виділення отруйних речовин кислотного, нейтрального і лужного характеру водою, підкисленою оксалатною кислотою (модифікований метод А.А. Васильєвої).*

Об'єкт дослідження студенти реєструють в робочому журналі і проводять зовнішній огляд. Для експериментальних досліджень відбирають по 5 г біологічного матеріалу (печінки), який подрібнюють, переносять в хімічний стакан і заливають дистильованою водою до повного покриття твердих частинок. У пробу вносять невеликими кількостями насичений розчин оксалатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором) і настоюють 30 хв. При цьому досліджувану пробу періодично перемішують і перевіряють рН. Витяжку фільтрують через марлю, а біологічний матеріал ще двічі настоюють з водою, підкисленою оксалатною кислотою (по 15 хв). До об'єднаних витяжок додають насичений розчин сульфату амонію для осадження білків. Осаджену білкову фракцію відокремлюють від витяжки центрифугуванням або фільтруванням. Очищену кислу водну витяжку вносять у ділільну лійку і тричі екстрагують хлороформом (порціями по 10 мл). При цьому з кислого середовища екстрагуються речовини, в яких переважають кислотні властивості (екстракт №1).

Водну витяжку у ділільній лійці підлужнюють 25 % розчином аміаку до рН 8-9 і тричі екстрагують хлороформом (по 10 мл) речовини основного характеру (екстракт № 2).

Одержані хлороформні витяжки переносять в колби з пришліфованими корками і залишають для виявлення та кількісного визначення в них отруйних речовин. *Методика виділення отруйних речовин підкисленим спиртом (модифікований метод Стаса-Отто).* Подрібнений біологічний матеріал (5 г печінки) поміщають у склянку, заливають 96% етиловим спиртом, суміш підкислюють 10 % спиртовим розчином оксалатної кислоти до рН 2,5 (за універсальним індикатором) і залишають на добу при періодичному перемішуванні. Кислу спиртову витяжку відділяють, фільтруючи через змочений етанолом паперовий фільтр. Операцію настоювання повторюють 2-3 рази. Спиртові кислі витяжки об'єднують і упарюють на водяному огрівнику при 40-50°C до сиропоподібної консистенції. Сиропоподібну рідину обробляють 96 % етанолом, вносячи його краплями поки етанол не перестане осаджувати білкові домішки (викликати помутніння витяжки). Осад відфільтровують через фільтр, попередньо змочений етанолом. Фільтр промивають невеликою кількістю спирту. Фільтрат згущують на водяному огрівнику у фарфоровій чашці до консистенції сиропу і знову повторюють операцію осадження білкової фракції. Осадження повторюють до припинення випадання білків. Потім витяжку упарюють на водяному огрівнику до консистенції сиропу, залишок розчиняють у 25 – 30 мл теплої дистильованої води і мутний розчин фільтрують через невеликий паперовий фільтр, змочений водою в роздільну лійку. Водно-спиртовий розчин тричі екстрагують хлороформом порціями по 15, 10 та 10 мл. хлороформні витяжки фільтрують через фільтр, змочений хлороформом в суху колбу з написом “кисла хлороформна витяжка” (екстракт № 1). Водний залишок в роздільній лійці підлужнюють 25 % розчином аміаку до рН 8-9 за універсальним індикаторним папером і знову проводять екстракцію хлороформом, як описано вище. Об'єднані хлороформні витяжки поміщають в суху колбу з написом “лужна хлороформна витяжка” (екстракт № 2).

*Методика виділення отруйних речовин ацетоном (метод В.А. Карташова).* 5 г гомогенізованої тканини внутрішніх органів поміщають в пеніциліновий флакон ємністю 20

мл, додають 5 мл ацетону, суміш перемішують, закривають поліетиленовим корком і збовтують протягом 10 хв. Потім вміст флакону центрифугують 5 хв при 2500 об/хв. Рідину з над осаду зливають через невеликий ватний тампон у флакон ємністю 30 мл. Операцію екстрагування ацетоном повторюють ще 3 рази. До ацетонових витяжок додають 20 мл 0,5 М розчину хлоридної кислоти і 2 рази екстрагують н-гексаном (по 10 мл). Органічну фазу відділяють і не досліджують.

З водної фази речовини екстрагують діетиловим ефіром (2 рази по 10 мл). Ефірні екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр і випаровують в потоці теплого повітря. Сухий залишок досліджують на наявність речовин кислотного характеру.

Водну фазу підлужнюють до рН 11, додають 5 г хлориду натрію і екстрагують 2 рази діетиловим ефіром (по 10 мл). Ефірні екстракти об'єднують, фільтрують, розчинник випаровують, сухий залишок досліджують на речовини основного характеру.

*Експрес-метод виділення похідних фенотіазину підкисленим ацетонітрилом (метод Є.М. Саломатіна)* . 50 г подрібненого біологічного матеріалу поміщають у колбу, підкислюють 10 % розчином хлоридної кислоти до рН 2-3 і проводять екстракцію отруйних речовин послідовно 100, 50 і 50 мл ацетонітрилу протягом 30, 15 і 15 хв, поміщаючи колби в механічний струшувач. Ацетонітрильну витяжку фільтрують через зволожений дистильованою водою паперовий фільтр в роздільну лійку, що містить 500 мл 2,5 % водного розчину сульфату натрію. Вміст роздільної лійки перемішують до утворення гомогенного розчину, підкислюють 5 М розчином хлоридної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикаторним папером) і тричі екстрагують діетиловим ефіром по 100 мл. Водно-ацетонітрильний розчин, що залишився після екстракції ефіром, підлужнюють насиченим водним розчином гідроксиду натрію до рН 13 і тричі екстрагують ефіром по 100 мл. Ефірні екстракти випаровують під вакуумом у роторному випаровувачі при 40°C до об'єму 35 – 40 мл і фільтрують в мірну колбу ємністю 50 мл через паперовий фільтр, що містить 1,5-2 г безводного сульфату натрію. Колбу для випаровування і фільтр промивають 10-15 мл діетилового ефіру, який об'єднують з фільтратом у мірній колбі. Вміст колби доводять до позначки діетиловим ефіром і піддають дослідженню.

### **Питання для самостійної підготовки студентів**

1. Особливості хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу.
2. Загальні та індивідуальні методи ізолювання отруйних речовин із біологічного матеріалу в хіміко-токсикологічному аналізі.
3. Основні етапи ізолювання “лікарських” отрут за методом О.О. Васильєвої.
4. Основні етапи ізолювання “лікарських” отрут за методом Стаса-Отто.
5. Основні етапи ізолювання “лікарських” отрут за методом В.А. Карташова.
6. Основні етапи ізолювання “лікарських” отрут за методом В.П. Крамаренка.
7. Експрес-метод ізолювання похідних фенотіазину підкисленим ацетонітрилом (метод Є.М. Саломатіна).
8. Ізолювання барбітуратів підлужненою водою (метод П. Валова).
9. Ізолювання барбітуратів водою, підкисленою сульфатною кислотою (метод В.І. Попової).
10. Фактори, що впливають на ефективність ізолювання речовин з біологічного матеріалу та витяжок.
11. Методи очистки витяжок від домішок і концентрування виділених речовин. Основні вимоги до рідин, які використовуються для ізолювання з біологічного матеріалу отруйних речовин основного, нейтрального і кислотного характеру.
12. Вплив рН середовища на ступінь ізолювання з біологічного матеріалу речовин, які характеризуються різними кислотно-основними властивостями.
13. Способи очистки водної витяжки з біологічного матеріалу від білкових домішок.

14. Вплив рН середовища і електролітів на ступінь екстракції речовин кислотного і основного характеру із водних розчинів.
15. Вплив природи екстрагентів на ступінь екстракції токсичної сполуки з витяжок.
16. Які органічні сполуки максимально екстрагуються з кислого середовища, а які – з лужного?
17. На яких етапах виділення із біологічного матеріалу мають місце втрати отруйних речовин при ізолюванні підкисленою водою?

## Заняття 2

### РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ ПОХІДНИХ ПІРАЗОЛОНУ, КСАНТИНУ, БАРБІТУРОВОЇ ТА САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТ У ВИТЯЖКАХ

Актуальність теми: Фармацевтичні препарати, що відносяться до груп похідних ксантину, піразолону, барбітурової та саліцилової кислот широко застосовуються в медичній практиці, проте при передозуванні можуть викликати отруєння. Тому студентам необхідно засвоїти реакції виявлення препаратів цих хімічних груп.

Мета: Оволодіти методами виконання мікрокристалоскопічних, осадкових та кольорових реакцій, які використовуються для виявлення похідних ксантину, піразолону, барбітурової та саліцилової кислот в модельних витяжках з метою подальшого їх застосування в хіміко-токсикологічному аналізі.

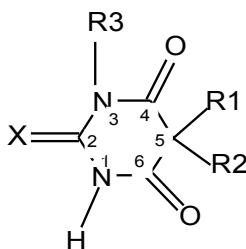
Навчальні цілі: Студенти повинні вміти виявляти лікарські препарати, які екстрагуються органічними розчинниками із витяжок з кислого середовища (саліцилова кислота, ацетилсаліцилова кислота, барбітал, барбаміл, фенobarбітал, етамінал натрію, тіопентал натрію, кофеїн, теобромін, антипірін, амідопірін, анальгін) за допомогою реакцій (осадження, кольорових та мікроскопічних).

Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати хімічні властивості досліджуваних класів сполук (органічна хімія), техніку виконання реакцій (аналітична хімія), характерні реакції на похідні саліцилової та барбітурової кислот, похідні ксантину, піразолону (органічна і фармацевтична хімія).

**З кислих витяжок біологічного матеріалу органічними розчинниками екстрагуються лікарські препарати та продукти їх метаболізму, які проявляють кислотні властивості (похідні саліцилової кислоти, похідні барбітурової кислоти, ксантину, піразолону та деякі інші).**

#### *Похідні барбітурової кислоти*

У медичній практиці використовуються барбітурати, які мають токсикологічне значення. Сама барбітурова кислота (малонілсечовина) не застосовується в медицині, проте широко використовуються її похідні. Фармакологічна дія похідних барбітурової кислоти залежить від природи радикалів, що містяться в її циклі:

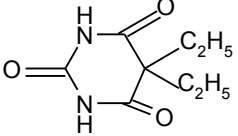
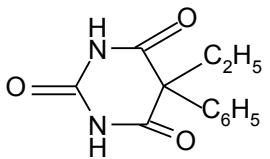
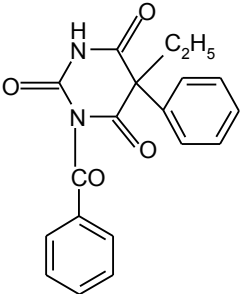


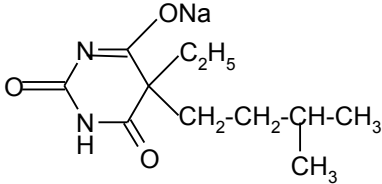
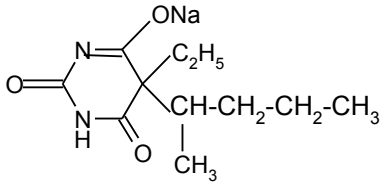
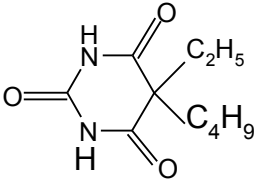
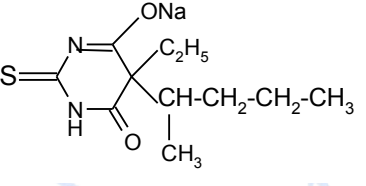
Якщо у 5 положенні містяться метильні радикали – то похідні не проявляють фармакологічної дії. Етильні радикали і радикали, що містять п'ять атомів карбону зумовлюють сильну наркотичну дію, ненасичений радикал зумовлює снодійну дію.

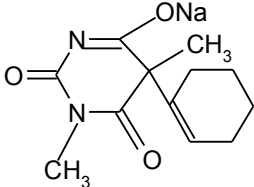


Барбітурати, які використовуються в медицині, відносяться до представників 5,5-заміщених барбітурової кислоти (*барбаміл, барбітал, фенобарбітал, бутобарбітал, етамінал*) та 1,5,5-заміщених (*гексенал, бензонал*).

Залежно від будови і дози, барбітурати проявляють заспокійливу, снодійну та протисудомну дію. За тривалістю дії їх поділяють на довго-, середньо-, короткотривалої та дуже короткої дії. Барбітурати довготривалої дії в малих дозах проявляють заспокійливу дію, у вищих – снодійну. Барбітурати середньо- та короткотривалої дії в основному проявляють снодійну дію. Найчастіше в медичній практиці застосовують такі похідні барбітурової кислоти:

Назва	Формула препарату та фармакологічна дія	Смертельна доза	Токсична концентрація в крові
<i>Довготривала дія (час піврозпаду 24-96 год)</i>			
Барбітал (веронал)	 <p>Заспокійливий і снодійний засіб. Барбітал повільно всмоктується в ШКТ і ще повільніше виводиться з організму. Його можна виявити навіть через 10 діб після вживання. Більша частина дози прийнятого барбіталу виводиться нирками у незміненому вигляді. Незначна частина дози барбіталу виділяється з сечею у вигляді метаболітів.</p>	2-4 г	5-8 мг/100 мл
Фенобарбітал (люмінал)	 <p>Снодійна, заспокійлива, протисудомна та спазмолітична дія. Метаболітами фенобарбіталу є 5-етил-5-п-гідроксифеніл-барбітурова кислота і п-оксифенобарбітал. Деяка кількість фенобарбіталу перетворюється на о-оксифенобарбітал.</p>	1,5-5 г	1,7-9 мг/100 мл
Бензонал		> 1 г	10,3 мг/100 мл

	Для лікування епілепсії, гіпербілірубінемії, гемолітичній хворобі у новонароджених. Метаболітами є бензойна кислота і фенобарбітал, який у свою чергу зазнає подальшого метаболізму.		
<i>Середньо- та короткотривала дія (час піврозпаду 14-42 год)</i>			
Барбаміл (амобарбітал, амітал)	 <p>Заспокійливий і протисудомний засіб. Виявляє снодійну дію, у вищих дозах має наркотичні властивості. До 45 % барбамілу метаболізує. Метаболітом є 5-етил-5-(3-гідрокси-3-метилбутил)-барбітурова кислота, яка виводиться з сечею.</p>	> 1,5 г	0,9мг/100 мл
Етамінал-натрій (пентобарбітал натрій, нембутал)	 <p>Снодійний засіб при безсонні. Основні продукти метаболізму : 5-(3-гідрокси-бутил)-5-етилбарбітурова кислота, метил-5-(окси-3-метил-1-пропіл)-5-барбітурова кислота. Одним з них теж є сечовина.</p>	> 1 г	0,8-1,2 мг/100 мл
Бутобарбітал	 <p>Снодійна та заспокійлива дія на організм. Метаболітом є 5-(3-гідроксибутил)-5-етилбарбітурова кислота.</p>	> 2 г	5 мг/100 мл
<i>Дуже короткої дії (час піврозпаду 3-8 год)</i>			
Тіопентал натрію	 <p>Снодійна та анальгезуюча дія. Проявляє теж слабкі властивості міорелаксанту. Застосовують для наркозу. Діє сильніше ніж гексенал.</p>	> 1 г	0,6-30 мг/100 мл

<p>Гексобарбітал (гексенал)</p>	 <p>Снодійна дія, у великих дозах – наркотичні властивості. Іноді використовують для наркозу. При метаболізмі гідроксильється циклогексильна група гексеналу. Утворений продукт гідроксильовання окислюється з утворенням 3'-кетогексобарбіталу. Цей метаболіт N-деметильється. Деяка частина гексеналу зазнає метаболізму шляхом N-деметилування при атомі нітрогену в положенні 3. В результаті цього утворюється норгексобарбітал. Певна кількість гексеналу, який потрапив в організм, метаболізується шляхом розриву циклу барбітурової кислоти.</p>	<p>&gt; 2 г</p>	<p>0,8 мг/100 мл</p>
-------------------------------------	--	-----------------	----------------------

Тривалість фармакологічної дії залежить від ступеня метаболізму, якому піддаються похідні барбітурової кислоти в організмі. Наприклад, фенобарбітал метаболізує незначно та дуже повільно. Головними шляхами метаболізму барбітуратів є:

1. окиснення радикалів у 5 положенні з утворенням гідрокси- чи карбоксипохідних барбітурової кислоти або їх деалкілування;
2. N-деметилування при атомі N3;
3. десульфування – процес типової для тіобарбітурату;
4. гідролітичний розклад барбітурового циклу в положенні N1–C 4 (проходить незначно).

З сечею барбітурати виводяться як в незміненому вигляді так і у вигляді метаболітів.

*Гостре отруєння барбітуратами* спостерігається внаслідок випадкового або навмисного прийому великих доз. *Хронічне отруєння* розвивається при застосуванні барбітуратів тривалої дії. Отруєння проявляється слабкістю, сонливістю, головокружінням, порушенням координації, можливі галюцинації, психомоторне збудження, судоми, порушення кровообігу, травлення, функції печінки і нирок.

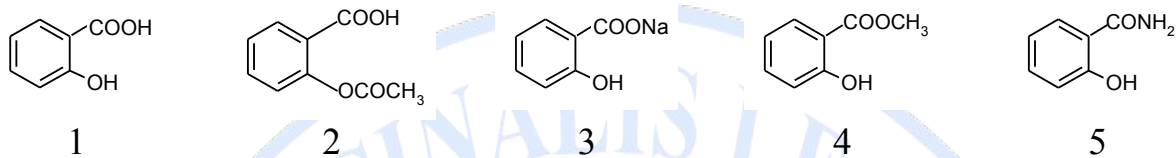
Лікування хронічного отруєння зводиться до поступового зниження дози препарату аж до повної його відміни. Одночасно проводять симптоматичне лікування.

*Саліцилову кислоту (1)* застосовують у медицині для лікування захворювань шкіри:

- у вигляді розчинів і присипок при підвищеній пітливості;
- в пастах, мазях – для лікування інфекційних захворювань шкіри (10-20% вміст саліцилової кислоти в лікарській формі характеризується кератолітичною дією, 1-2% кератопластична дія).

При потраплянні саліцилової кислоти всередину, подразнюється слизова оболонка шлунка, з'являється біль в епігастральній ділянці, нудота, іноді блювання. Тому саліцилову кислоту не вживають всередину. З цією метою застосовують її солі – саліцилати та похідні.

*Похідні саліцилової кислоти* мають протизапальну, жарознижуючу та антиангінальну фармакологічну дію. У малих дозах сильніше виражена антиангінальна та жарознижуюча дія, у високих – протизапальна. Найчастіше із групи цих препаратів використовують ацетилсаліцилову кислоту (2), натрію саліцилат (3), метилсаліцилат (4) та саліциламід (5):

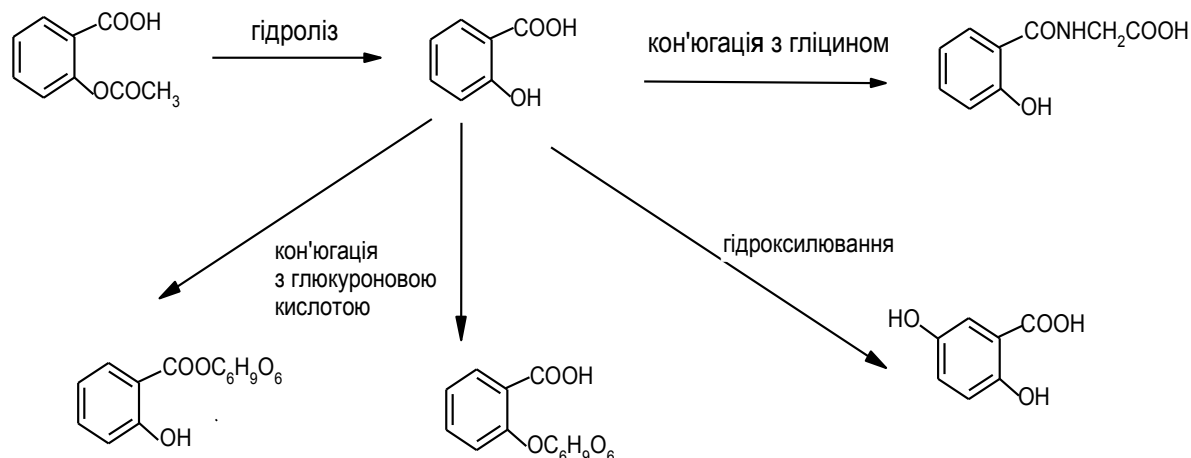


Саліцилати добре всмоктуються в шлунково-кишковому тракті. Максимальний рівень їх концентрації в крові спостерігається через 2 години після прийому. Метилсаліцилат проникає через шкіру.

У шлунково-кишковому тракті саліцилати піддаються гідролізу (метилсаліцилат) чи дисоціації (натрію саліцилат). При цьому утворюється аніон саліцилової кислоти, що зумовлює фармакологічну дію.

Похідні саліцилової кислоти виводяться в основному нирками. Період піввиведення із організму становить 3–20 годин. При цьому препарати, що призначаються в нижчих дозах, виділяються швидше, а саліцилати, які призначають у високих дозах (вище 1 г), – період піввиведення довший.

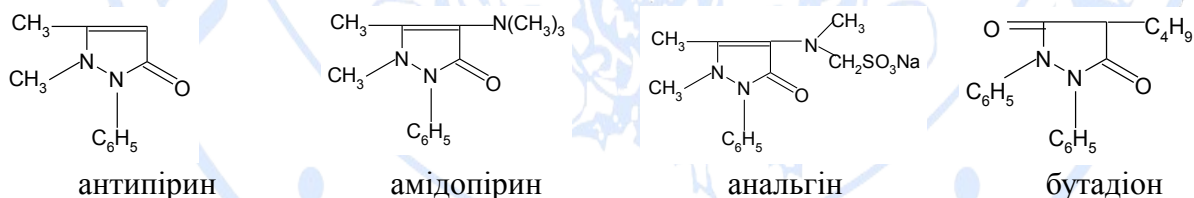
В організмі саліцилати метаболізують. Механізм метаболізму можна розглянути на прикладі ацетилсаліцилової кислоти:



Оскільки саліцилати широко доступні, вони можуть стати причиною гострих отруєнь, особливо у дітей (внаслідок необережного застосування мазей, які містять ці речовини).

Смертельна доза всіх похідних саліцилової кислоти 0,2-0,5 г/кг. Важкість отруєнь залежить від концентрації саліцилової кислоти у крові. Токсичні ефекти з'являються при концентрації 30 мг/100 мл крові. Основними проявами отруєнь саліцилатами є порушення дихання та порушення кислотно-основного стану (КОС).

*Похідні піразолону.* Токсичний вплив на організм при передозуванні проявляють і похідні піразолону (антипірін, амідопірін, анальгін, бутадіон):



Їх відносять до групи ненаркотичних анальгетиків, які проявляють анальгетичну, антипіретичну та протизапальну дію. На відміну від наркотичних анальгетиків, вони не викликають явищ лікарської залежності, наркоманії, депресії дихання та не впливають на

активність центральної нервової системи (ЦНС). Їх широко використовують при болях голови, невралгіях, запальних процесах.

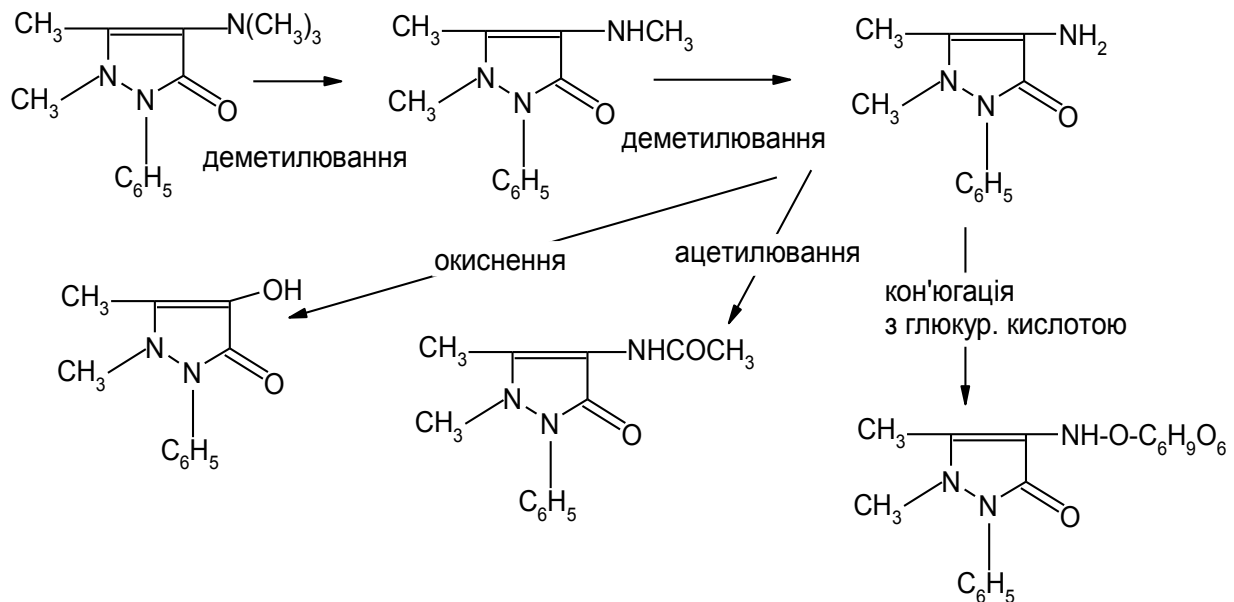
Інтوکсикація препаратами, обумовлена їх передозуванням, підвищеною чутливістю до зазначених препаратів, неправильними умовами зберігання. При тривалому застосуванні цих препаратів виникає небезпека хронічного отруєння. Анальгін при тривалому впливі на організм викликає анемію, має нефротоксичну й у меншій мірі - гепатотоксичну дію.

Летальний результат може наступити не тільки від прийому смертельних доз того чи іншого препарату, але і внаслідок агранулоцитозу. Летальна доза похідних піразолону 5-15 г.

**Гостре отруєння** проявляється запамороченням, шумом у вухах, ціанозом, болями в животі, нудотою і блюванням, зниженим АТ і PS, судомами, порушенням психіки. При важких отруєннях на тлі тривалого прийому похідних піразолону можливі такі прояви як шкірні висипання, виразки на слизових оболонках порожнини рота, глотки, шлунка, лихоманка, ознаки токсичної гепатопатії і нефропатії, агранулоцитоз.

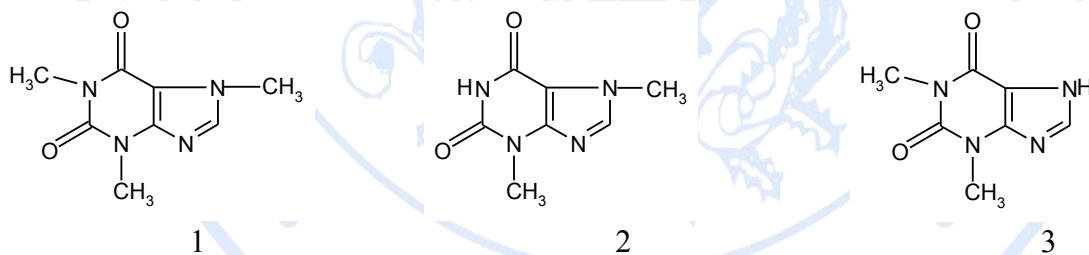
В організмі похідні піразолону метаболізують, виводяться в незміненому вигляді і у вигляді метаболітів з сечею.

На рисунку наведена схема метаболізму амідопіріну:



#### Похідні ксантину.

До похідних ксантину (пурину), які застосовуються в медицині, належать алкалоїди: кофеїн (1), теобромін (2) і теофілін (3), які екстрагуються як з кислого так і з лужного середовища органічними розчинниками:



Джерелом кофеїну є зерна кави (1-2 %), листя чаю (1-4%), горішки коли (2,5-5%); джерелом теоброміну – плоди какао та листки чаю, а теофіліну – листки чаю. Також їх отримують синтетично.

Кофеїн є аналептиком, який посилює чутливість допамінових рецепторів та збуджує вегетативну нервову систему. В медичній практиці кофеїн використовується при фізичному та психічному виснаженні, гіпотонії, для лікування гострих отруєнь алкоголем та атропіном. Максимальна доза кофеїну, що приймається per os 1,5 г, підшкірно – 500 мг. Смертельна доза кофеїну 10-12 г і вище.

Теофілін гальмує фосфодіестеразу. Проявляє сильну спазмолітичну дію на гладку мускулатуру кровоносних судин та дихальних шляхів.

Теобромін застосовують при спазмах судин мозку, хронічній недостатності кровообігу. Він стимулює серцеву діяльність, розширює судини серця і мускулатуру бронхів, підвищує діурез. Слабше збуджує центральну нервову систему, ніж кофеїн.

Кофеїн, теобромін та теофілін швидко всмоктуються в шлунково-кишковому тракті. Максимальна концентрація в крові спостерігається через 1 год.

Розподіл цих алкалоїдів в органах проходить відповідно до їх розчинності. Вони не акумулюються в організмі, період піввиведення 2,5-4,5 год.

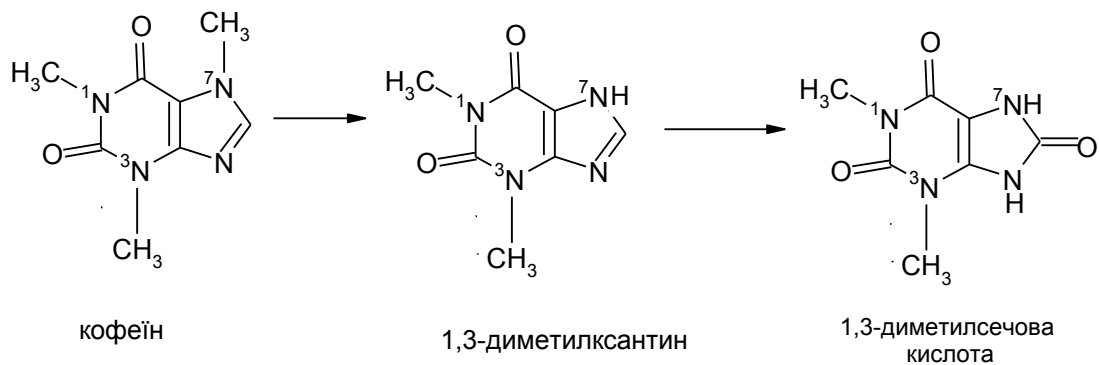
Отруєння кофеїном зустрічаються не часто. Найчастіше виникають в результаті передозування кави та чаю. Гострі отруєння кофеїном супроводжуються збудженням психомоторної системи. За токсичністю кофеїн слабший від теофіліну, але сильніший від теоброміну.

Теофілін більш токсичний, ніж кофеїн і теобромін. Після прийому великих доз теофіліну, порушується діяльність ЦНС і серцево-судинної системи (ССС). Головним симптомом отруєння теофіліном є різке зниження артеріального тиску (АТ). Особливо небезпечний у хворих з підвищеною чутливістю.

Представники цієї групи препаратів швидко метаболізують в організмі і продукти метаболізму виводяться з сечею.

Близько 15 % прийнятої дози кофеїну розкладається в організмі шляхом N-деметилування і окислення протягом 1 години.

*Схема метаболізму кофеїну:*



Метаболітами теоброміну є 3-метилксантин, 7-метилксантин і 7-метилсечова кислота. При метаболізмі теофіліну утворюється 1,3-диметилсечова кислота (близько 50 % дози), 1-метил-сечова кислота (близько 20 % дози) і сліди 3-метил-сечової кислоти.

### **Лабораторна робота студентів**

#### **Виявлення похідних барбітурової кислоти за допомогою мікрористалоскопічних реакцій**

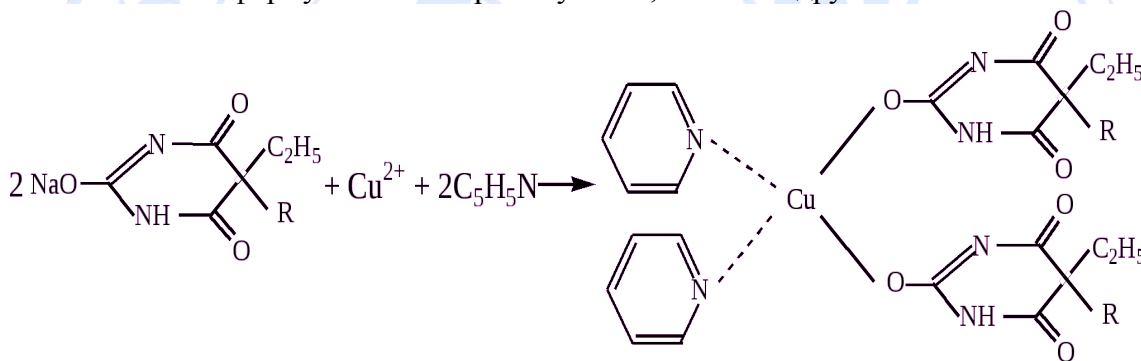
а) *Реакція з концентрованою сульфатною кислотою.* На предметне скло наносять декілька крапель модельної витяжки, що містить похідні барбітурової кислоти і випаровують досуха при кімнатній температурі. Сухий залишок розчиняють в 1 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Через 3-5 хв. поряд наносять краплю води. Краплі з'єднують. Через 20 хв. з'являються кристалічні осадки. Форму кристалів спостерігають під мікроскопом.

б) *Реакція з хлорцинкйодом.* На предметне скло наносять 2-3 краплі хлороформного розчину модельної витяжки і випаровують досуха. До сухого залишку додають 1 краплю розчину хлорцинкйоду. Через 15 хв. спостерігають форму кристалів.

в) *Реакція з сумішшю розчинів хлориду феруму (III) і йодиду калію.* На предметне скло наносять 2-3 краплі хлороформної модельної витяжки і випарюють досуха. До сухого залишку додають краплю реактиву. Через 10-15 хв під мікроскопом спостерігають за формою утворених кристалів.

г) *Реакція з дийодокупратом калію в розчині йоду.* До сухого залишку, одержаного після випаровування хлороформної модельної витяжки додають 2 краплі реактиву. Через 10-15 хв. спостерігають за формою утворених кристалів.

д) *Реакція з солями купруму(II) і піридином.* На предметне скло наносять декілька крапель модельної хлороформної витяжки і випаровують насуху. До сухого залишку додають 2 краплі 10 % розчину аміаку і 1-2 краплі реактиву (розчин сульфату купруму в аміаку і піридині). При наявності *барбіталу* через 10-15 хв утворюються фіолетові кристали, які мають форму прямокутника, друз або зірочок:



Під впливом піридину відбуваються енолізація і часткова іонізація барбітуратів. Піридин з іонами купруму утворює позитивно заряджений комплексний іон  $[Cu(Py)]^{2+}$ . Під час взаємодії комплексу піридину і іонів купруму з іонізованими молекулами барбітуратів утворюється внутрішньоконплексна сполука. Мінеральні кислоти розкладають цю сполуку.

### **Виявлення похідних барбітурової кислоти кольоровими реакціями**

Барбітурати утворюють кольорові продукти реакцій з солями кобальту (II) в лужному середовищі. Характер забарвлення залежить від природи основи, що створювала лужне середовище. Для виявлення барбітуратів Паррі (1924) запропонував реакцію, яка базується на взаємодії цих речовин з солями кобальту і аміаком. Пізніше інші дослідники замінили аміак ізопропіламіном. Цвіккер (1931 р.) встановив, що при додаванні до барбітуратів кобальт хлориду і барій гідроксиду утворюється забарвлена сполука. В 1932 р. Цвіккер замість барій гідроксиду застосував калій гідроксид. Інші дослідники замість барій гідроксиду застосували літій гідроксид.

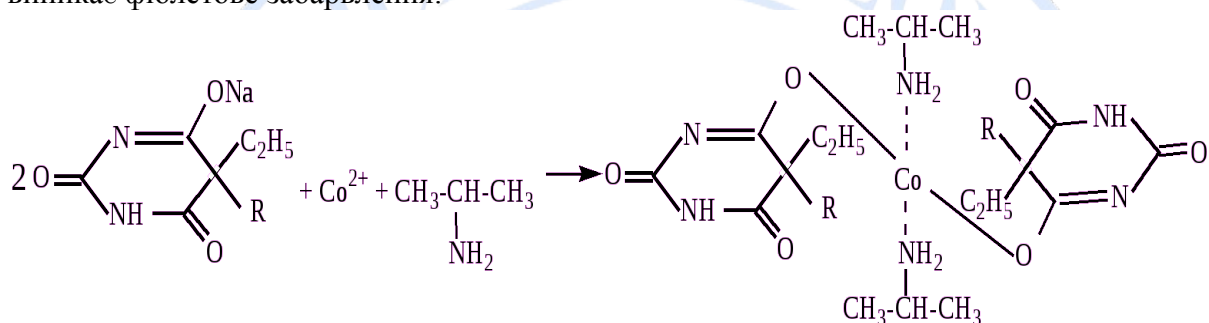
Однією із попередніх проб виявлення барбітуратів є *реакція з розчинами ацетату кобальту та гідроксиду літію*. Для цього до 1 мл хлороформного розчину сухого залишку вносять по 2-3 краплі свіжоприготовлених метанольних розчинів ацетату кобальту (1%) та гідроксиду літію (1%). Вміст пробірки збовтують після внесення кожного із реактивів. Поява голубого забарвлення свідчить про наявність барбітуратів.

Якщо реакція дала позитивний результат то проводять серію наступних реакцій.

а) *реакція із спиртовими розчинами ацетату кобальту та гідроксиду калію.* 0,5 мл хлороформного розчину сухого залишку випаровують досуха, сухий залишок розчиняють в 0,2—0,5 мл абсолютного етилового спирту. Після чого послідовно вносять по 2 краплі 1 %-го розчину ацетату кобальту в абсолютному етиловому спирті та 2 краплі 1 %-го розчину

гідроксиду калію в абсолютному етиловому спирті. При наявності барбітуратів з'являється рожеве або червоне забарвлення.

б) *Реакція з ацетатом кобальту та розчином ізопропіламіну.* До 0,5 мл хлороформної витяжки додають 0,3 мл 1 % розчину ацетату кобальту в абсолютному етанолі і 1 мл 5 % розчину ізопропіламіну в етиловому спирті. При наявності похідних барбітурової кислоти виникає фіолетове забарвлення:



в) *Мурексидна проба.* 0,5 мл хлороформної витяжки вносять у фарфорову чашку і випаровують до сухого залишку. Вносять 3 краплі 3 % розчину пероксиду водню і 3 краплі реактиву, який містить сіль Мора і хлорид амонію. Вміст чашки випаровують, сухий залишок нагрівають до появи білих парів. Після охолодження додають 3 краплі 6 н. розчину аміаку. При наявності деяких барбітуратів і тіобарбітуратів з'являється рожеве забарвлення.

Мурексидна реакція характерна для барбамілу, барбіталу, фенобарбіталу, етамінал-натрію та тіопенталу. Не дають цієї реакції гексенал, гексобарбітал, циклобарбітал, бензонал, бутобарбітал.

Результати мікроскопічних та кольорових реакцій виявлення деяких барбітуратів наведені в таблиці:

Реагент	Препарат	Колір
Ізопропіламін і солі кобальту	Барбаміл, барбітал, фенобарбітал, бутобарбітал, етамінал натрію, бензонал, гексенал	Фіолетове забарвлення.
Солі кобальту і луги	Барбаміл, барбітал, фенобарбітал, бутобарбітал, етамінал натрію, гексенал.	Рожеве або червоне забарвлення
	Бензонал	Синьо-фіолетове забарвлення
Мурексидна реакція	Барбаміл, барбітал, фенобарбітал, етамінал натрію, тіопентал;	Позитивна
	Гексенал, гексобарбітал, циклобарбітал	Негативна
Родамін 6Ж	Барбаміл, барбітал, етамінал натрію, гексенал	Оранжеве забарвлення
Сульфатна кислота *	Барбаміл,	Форма пластинок або призм, згрупованих у вигляді сфероїдів;
	Барбітал	Безбарвні прозорі прямокутні призми;
	Фенобарбітал	Безбарвні голчасті кристали, зростки з них, сфероїди;
	Бутобарбітал	Кристали у вигляді прозорих призм і зростків з них;



	Етамінал натрію	Зростки з призматичних кристалів;
	Гексенал	Зростки голчастих кристалів
Хлорцинкйод	Барбаміл	Темно-червоні або золотисті прямокутні пластинки чи зростки з них;
	Барбітал	Темно-червоні, фіолетові або сірувато-рожеві прямокутні пластинки;
	Бутобарбітал	Кристали ромбічної форми або зростки з них, які мають темно-коричнє забарвлення;
	Етамінал натрію	Коричневий або оранжево-коричневий кристалічний осад (призми або зростки з них).
Суміш розчинів феруму (III) хлориду і калій йодиду	Барбаміл, барбітал, фенобарбітал, бутобарбітал, етамінал натрію	Кристалічний осад (призми або зростки з них) оранжево-коричневого або коричневого кольору.
Калій дийодокупрат в розчині йоду	Барбаміл, барбітал, етамінал натрію	Кристали призматичної форми або зростки з них;
	Бутобарбітал	Осад, часточки якого за формою нагадують чечевицю
Солі купруму і піридин	Барбітал	Фіолетові кристали, які мають форму прямокутників, друз або зірочок;
	Бутобарбітал	Фіолетові зростки у вигляді сфероїдів
Спиртовий розчин калію йодиду	Барбітал, бутобарбітал, гексенал, етамінал натрію	Призматичні кристали фіолетово-коричневого кольору

\* Деякі автори зазначають, що більшість барбітуратів можуть знаходитися в кількох поліморфних модифікаціях. Тому при ідентифікації барбітуратів за формою кристалів слід враховувати можливість появи кількох кристалічних форм однієї й тієї самої речовини.

#### Реакції осадження

Деякі крапель модельної витяжки наносять на предметне скло і при кімнатній температурі випаровують досуха. Сухий залишок на предметному склі розчиняють в 1-2 краплях 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Поряд з цим розчином на предметне скло наносять краплю одного із реактивів групового осадження алкалоїдів. Ці краплі з'єднують між собою при допомозі скляної палички. Поява осаду або муті вказує на наявність в досліджуваному розчині алкалоїдів або інших азотистих органічних речовин.

Для вивчення реакцій осадження студенти використовують реактиви, які утворюють з алкалоїдами прості солі: танін, пікринову, пікролонову кислоти і реактиви, які утворюють з алкалоїдами комплексні солі, які в свою чергу розподіляються на дві підгрупи:

а) реактиви, які вміщують в своєму складі металоїди: розчин йоду у йодиді калію, фосфорно-молібденову (реактив Зонненшейна), фосфорно-вольфрамову (реактив Шейблера) кислоти;

б) реактиви, які вміщують в своєму складі метали: реактив Марме, реактив Майєра, реактив Драгендорфа.

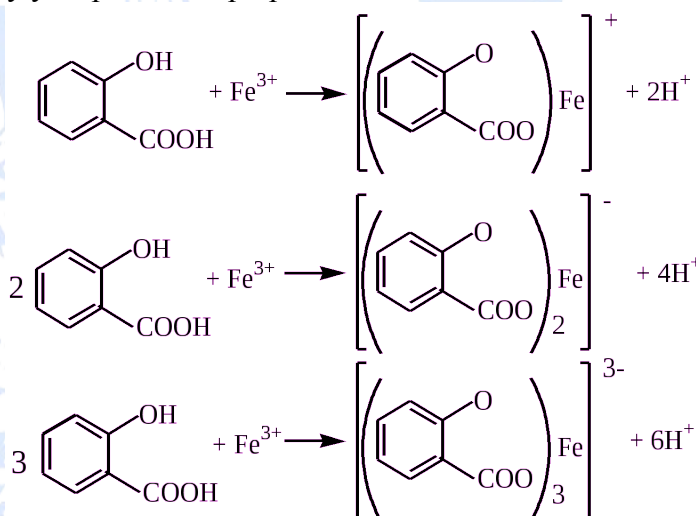
## Виявлення похідних саліцилової кислоти

### Виявлення саліцилової кислоти.

а) *Реакція з хлоридом феруму(III).* 5-10 крапель хлороформної витяжки, яка містить саліцилову кислоту, вносять у фарфорову чашку і випаровують досуха. До сухого залишку вносять краплю 1 % свіжо приготовленого розчину хлориду феруму (III). Виникає синьо-фіолетове забарвлення, яке не зникає при додаванні 2-3 крапель етанолу.

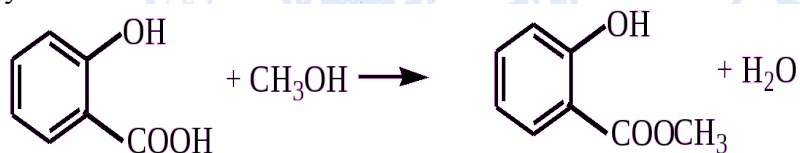
Цю реакцію також можна проводити на фільтрувальному папері. Для цього на фільтрувальний папір наносять краплю 1 % свіжовиготовленого розчину хлориду феруму (III) і підсушують. На те саме місце наносять 1-2 краплі хлороформної витяжки, яка містить саліцилову кислоту. При наявності цієї кислоти у витяжці з'являється синьо-фіолетова пляма.

Склад і забарвлення комплексів залежить від рН середовища. При рН 1,8-2,5 утворюється моносаліцилатний комплекс, який має синьо-фіолетове забарвлення. При рН = 4-8 утворюється дисаліцилатний комплекс червоно-бурого кольору. Трисаліцилатний комплекс жовтого кольору утворюється при рН 8-11:



б) *Реакція утворення трибромфенолу.* Кілька крапель хлороформної витяжки, яка містить саліцилову кислоту, вносять у фарфорову чашку і випаровують досуха. До сухого залишку додають 5-6 крапель дистильованої води, перемішують та вносять 2-3 краплі розчину бромної води. Утворюється білий осад трибромфенолу.

в) *Реакція утворення метилсаліцилату.* 0,2-0,3 мл хлороформної витяжки вносять у пробірку і випаровують органічний розчинник на водяному огрівнику (при 50-60 °С). До сухого залишку додають 2 краплі метанолу та 2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Вміст пробірки нагрівають. При наявності саліцилової кислоти з'являється характерний запах метилсаліцилату.



### Виявлення ацетилсаліцилової кислоти :

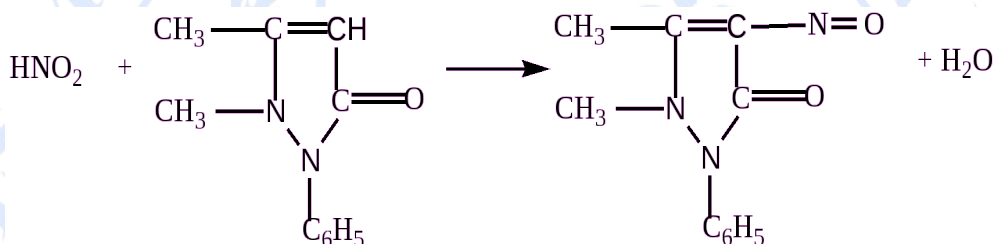
*Реакція з розчином гідроксиду натрію.* Сухий залишок, одержаний після випаровування кількох крапель хлороформної витяжки нагрівають з 10 % розчином гідроксиду натрію. При цьому утворюється динатрійсаліцилат та ацетат натрію. Вміст

пробірки охолоджують і підкислюють 2 н. розчином сульфатної кислоти. Випадає осад саліцилової кислоти. Коли до утвореної суміші додати етиловий спирт і нагріти, то виникає характерний запах етилсаліцилату (подібний до метилсаліцилату).

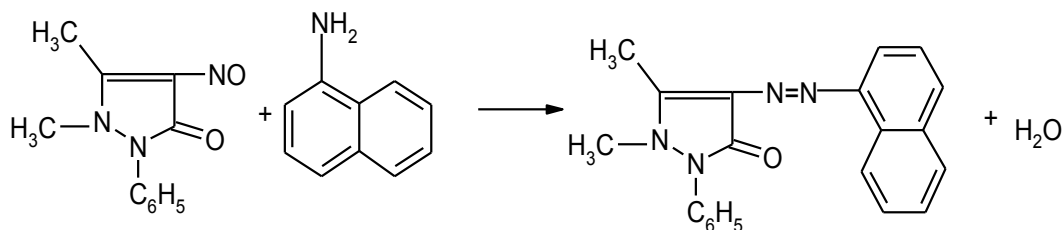
### Виявлення похідних піразолону

#### Виявлення антипірину

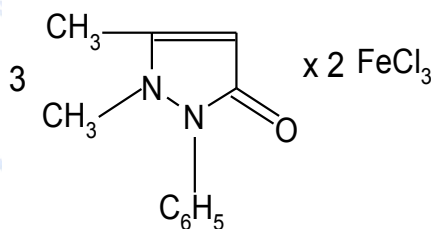
а) Реакція утворення нітросантипірину. У пробірку вносять 3 мл хлороформної витяжки і на водяному огрівнику випарюють досуха. Сухий залишок розчиняють у 3-5 краплях води, вносять 2-4 краплі 10 % розчину сульфатної кислоти та 2-3 краплі насиченого розчину нітриту натрію. При наявності антипірину виникає зелене забарвлення:



б) Реакція утворення азобарвника. У пробірку вносять 0,5 мл досліджуваної хлороформної витяжки та випаровують хлороформ на водяному огрівнику. Сухий залишок розчиняють у 2 краплях води, та вносять по краплі льодяної ацетатної кислоти та 5 % розчину нітриту калію. Суміш залишають на 5 хв, періодично збовтуючи. Потім у пробірку вносять невелику кількість азиду натрію. Після того, як припиниться виділення бульбашок газу, у пробірку вносять 3-4 кристалики  $\alpha$ -нафтиламіну. Вміст пробірки нагрівають на киплячому водяному огрівнику протягом 1-2 хв. Залежно від кількості антипірину виникає темно- або світло-фіолетове забарвлення. Ця реакція є специфічною для виявлення антипірину. За допомогою описаної реакції можна відрізнити антипирин від амідопірину, який не дає цієї реакції.



в) Реакція з хлоридом феруму (III). У фарфорову чашку вносять 5-6 крапель хлороформної витяжки, яку випарюють досуха. До сухого залишку вносять краплю 5 % розчину хлориду феруму (III). При наявності антипірину з'являється криваво-червоне або оранжево-червоне забарвлення:

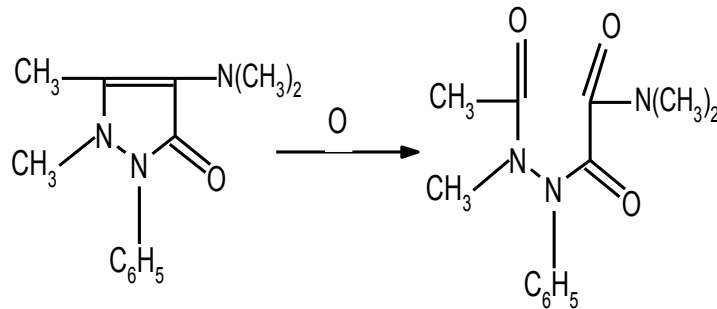


#### Виявлення амідопірину

а) Реакції з реактивами групового осадження алкалоїдів. Амідопірин з реактивами групового осадження алкалоїдів (таніном, пікриною кислотою, реактивом Майєра та ін.) утворює осад.

б) Реакція з хлоридом феруму (III) При наявності амідопірину виникає фіолетове забарвлення, яке зникає при надлишку реактиву. (Див. виконання реакції на антипірін).

При дії окисників на амідопірин утворюється ряд забарвлених проміжних продуктів. При подальшому окисненні цих продуктів утворюється безбарвна речовина - діоксіамідопірин:



Проміжні продукти окислення амідопірину мають синє або синьо-фіолетове забарвлення. Забарвлення виникає при взаємодії амідопірину з розчинами ферум (III) хлориду, нітратної і нітритної кислот, аргентум нітрата, плюмбум (IV) оксидом та іншими окисниками.

в) Реакція з нітратом аргентуму. У пробірку вносять 0,5 мл хлороформного розчину витяжки та випаровують хлороформ на водяному огрівнику. До сухого залишку вносять по 4-5 крапель води, 1% розчину аргентуму нітрата і нагрівають на водяному огрівнику протягом 5 хв. Поява фіолетового забарвлення свідчить про наявність амідопірину в розчині. При великих кількостях амідопірину може випадати чорний осад металічного срібла.

г) Реакція з нітритом натрію. (Див. виконання реакції утворення нітросо антипірину). При наявності амідопірину з'являється фіолетове забарвлення, яке зникає від надлишку реактиву.

#### Виявлення анальгін

а) Лігнінова проба. На газетний папір наносять в одну точку 2-3 краплі досліджуваної хлороформної витяжки. При наявності анальгін спостерігається поява характерного жовтого забарвлення, яке посилюється при обробці плями розведеним розчином хлоридної кислоти.

б) Реакція з хлоридом феруму (III). (Див. виконання реакції на антипірін). Поява червоно-фіолетового забарвлення свідчить про наявність в пробі анальгін.

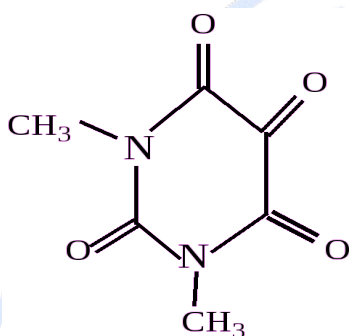
в) Реакція з реактивом Несслера. У пробірку вносять 0,2 мл хлороформної витяжки і випарюють розчинник досуха. До сухого залишку додають по 1 краплі води та реактиву Несслера. При нагріванні випадає оранжевий осад.

### **Виявлення похідних ксантину (пурини)**

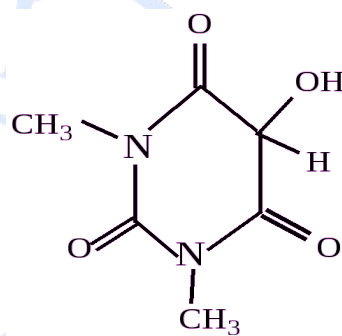
Для виявлення окремих похідних ксантину (пуринів) використовують кольорові реакції та реакції осадження.

а) Мурексидна реакція (дають усі сполуки, що належать до похідних ксантину). Мурексид - амонійна сіль пурпурової кислоти, яка утворюється при окисненні похідних ксантину і додаванні аміаку до цих похідних. Окислювачами похідних ксантину можуть бути хлорна вода, бромна вода, пероксид водню, калій хлорат  $KClO_3$  та інші сполуки. При дії

окисників на похідні пурину утворюється алоксантин або суміш алоксану і діалурової кислоти:

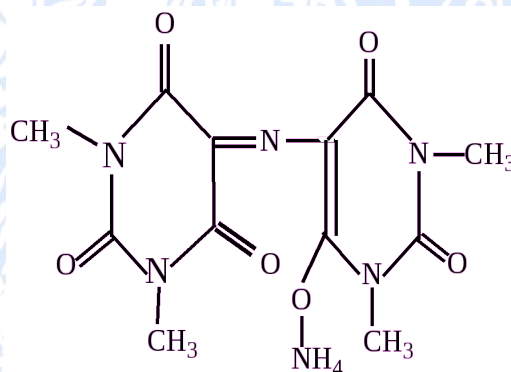


1,3-димелалоксан



1,3-диметилдіалурова кислота

При дії аміаку на алоксан і діалурову кислоту утворюється мурексид:



*Методика виконання:*

1) у фарфорову чашку вносять 0,5 мл хлороформного розчину витяжки та випаровують розчинник до суха. До сухого залишку вносять по 0,5 мл бромної води та 2-3 краплі хлоридної кислоти. Рідину випаровують на водяному огрівнику досуха. До залишку вносять краплю 25 % розчину аміаку. Поява пурпурно-фіолетового забарвлення свідчить про наявність в пробі похідних ксантину.

2) до сухого залишку, одержаного після випарювання хлороформної витяжки, додають 2-3 краплі концентрованої хлоридної кислоти і кілька кристаликів калій хлорату ( $KClO_3$ ). Суміш перемішують і випаровують на водяному огрівнику досуха. До сухого залишку додають краплю 2 н. розчину аміаку. При наявності кофеїну, теоброміну і теофіліну або інших похідних ксантину в пробі з'являється пурпурове або фіолетове забарвлення.

б) *Реакції з реактивами групового осадження алкалоїдів.* Кофеїн, теобромін та теофілін утворюють осад з реактивами групового осадження алкалоїдів: Драгендорфа, Зонненшейна, Шейблера, таніном, пікриною кислотою, реактивом Майера та ін. Для цього на предметне скельце чи у заглиблення фарфорової пластинки наносять по 2-3 краплі хлороформного розчину витяжки, розчинник випаровують досуха, до сухих залишків прибавляють по 1-2 краплі відповідного реагенту. Спостерігають за кольором утворених осадів.

в) *Реакція з реактивом Несслера.* Після випарювання 0,5 мл хлороформного розчину сухого залишку, в пробу додають 0,2 мл води та 0,1 мл реактиву Несслера і нагрівають пробірку 1-2 хв. на киплячому водяному огрівнику. Утворюється червоно-бурий осад (теобромін за цих умов дає слабо-коричневе забарвлення).

### Питання для самопідготовки студентів

1. Групи лікарських препаратів, що екстрагуються органічними розчинниками із кислих витяжок, одержаних при настоюванні біологічного матеріалу підкисленою водою, або підкисленим спиртом?
2. Методи ізолювання барбітуратів із біологічного матеріалу. Характеристика методик В.І.Попової та П. Валова.
3. Основні напрямки метаболізму органічних сполук в організмі людей.
4. Реакції I фази біотрансформації.
5. Реакції II фази біотрансформації.
6. Фізико-хімічні властивості, застосування, токсична дія, метаболізм барбітуратів.
7. Фізико-хімічні властивості, застосування, токсична дія, метаболізм похідних саліцилової кислоти.
8. Фізико-хімічні властивості, застосування, токсична дія, метаболізм похідних пурину (кофеїн, теобромін, теофілін).
9. Фізико-хімічні властивості, застосування, токсична дія, метаболізм похідних піразолону (антипін, анальгін, амідопін).
10. Хімічні методи дослідження “лікарських” отрут. Переваги та недоліки хімічних реакцій – осадження, кольорових, мікрокристалоскопічних.
11. Загальні реакції, які застосовують для виявлення похідних ксантину (пурину), виділених з біологічного матеріалу.
12. Загальні реакції виявлення барбітуратів.
13. Характерні реакції виявлення похідних барбітурової кислоти (барбіталу, барбамілу, фенобарбіталу та етаміналу натрію).
14. З якою метою і як виконується мурексидна реакція в хіміко-токсикологічному аналізі?
15. Як виявити саліцилову кислоту у витяжках із біологічного матеріалу? Чому забарвлення саліцилатів феруму залежить від рН середовища?
16. Яке значення надається реакціям осадження в хіміко-токсикологічному аналізі у випадку позитивних та негативних результатів?

### Заняття 3

#### ДОСЛІДЖЕННЯ КИСЛИХ ВИТЯЖОК ФІЗИКО-ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Актуальність теми: Виявлення отруйних речовин у модельних витяжках за допомогою фізико-хімічних методів аналізу (хроматографії в ТШС та УФ-спектроскопії) застосовується в практичній роботі хіміко-токсикологічних лабораторій для підтвердження ідентичності отруйних речовин.

Мета: Навчити студентів способів ідентифікації отруйних речовин за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій, методів хроматографії в тонкому шарі сорбенту і УФ-спектроскопії.

Навчальні цілі: Студенти повинні вміти:

- ідентифікувати речовини методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту;
- ідентифікувати речовини методом УФ-спектроскопії.

Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати теоретичні основи і техніку виконання хроматографії в тонкому шарі сорбенту (фізична і аналітична хімія), теоретичні основи методу і етапи спектрального аналізу (фізика, органічна хімія, аналітична і фармацевтична хімія).

Для ідентифікації сполук в хіміко-токсикологічному аналізі застосовують хроматографічні та спектрофотометричні методи дослідження, зокрема хроматографії в тонких шарах сорбенту та УФ-спектрофотоскопії.

При проведенні УФ-спектрального аналізу часто характер спектрів залежить від рН середовища. При цьому зміна рН не впливає на положення максимумів поглинання для ряду

сполук. Проте є велика група речовин, в УФ-спектрах яких максимуми поглинання зміщуються в довгохвильову (батохромне зміщення) або короткохвильову (гіпсохромне зміщення) ділянку спектру внаслідок іонізації молекули при зміні рН середовища. Як приклад цього можуть бути похідні барбітурової кислоти.

Як відомо, для барбітуратів характерна імідо-імідольна таутомерія, в залежності від рН середовища:



Для більшості похідних барбітурової кислоти в діапазоні довжин хвиль 220-360 нм на УФ-спектрах відсутні максимуми поглинання при рН 1-3 (імідна форма). У лужному середовищі, внаслідок іонізації молекули, імідна форма барбітуратів переходить в імідольну форму і при цьому обидві таутомерні форми здатні до специфічної абсорбції.

При рН 10 моноімідольна таутомерна форма барбітуратів характеризується максимумом поглинання при 239-240 нм. При додаванні до розчину барбітурату з рН 10 декількох крапель розчину гідроксиду натрію і досягнення рН 13 моноімідольна форма переходить в діімідольну. При цьому на УФ-спектрі поглинання спостерігається батохромне зміщення максимуму з 239-240 нм до 255 нм.

Здатність барбітуратів до імідо-імідольної таутомерії також використовується при кількісному визначенні цих сполук спектрофотометричним методом в біологічному матеріалі.

### Лабораторна робота студентів

#### 1. Виявлення досліджуваних речовин методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту

Хроматографічні камери заповнюють системами розчинників таким чином, щоб товщина шару становила 1 см. Для досліджень використовують одну із систем розчинників: етилацетат-ацетон-25% аміак (22,5:0,5:2,5), хлороформ-ацетон-25 % аміак (20 : 20 : 2) чи хлороформ-ацетон (9:1). Камери закривають прищліфованими кришками і залишають на 30 хв для насичення простору парами системи розчинників.

На хроматографічних пластинках відмічають лінію старту (1-1,5 см від нижнього краю) і лінію фронту розчинника (8 -10 см вище лінії старту).

За допомогою каплярів на лінію старту наносять в три точки по декілька крапель витяжки із біологічного матеріалу, що містить сполуки, які екстрагуються із кислого середовища (екстракт №1). Точки наносять на відстані 2 см одна від одної та від краю пластинки. Плями нанесених розчинів підсушують на повітрі.

На другу пластинку аналогічним чином наносять у вигляді плям розчини чистих досліджуваних сполук. Пластинки поміщають у камери для хроматографування і залишають до підняття системи розчинників до лінії фронту. Після чого пластинки виймають та висушують на повітрі.

На першій пластинці закривають дві смуги. Першу смугу послідовно проявляють 5 % розчином  $\text{HgSO}_4$  та 0,1 % розчином дифенілкарбазону в хлороформі (при наявності

похідних барбітурової кислоти з'являються плями, забарвлені в синьо-фіолетовий або червоно-фіолетовий колір).

Другу смугу проявляють 10 % розчином  $\text{FeCl}_3$ , закривши першу та третю. (При наявності похідних піразолону з'являються синьо-фіолетові або червоно-фіолетові плями (стійка червона пляма – антипірін; фіолетова, що зникає – амідопірін; рожева – анальгін; синьо-фіолетова – саліцилова кислота).

Третю смугу послідовно проявляють реактивом Драгендорфа, а потім 10 % розчином сульфатної кислоти. (При наявності речовин слабоосновного характеру (кофеїн, амідопірін, антипірін, діазепам, нітразепам, стрихнін, бруцин) з'являються оранжево-бурі або жовто-оранжеві плями).

Аналогічними реагентами проявляють пластинки, що містили розчини «свідків».

Одержані величини  $R_f$  порівнюють із величинами  $R_f$  свідків і роблять висновок про наявність відповідних речовин.

## **2. Виявлення досліджуваних речовин методом УФ-спектрофотометрії**

Для виявлення сполук, що екстрагуються з кислого середовища, методом УФ-спектроскопії модельну хлороформну витяжку ділять на 2 частини і випаровують досуха.

Методом УФ-спектрофотометрії можна виявити представники барбітуратів.

*Виявлення похідних барбітурової кислоти.* Сухий залишок № 1 розчиняють у 5 мл води. Одержаний розчин фільтрують через паперовий фільтр. До фільтрату додають 1 краплю 2 н. розчину аміаку (рН 10) і знімають УФ-спектр поглинання в діапазоні довжин хвиль 210–360 нм.

Барбітал, барбаміл, фенобарбітал, етамінал натрію, циклобарбітал, бутобарбітал (представники 5,5- заміщених барбітурової кислоти) та гексенал і гексобарбітал (1,5,5- заміщені) характеризуються максимумом вбирання при довжині хвилі близько 240 нм. Похідні тіобарбітурової кислоти мають два максимуми (при 255 та 305 нм)

Після цього в цей же розчин вносять 1-2 краплі 2 н. розчину сульфатної кислоти (рН 2) і знімають УФ-спектр в тому ж діапазоні довжин хвиль. Максимум поглинання 5,5- та 1,5,5-заміщених барбітурової кислоти зникає. Для тіобарбітуратів при цих умовах максимуми поглинання зміщуються до 239 та 290 нм.

В досліджуваний розчин, що міститься в кюветі, вносять 1-2 краплі 4 н. розчину гідроксиду натрію (рН 13) і знімають УФ-спектр. Максимум світлопоглинання при 255 нм спостерігається у 5,5-заміщених барбітурової кислоти, а при 240 нм – для 1,5,5-заміщених. Для тіобарбітуратів з'являється максимум при 305 нм, а перший зникає.

*Виявлення похідних саліцилової кислоти, ксантину та піразолону.* Сухий залишок №2 розчиняють в 5 мл 0,1 н. розчину сульфатної кислоти, при необхідності фільтрують і знімають спектр світлопоглинання в діапазоні довжин хвиль від 210 до 360 нм. Визначають положення максимумів смуг поглинання. Порівнюють характер УФ-спектрів із спектрами відомих сполук і роблять висновок про ідентичність.

Кофеїн характеризується смугою поглинання при 272-273 нм, саліцилова кислота при 300-302 нм, антипірін при 230 та 259 нм.

### **Питання для самопідготовки студентів**

1. Методи дослідження, які використовують при судово-хімічному та хіміко-токсикологічному аналізі.
2. Фактори, що впливають на розділення сполук методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.
3. Вплив розчинності досліджуваних речовин в системі розчинників на значення  $R_f$ .



4. Залежність  $R_f$  досліджуваних речовин від полярності компонентів системи розчинників.
5. Параметри, за якими ідентифікують сполуки у методі хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
6. Яка достовірність результатів ідентифікації речовин методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту із “свідком” при використанні декількох систем розчинників?
7. Можливість використання УФ-спектроскопії для ідентифікації речовин, виділених із біологічного матеріалу і рідин організму?
8. Які фактори впливають на положення максимумів вбирання?
9. Математичний вираз закону світловбирання Бугера-Ламберта-Бера.

#### Заняття 4

### РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ АЛКАЛОЇДІВ У ВИТЯЖКАХ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Актуальність теми: Алкалоїди до теперішнього часу широко використовуються в медичній практиці. Деякі з них проявляють наркотичну, одурманюючу та галюциногенну дію. При передозуванні ними спостерігаються випадки отруєнь. Тому вивчення методів ідентифікації цих речовин є актуальним.

Мета: Навчити студентів використовувати осадові і кольорові реакції виявлення алкалоїдів, які екстрагуються з лужного середовища у модельних витяжках із біологічного матеріалу.

Навчальна мета: Студенти повинні вміти виявляти: атропін, хінін, морфін, кодеїн, папаверин, ефедрин кольоровими та осадовими реакціями.

Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати хімічні класи досліджуваних сполук (органічна хімія), техніку виконання реакцій (аналітична хімія), характерні реакції на похідні тропану, хіноліну, ізохіноліну, ефедрину (органічна і фармацевтична хімія), а також знати перелік рослин, що містять похідні тропану, хіноліну, ізохіноліну та еферин (фармакогнозія).

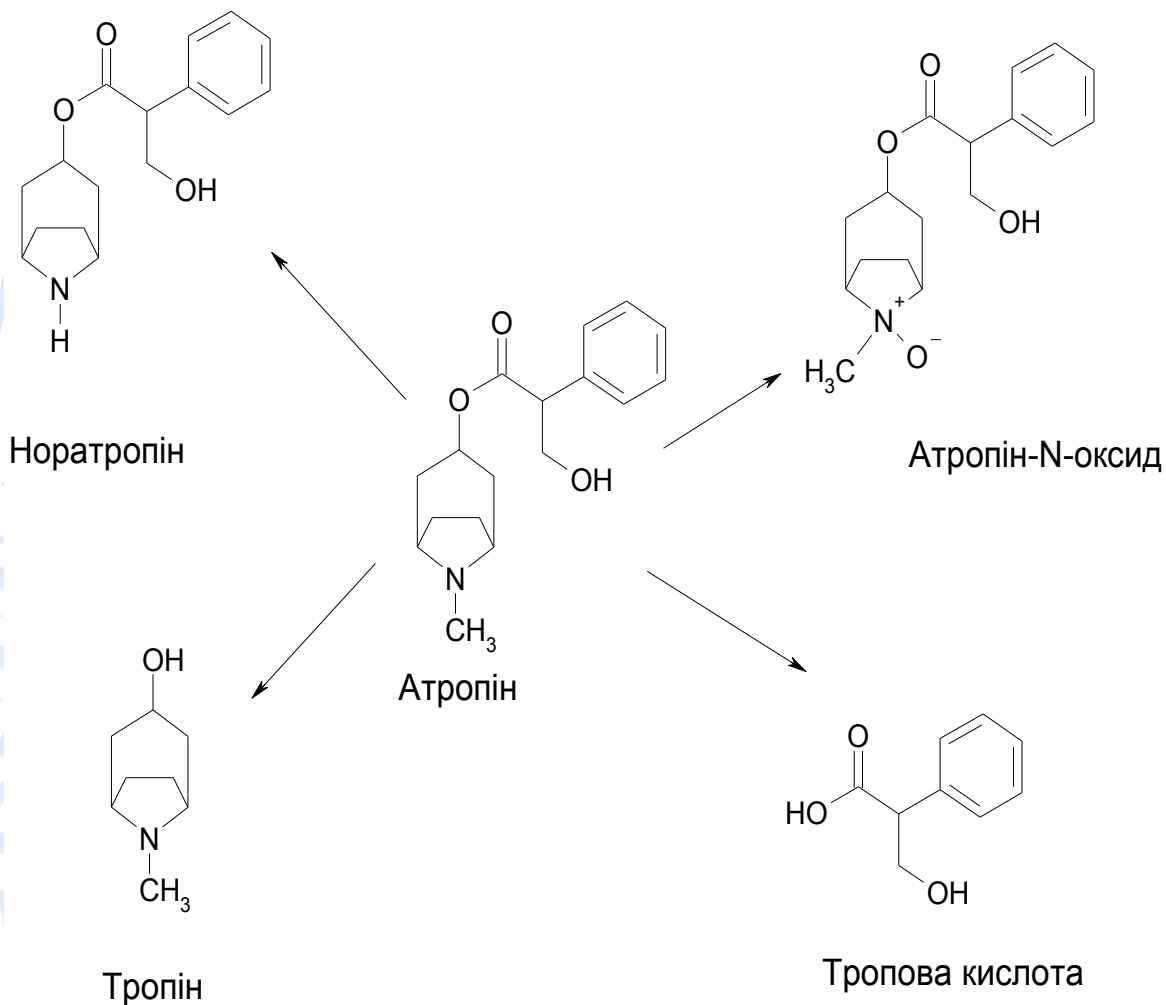
Із лужного середовища органічними розчинниками екстрагуються алкалоїди та їх синтетичні аналоги, оскільки вони характеризуються основними властивостями. Основні властивості цих сполук зумовлені наявністю в їх молекулі атому нітрогену. Це можуть бути первинні, вторинні або третинні аміногрупи, гетероцикли, що містять нітроген, тощо. Атом нітрогену цих угруповань має вільну пару електронів і утворює хімічні зв'язки із акцепторами вільної пари електронів. Найчастіше акцептором є іон водню, який приєднується до нітрогенвмісних угруповань утворюючи сполуки по типу амонію, і набуваючи при цьому позитивного заряду. Таким чином органічні сполуки, що містять нітрогенвмісні угруповання будуть утворювати органічні катіони, які з аніонами утворюють солі, іонні асоціати та комплексні сполуки. Реагенти, які утворюють з органічними катіонами малорозчинні сполуки, отримали назву реактивів групового осадження алкалоїдів. Це пов'язано з тим, що історично першою групою органічних сполук з такими властивостями були алкалоїди, виділені із рослин. Як правило, до реактивів групового осадження алкалоїдів відносяться речовини, що у водних розчинах утворюють великі аніони. Найбільш широкого використання набули комплексні сполуки і гетерополікислоти. Реакції з використанням реактивів групового осадження алкалоїдів не є специфічними, тому для одержання більш достовірних результатів аналізу потрібно використовувати інші методи аналізу.

Також для виявлення лікарських засобів було розроблено ряд реакцій з реактивами, які із багатьма сполуками вступали у різні взаємодії, зокрема реакції дегідратації, окислення, конденсації з альдегідами, нітрування та інших, в результаті яких утворювалися забарвлені сполуки.

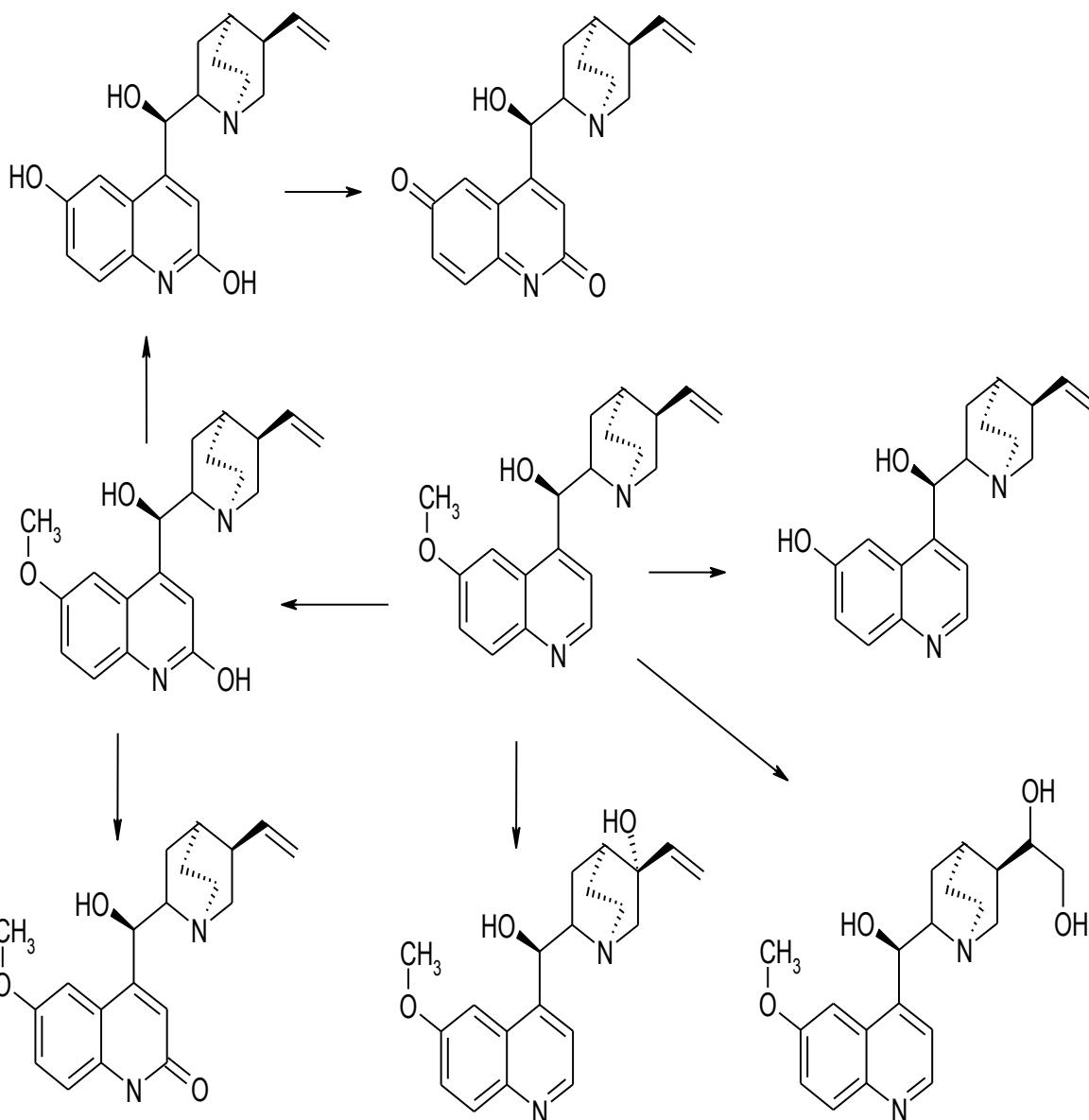
Отруєння, викликані алкалоїдами різних хімічних груп: похідні тропану, хіноліну, ізохіноліну, ациклічні алкалоїди. В організмі ці сполуки метаболізують. Продукти метаболізму можуть проявляти фармакологічну дію.

Схеми метаболізму основних представників алкалоїдів наведені нижче:

Основні шляхи метаболізму *похідних тропану* (атропін):

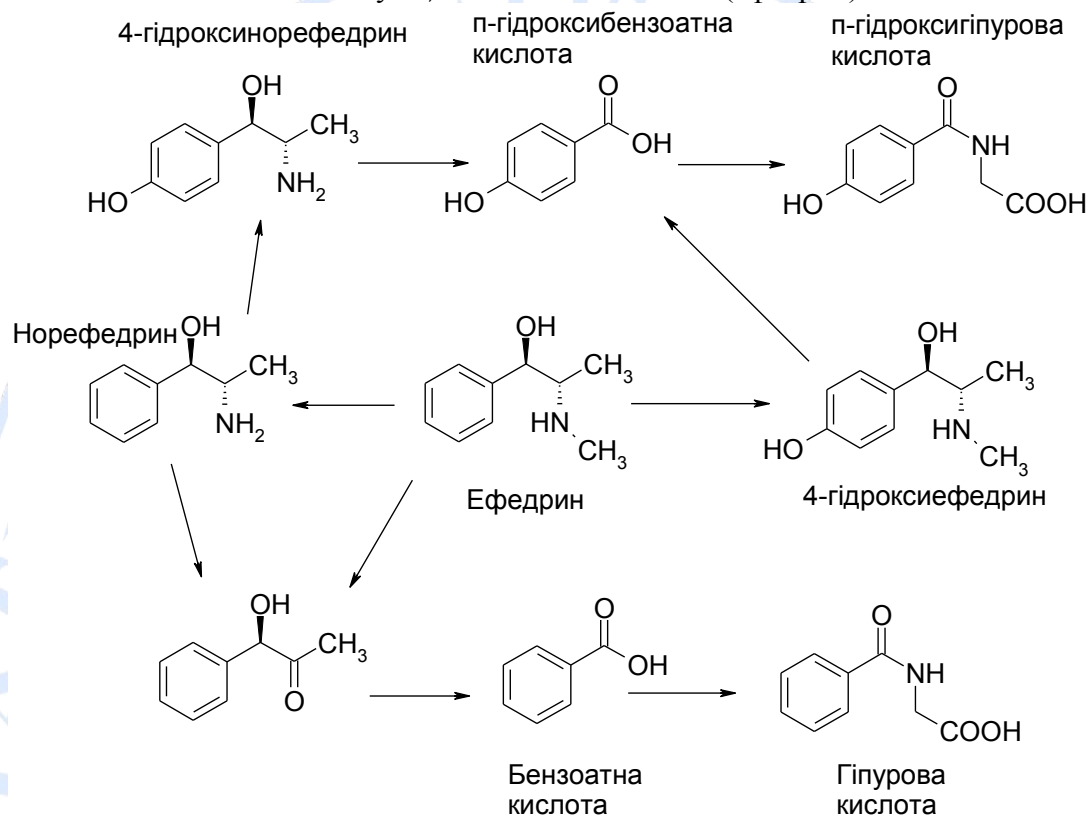


Основні шляхи метаболізму *похідних хіноліну*:





Основні шляхи метаболізму **ациклічних алкалоїдів** (ефедрин):



### Лабораторна робота студентів

Загальні реакції, що використовуються для виявлення речовин основного характеру

#### 1. Реакції осадження

Модельну хлороформну витяжку (екстракт №2) випаровують насухо, залишок розчиняють в 0, 1 М розчині хлоридної кислоти. По краплі розчину наносять на предметне скло, куди додають різні реактиви:

- розчин пікринової кислоти (атропін, кокаїн);
- реактиви Бушарда, Драгендорфа, Майєра (кодеїн, хінін, кокаїн);
- реактив Зонненшейна (морфін);

#### 2. Кольорові реакції

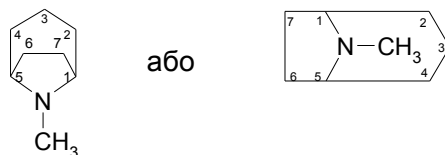
Для проведення кольорових реакцій частину модельної витяжки вносять у фарфорові чашки, в заглиблення на фарфорових пластинках або в пробірки. Хлороформ випаровують насухо. На сухі залишки наносять відповідні реактиви і спостерігають забарвлення:

Дослід-жувана речовина	Реагенти						
	Манделіна	Маркі	Фреде	Ердмана	HNO <sub>3</sub> (конц.)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (конц.)	HCl (конц.)
морфін	фіолетове	фіолетове	фіолетове	червоне, яке переходить в жовте	криваво-червоне, яке переходить в жовте	-	-

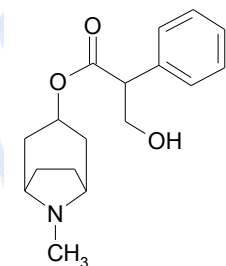
кодеїн	зелене, яке переходить в жовте	зелене з синюватим відтінком	зелене, яке переходить в синє	-	-	-	-
папаверин	синьо-фіолетове	фіолетове	зелене	червоне	-	-	-
наркотин	червоно-буро-фіолетове	фіолетово-зелено-жовте	синьо-зелене, вишнево-червоне при нагріванні	червоне, яке переходить в фіолетово-червоне	-	жовто-зелене, яке переходить у вишнево-червоне	-
аміназин	зелене, яке переходить в пурпурове	пурпуро-ве	-	-	пурпуро-во-фіолетове	пурпуро-во-червоне	рожево-фіолетове
хлордіазепоксид	-	жовте	оранжеве	-	-	-	-
хінін	-	-	-	-	-	голуба флуоресценція	-

Для виявлення отруйних речовин в хіміко-токсикологічному аналізі використовують також і більш специфічні реакції. Ці реакції потребують спеціальних умов виконання і описані нижче:

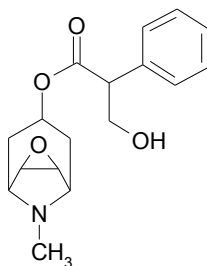
Похідні тропану (алкалоїди беладони і дурману, атропін, скополамін, кокаїн)



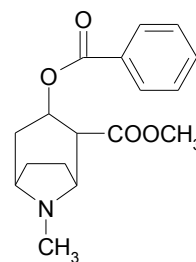
Тропан



Атропін

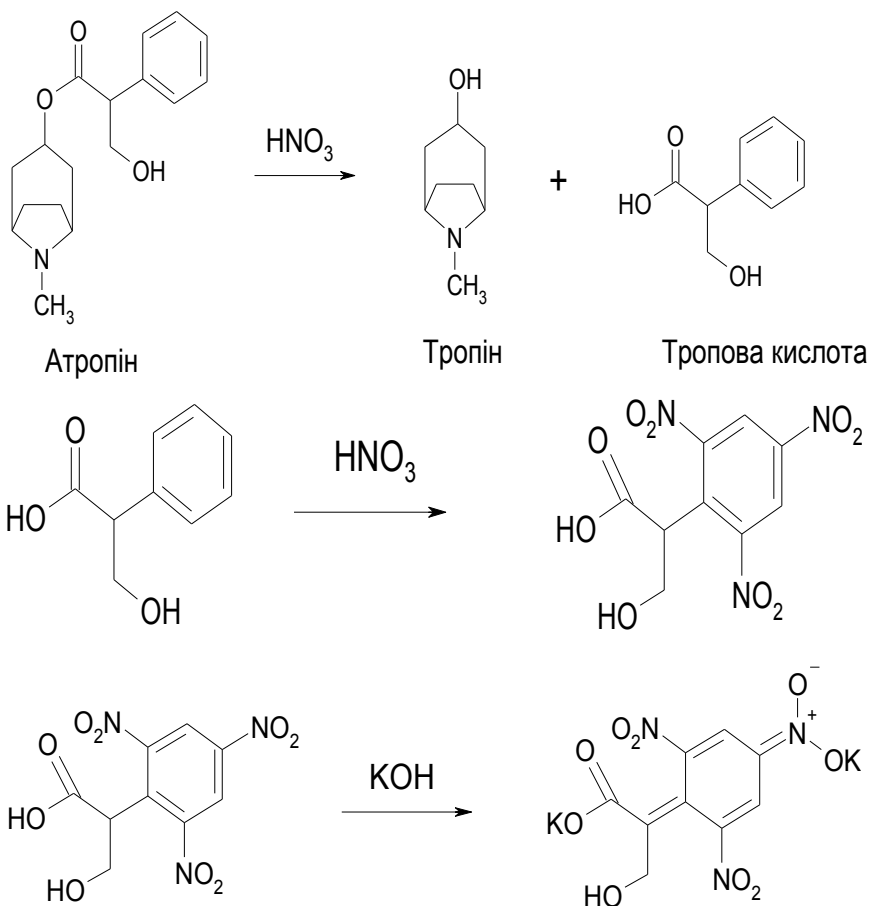


Скополамін

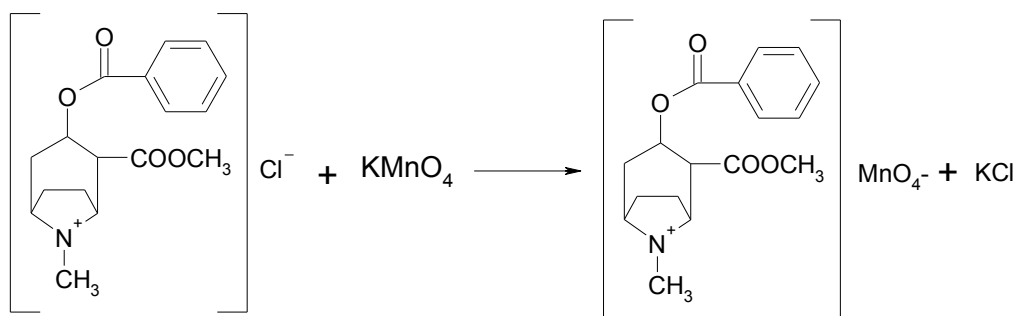


Кокаїн

*Реакція Віталі-Морена (атропін, скополамін).* У фарфорову чашку вносять декілька крапель модельної витяжки і випаровують насухо. До сухого залишку додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти, яку випаровують на киплячому водяному огрівнику насухо і одержують жовтий сухий залишок. На сухий залишок наносять 2-4 краплі ацетону, поряд наносять 1-2 краплі 10% спиртового розчину гідроксиду калію і з'єднують ці розчини. Утворюється фіолетове забарвлення.

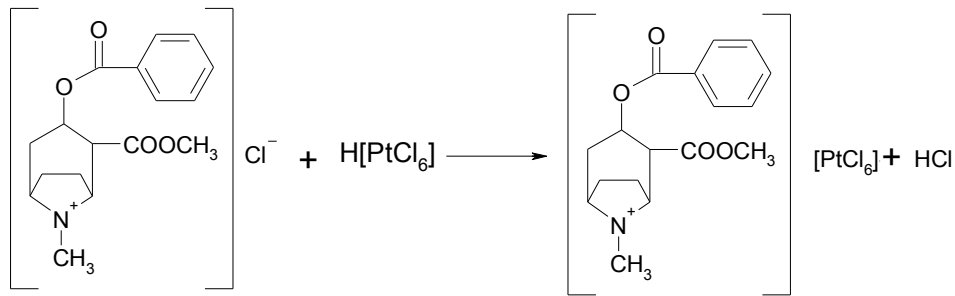


Реакція з перманганатом калію (кокаїн). 0,5 мл модельної витяжки наносять на предметне скло і випаровують хлороформ насухо при кімнатній температурі. Сухий залишок розчиняють в 1 краплі 10% розчину хлоридної кислоти. Цей розчин також випаровують насухо. До сухого залишку додають краплю 1% розчину калію перманганату. Утворюються червоно-фіолетові кристали, які мають форму прямокутних пластинок та зростків з них.



Кокаїну гідрохлорид

Реакція з платинохлористоводневою кислотою. До сухого залишку, одержаного після випаровування хлороформного розчину досліджуваної речовини або хлороформної витяжки з біологічного матеріалу, додають краплю 0,1 н. розчину хлоридної кислоти і краплю 10% розчину платинохлористоводневої кислоти. Утворення світло-жовтих кристалів, які мають форму дендритів, свідчить про наявність кокаїну в пробі.

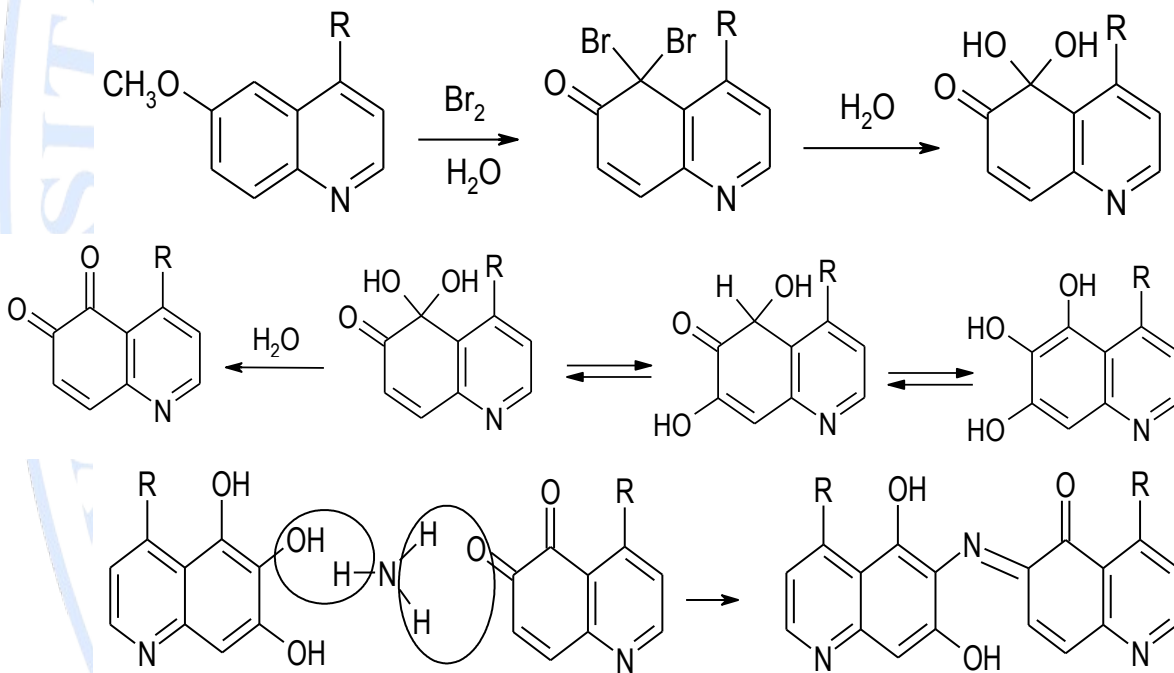


Кокаїну гідрохлорид

Похідні хіноліну (алкалоїди хінного дерева: хінін, хінідин; хінозол, хініофон)

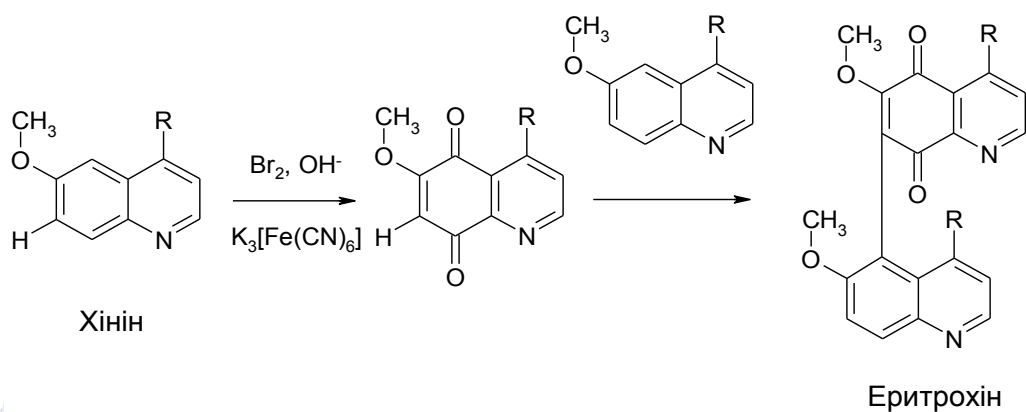
*Флуоресцентна проба (хінін).* Сухий залишок, одержаний після випаровування частини хлороформної витяжки обробляють у фарфоровій чашці 2-3 мл 1 н. розчину сульфатної кислоти. Отриманий розчин виливають у пробірку і розглядають в УФ-світлі. Спостерігається фіолетова флуоресценція;

*Реакція утворення талейохіну.* Сухий залишок обробляють декількома краплями води. До розчину додають краплями бромну воду до слабо-жовтого забарвлення, після чого декілька крапель розчину аміаку. Утворюється зелене забарвлення (R – хінуклединовий фрагмент молекули).



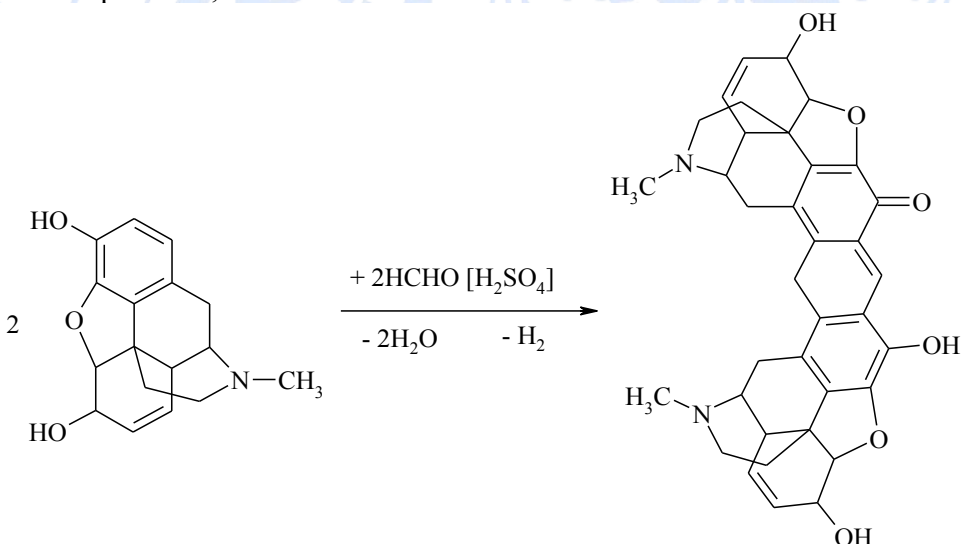
*Реакція утворення еритрохіну (хінін).* До сухого залишку додають невелику кількість води, слабо підкисленої сульфатною або ацетатною кислотою, краплю бромної води і краплю 10% розчину гексацианоферату (III) калію. Одержану рідину ретельно перемішують і краплями додають розчин аміаку до лужної реакції. При наявності хініну в досліджуваному розчині з'являється рожеве або червоно-фіолетове забарвлення, при збовтуванні з хлороформом це забарвлення переходить у хлороформний шар.



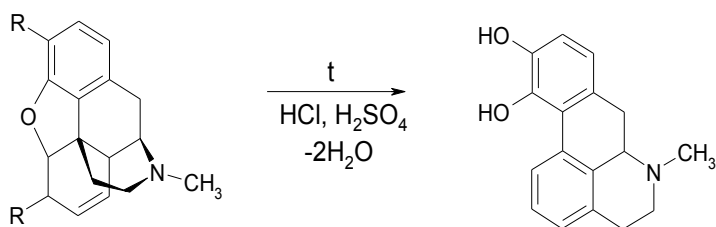


Похідні ізохіноліну (опіати – наркотин, нарцеїн, папаверин, морфін, кодеїн, тебаїн, а також етилморфін, героїн, гідрокодон, оксикодон, декстрометорфан, леворфанол і пентазоцин).

*Реакція з реактивом Маркі (похідні ізохіноліну - морфін, кодеїн, папаверин).* До сухого залишку на фарфоровій пластинці додають 2 краплі реактиву Маркі. Утворюються червоно-фіолетове забарвлення;

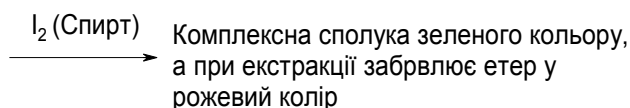
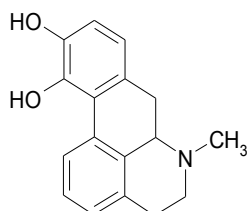


*Реакція з реактивом Пеллаґрі ( морфін, кодеїн).* У пробірку вносять декілька крапель модельної хлороформної витяжки, яку випарюють насухо. До сухого залишку додають 1-2 краплі концентрованої хлоридної кислоти і 2 краплі концентрованої сульфатної кислоти. Суміш нагрівають на киплячому водяному огрівнику 15 хв., охолоджують і додають 3 мл води. При утворенні осаду його розчиняють в хлоридній кислоті. Одержаний розчин нейтралізують 10% розчином карбонату натрію і додають 3 краплі спиртового розчину йоду. З'являється зелене забарвлення. Якщо до суміші додати діетиловий ефір, то органічна фаза забарвиться в червоний колір;

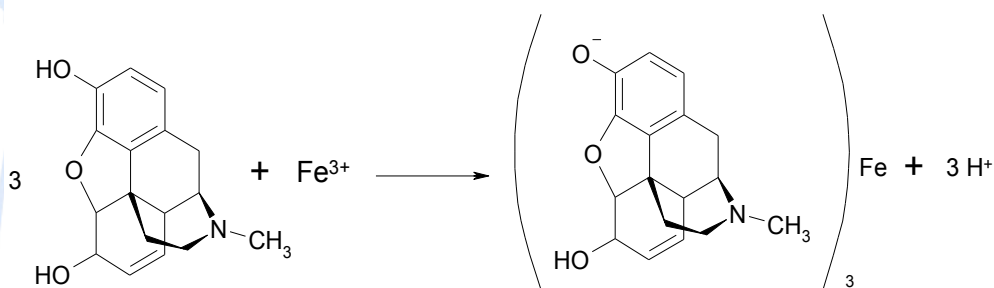


Морфін, кодеїн або тебаїн

Апоморфін



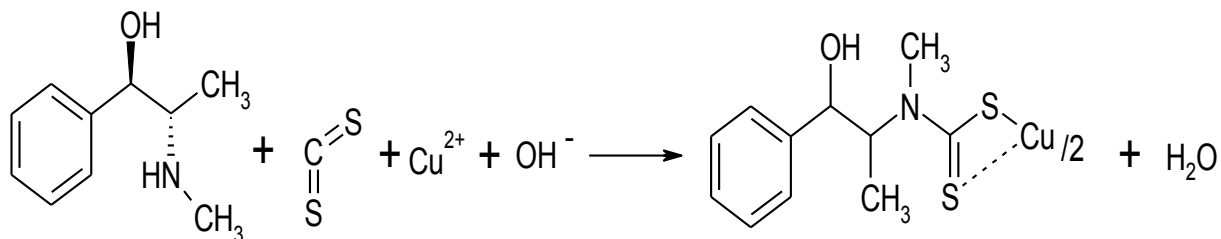
*Реакція з хлоридом феруму (III) ( морфін).* До сухого залишку додають 2 краплі свіжовиготовленого 2% водного розчину реактиву. Утворюється синє забарвлення.



Ациклічні алкалоїди (ефедрин, псевдоефедрин, ефедрон)

*Реакція з нінгідрином (ефедрин).* До 2 мл розчину, отриманого після розчинення сухого залишку, додають 1 краплю 1% розчину нінгідрину і 1 краплю 1% розчину карбонату натрію. Суміш нагрівають, а потім охолоджують. Після цього додають 2 мл амілового спирту, який забарвлюється в фіолетовий колір;

*Реакція з солями міді і сірковуглецем.* В мікропробірку вносять краплю модельної витяжки і випарюють насухо. Сухий залишок розчиняють в 1 краплі води і додають 1 краплю ацетатної кислоти. Потім додають 1 краплю 5% розчину сульфату міді і аміак до лужної реакції. До одержаної суміші додають 2 краплі суміші сірковуглецю і бензолу (1:3) і струшують. Утворюється коричневе або жовте забарвлення.



### Питання для самопідготовки студентів

1. Які токсикологічно важливі речовини екстрагують органічними розчинниками із підлужнених витяжок, що не змішуються з водою?

2. Які реактиви групового осадження алкалоїдів застосовуються в хіміко– токсикологічному аналізі?
3. Як відрізнити опій від опію?
4. При допомозі яких реакцій можна виявити морфін і кодеїн і відрізнити один від одного?
5. Як виявити нікотин і анабазин у витяжках із біологічного матеріалу і як відрізнити один від одного?
6. Які основні фізичні і хімічні властивості алкалоїдів необхідно знати при проведенні хіміко– токсикологічного аналізу?
7. Які кольорові реакції застосовуються для виявлення алкалоїдів групи фенантренизохіноліну?
8. Які реакції застосовують для виявлення хініну і хінідину?
9. Чи специфічна реакція Віталі-Морена для атропіну ? Які речовини, крім атропіну, можуть давати цю реакцію?
10. Якщо реакція Віталі-Морена неспецифічна для атропіну, то якими ще реакціями доказують наявність цього алкалоїду при хіміко-токсикологічних дослідженнях?
11. Реакції виявлення алкалоїдів похідних тропану – атропіну, кокаїну.
12. Що може служити джерелом отруєнь алкалоїдами тропанового ряду?
13. Якими реакціями можна доказати наявність скополаміну в об'єкті дослідження?
14. Як оцінюють реакцію одержання перманганату кокаїну при хіміко-токсикологічному аналізі?
15. Які ще реакції можуть доказати наявність кокаїну при хіміко-токсикологічному аналізі?
16. Приведіть реакції, які застосовуються для виявлення алкалоїдів похідних піридину і піперидину.
17. Що покладено в основу реакцій утворення талейохіну і еритрохіну?
18. Які із описаних для морфіну реакцій є найбільш характерними, специфічними і доказовими?
19. Які із описаних для морфіну реакцій є загальними для всіх алкалоїдів, похідних ізохіноліну?
20. Яке хіміко-токсикологічне значення наркотину?
21. На чому базується доказ отруєння опієм?
22. На основі яких результатів аналізу базується висновок про відкриття опію?
23. Які реакції застосовуються для виявлення ефедрину у витяжках із біологічного матеріалу?
24. Використання флуоресценції для ідентифікації речовин, виділених із біологічного матеріалу.

### Заняття 5

#### РЕАКЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ЯКІ ЕКСТРАГУЮТЬСЯ З ЛУЖНОГО СЕРЕДОВИЩА

Актуальність теми. Лікарські препарати похідні фенотіазину, 1,4-бензодіазепіну, п-амінобензоатної кислоти, ізонікотинової кислоти, бутирофенону та інші часто стають причиною отруєнь, тому актуальними є вивчення методів їх виявлення у витяжках із біологічного матеріалу.

Мета. Оволодіти методиками виявлення токсикологічно важливих речовин основного характеру у витяжках з біологічного матеріалу при допомозі осадкових і кольорових реакцій.

Навчальні цілі. Студенти повинні вміти:

- складати план аналізу витяжок з біологічного матеріалу, розраховувати кількість витяжки на дослід, виходячи з числа дослідів, обґрунтовувати послідовність виконання реакцій з метою одержання максимальної інформації при найменшій затраті витяжки,

- оволодіти методиками виявлення токсикологічно важливих речовин основного характеру у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою осадових і кольорових реакцій,
- оцінювати результати аналізу і складати акт судово-токсикологічного дослідження.

Міжпредметна інтеграція. Студенти повинні знати можливі шляхи проникнення отруйних речовин в організм (фармакологія), основні типи реакцій біотрансформації (біологічна хімія), шляхи виведення отруйних речовин із організму (фармакологія), методики виконання осадових і кольорових реакцій (аналітична і токсикологічна хімія).

### Лабораторна робота студентів

При складанні плану хіміко-токсикологічного аналізу необхідно врахувати обставини справи, які викладені в супровідному документі. Слід врахувати дані виписки з історії хвороби (якщо вона прикладена до супровідного документу) та дані акту судово-медичного дослідження трупа.

В ряді випадків результати зовнішнього огляду об'єктів дослідження, виявлення в них чужорідних включень, визначення рН середовища, запаху і забарвлення об'єктів дозволяє передбачити речовини, які спричинили отруєння і включити в план хіміко-токсикологічного аналізу дослідження передбачуваної речовини.

Визначення рН. Для визначення рН середовища невелику кількість досліджуваного об'єкту подрібнюють, вносять в пробірку, додають дистильовану воду і добре збовтують. Водну витяжку відділяють від твердого осаду. В одержаній водній витяжці визначають кислотність або лужність середовища за допомогою індикаторного паперу. Для цього застосовують індикаторний папір, оброблений розчином фенолфталеїну або універсальним індикатором. Червоне забарвлення паперу, обробленого фенолфталеїном, вказує на наявність основ у водній витяжці із біологічного матеріалу.

Отруйні речовини, що екстрагуються із витяжок з лужного середовища виявляють осадовими і кольоровими реакціями. У витяжках можуть міститися похідні фенотіазину, 1,4-бензодіазепіну, п-амінобензоатної кислоти, ізонікотинової кислоти, бутирофенону та їх метаболіти. Ці продукти вступають у хімічну взаємодію із відповідними реагентами.

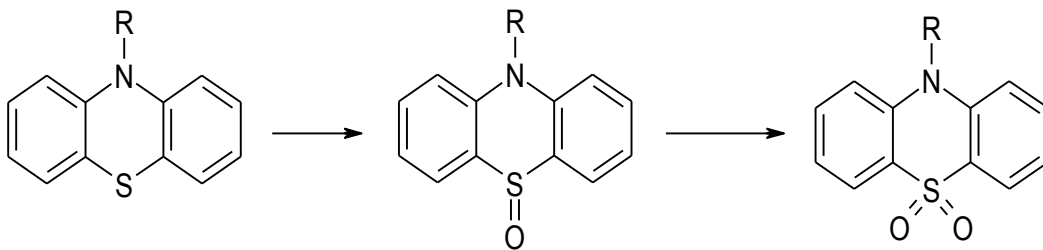
Осадові реакції. Для виконання осадових реакцій по декілька крапель хлороформного екстракту (екстракт №2) вносять у заглиблення фарфорових пластинок предметні стекла і при кімнатній температурі випарюють насухо. Сухі залишки розчиняють в 1-2 краплях 0,01 н. розчину хлоридної кислоти. Вносять по краплі одного з реактивів групового осадження алкалоїдів (див. заняття №2). Поява осаду або каламуті вказує на наявність в досліджуваному розчині алкалоїдів або інших азотовмісних речовин.

Кольорові реакції. Для виявлення досліджуваних сполук кольоровими реакціями невеликі порції хлороформних розчинів екстракту №2 (0,02-0,1 мл) вносять у фарфорові чашки, лунки фарфорових пластинок чи у пробірки. Хлороформ випарюють насухо. Сухі залишки розчиняють і вводять в реакції з відповідними реактивами.

Похідні фенотіазину (аміназин, дипразин, етмозин, левомепромазин, тіоридазин та ін.)

Реакції виявлення похідних фенотіазину.

Реакція з концентрованою сульфатною кислотою (аміназин). На пластинку наносять 1-2 краплі хлороформної витяжки і випаровують хлороформ насухо. На сухий залишок наносять 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти. Утворюється червоне забарвлення;



Похідне фенотіазину

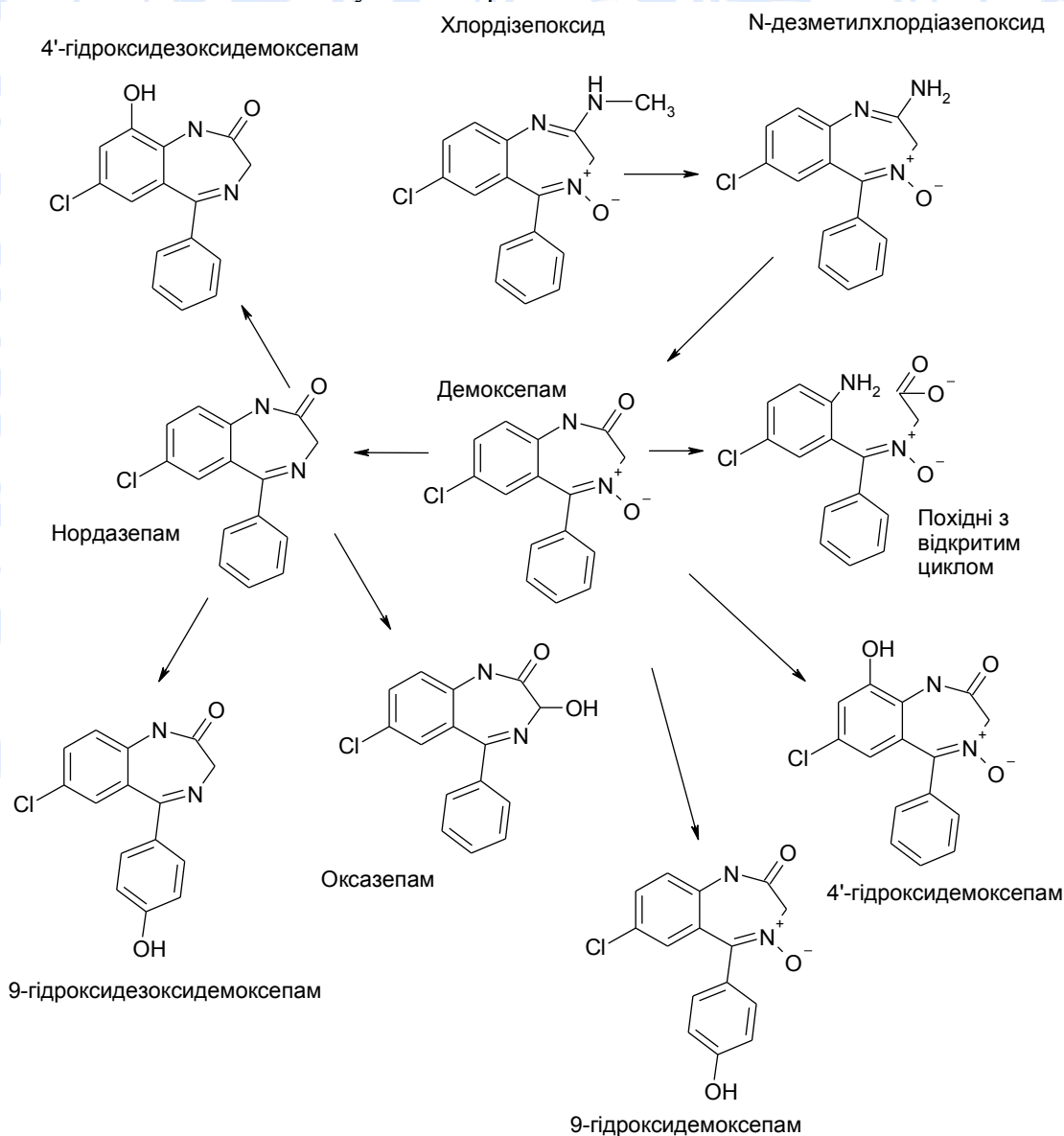
Сульфоксид

Сульфдіоксид (Сульфон)

*Реакція з реактивом ФПН.* Сухий залишок, одержаний після випаровування частини хлороформної витяжки розчиняють в декількох краплях дистильованої води і додають декілька крапель реактиву ФПН (суміш розчину хлориду заліза(III), хлорної і нітратної кислот). Утворюється рожеве або червоне забарвлення (механізм аналогічний до попередньої).

**Похідні 1,4-бенздіазепіну** (хлордіазепоксид, діазепам, оксазепам, мезапам, феназепам, нітразепам, клоназепам тощо). У хлороформних екстрактах містяться бензодіазепіни і продукти їх метаболізму

Основні шляхи метаболізму можна представити схемою:

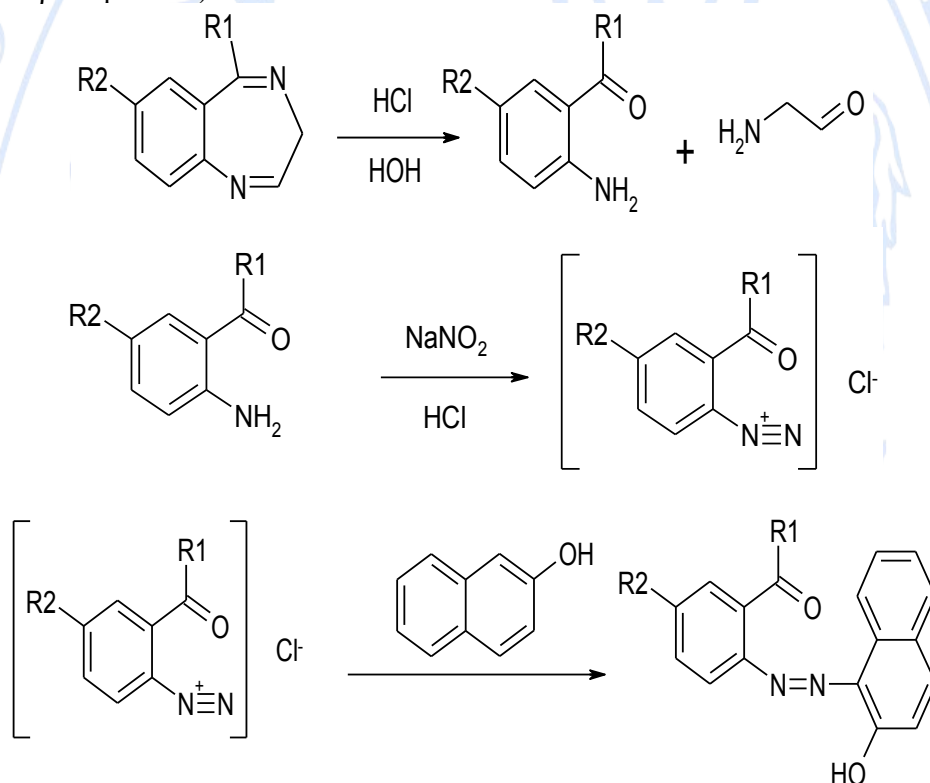


### Реакції виявлення похідних бензодіазепіну.

**Реакція утворення азобарвника (похідні 1,4-бензодіазепіну – хлордіазепоксид).** До 2 мл модельної витяжки додають 2 мл 2 н. розчину хлоридної кислоти і нагрівають на водяному огрівнику в пробірці із зворотним холодильником протягом однієї години. Після цього до гідролізату додають насичений розчин гідроксиду натрію до рН 8-10 і екстрагують хлороформом. хлороформну фазу відділяють, випаровують насухо. До сухого залишку додають 0,1% розчин нітриту натрію, 2 н. розчин хлоридної кислоти і через 1 хв додають 0,5 % розчин сульфату амонію і 0,1% лужний розчин β-нафтолу. При цьому розчин забарвлюється в оранжево-червоний колір.

Бензодіазепіни і їх метаболіти гідролізують при кип'ятінні в кислому середовищі. При цьому відбувається руйнування азепінового циклу з утворенням продуктів гідролізу, що містять первинну аміногрупу.

Для виявлення первинної аміногрупи застосовують реакцію утворення азобарвника (з α-нафтолом чи β-нафтолом):

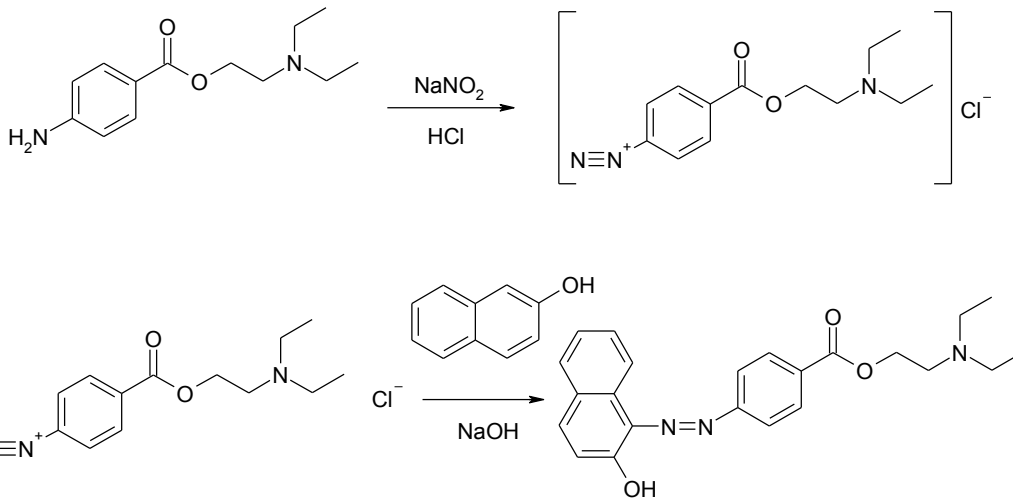


Цю реакцію використовують, як для виявлення, так і для кількісного визначення похідних бензодіазепіну.

### Похідні *p*-амінобензойної кислоти (новокаїн, новокаїнамід).

#### Реакції виявлення похідних *p*-амінобензоатної кислоти.

**Реакція одержання азосполук (новокаїн).** В пробірку вносять 3 мл модельної хлороформної витяжки, яку випарюють насухо. До сухого залишку додають 5 крапель 0,1 н. розчину хлоридної кислоти, а потім краплями вносять 1% розчин нітриту натрію до тих пір, поки йодхромальний папірець не почне забарвлюватися в синій колір. Через 5 хв рідину підлужнюють 2% розчином гідроксиду натрію і додають 5 крапель лужного розчину β-нафтолу. Утворюється червоно-оранжеве забарвлення.



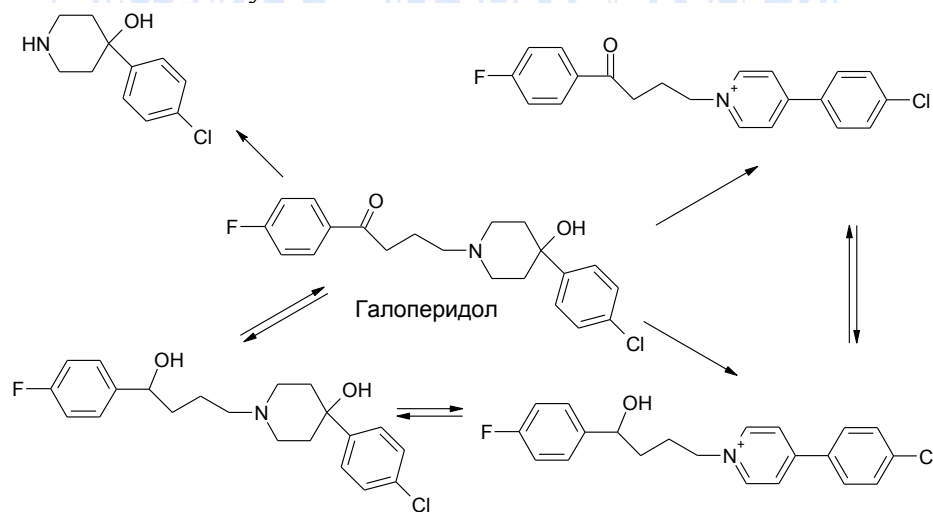
### **Похідні ізонікотинової кислоти** (ізоніазид, іпроніазид, фтивазид)

#### **Реакції виявлення похідних ізонікотинової кислоти.**

*Реакція з кремніємолібденовою кислотою (ізоніазид).* В пробірку вносять 5 мл розчину силікату калію, 4 мл води, 2 мл 0,5 н. розчину хлоридної кислоти. Через 3 хв до суміші додають 2 мл досліджуваного розчину і перемішують. Після цього вносять 5 мл 6% розчину аміаку. Розчин забарвлюється в синій колір.

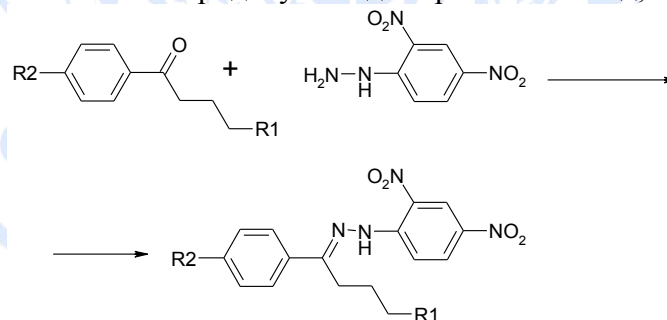
### **Похідні бутирофенону** (галоперидол, дроперидол, бенперидол)

Основні шляхи метаболізму:

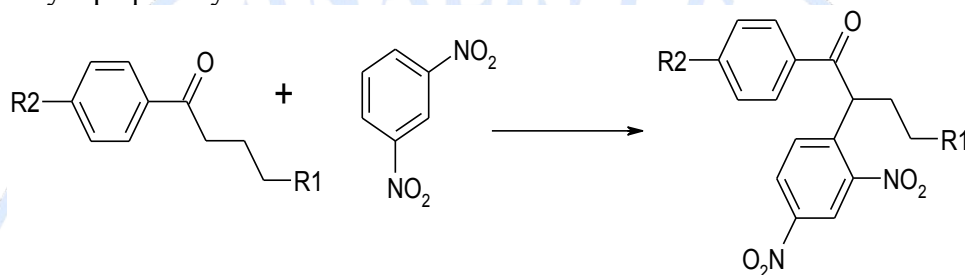


#### **Реакції виявлення похідних бутирофенону.**

*Реакція з 2,4-динітрофенілгідразином (галоперидол).* До розчину, одержаний після розчинення сухого залишку з модельної хлороформної витяжки, додають 1 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину. Суміш нагрівають на кип'ячому водяному огрівнику 5 хв і охолоджують. При наявності галоперидолу випадає оранжевий осад;



*Реакція з м-динітробензолом.* До спиртового розчину галоперидолу додають 1% спиртовий розчин м-динітробензолу і 15% спиртовий розчин гідроксиду калію. При цьому виникає фіолетове забарвлення в результаті утворення калієвої солі похідного 2,4-динітрофенілбутирофенону.



Результати досліджень студенти записують у робочому журналі у вигляді протоколу.

### Питання для самопідготовки студентів

1. Які реакції використовують для виявлення похідних фенотіазину та яке їх судово-хімічне значення?
2. Похідні 1,4-бензодіазепіну і реакції їх виявлення.
3. Похідні гідразиду ізонікотинової кислоти і реакції їх виявлення (ізоніазид, фтивазид, салюзид).
4. Які реакції використовуються для виявлення похідних бутирофенону (галоперидолу, трифлуперидолу, дроперидолу)?
5. Якими реакціями можна виявити похідні *n*-амінобензойної кислоти (новокаїну, дикаїну, новокаїнамід)?
6. Реакції виявлення ксикаїну і тримекаїну.

### Заняття 6

#### АНАЛІЗ ВИТЯЖКИ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРУ ФІЗИКО-ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ. ТШХ - СКРИНІНГ

Актуальність теми. Поряд з ідентифікацією отруйних речовин основного характеру у витяжках із біологічного матеріалу за допомогою хімічних реакцій виявлення за допомогою фізико-хімічних методів ( мікрокристалоскопічних реакцій, хроматографії в тонкому шарі сорбенту і УФ-спектроскопії) є необхідним для хіміка-токсиколога як для ідентифікації так і для підтвердження попередніх результатів досліджень.

Мета. Навчити студентів способів ідентифікації отруйних речовин основного характеру за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій, методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту і УФ-спектроскопії.

Навчальні цілі. Студенти повинні вміти:

- ідентифікувати речовини за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій,
- ідентифікувати речовини методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту,
- ідентифікувати речовини методом УФ-спектроскопії.

Міжпредметна інтеграція. Студенти повинні знати теоретичні основи і техніку виконання мікрокристалоскопічних реакцій, теоретичні основи і техніку виконання хроматографії в тонкому шарі сорбенту ( фізична і аналітична хімія), теоретичні основи методу спектроскопії і техніку виконання спектроскопічного аналізу (органічна хімія, фізична хімія, аналітична хімія, фізика і фармацевтична хімія), техніку виконання мікрокристалоскопічних реакцій, хроматографії в тонкому шарі сорбенту і техніку виконання



спектроскопічного аналізу для виявлення токсикологічно важливих речовин основного характеру в модельних витяжках із біологічного матеріалу (токсикологічна хімія).

### Лабораторна робота студентів

Виявлення отруйних і сильнодіючих речовин основного характеру за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій.

Реакція з хлоридом кадмію (на папаверин). На предметне скло наносять декілька крапель досліджуваного розчину і випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 н. розчину хлоридної кислоти, поряд краплю 10 % розчину хлориду кадмію, а потім з'єднують ці розчини. Появляються зростки із тонких пластинок, які мають форму куба.

Реакція з сіллю Рейнеке. (на атропін). Сухий залишок одержаний після випарення досліджуваної витяжки розчиняють в краплі 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Поряд поміщають краплю свіжовиготовленого 1% розчину солі Рейнеке. При з'єднанні цих розчинів утворюється сіруватого кольору аморфний осад, який швидко переходить в кристалічний. Утворення зростків кристалів з ромбовидними кінцями вказує на наявність атропіну.

Реакція з реактивом Драгендорфа (на ефедрин, новокаїн). При взаємодії ефедрину з реактивом Драгендорфа утворюються кристали у вигляді тонких голок зібраних в пучки. У випадку новокаїну - прямокутні пластинки червоно-бурого кольору.

### Виявлення отруйних речовин основного характеру при допомозі методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Камеру для хроматографування насичують парами системи органічних розчинників етилцетат-ацетон-аміак (22,5:2,5:2,5) на протязі двох годин. На лінію старту на пластинку "Силуфол" наносять по дві краплі витяжок, які містять отруйні речовини, які максимально екстрагуються з лужного середовища. Плями нанесених розчинів підсушують на повітрі, а потім пластинку вносять в камеру для хроматографування, насичену парами системи розчинників. Пластинку в камері залишають на час необхідний для підняття системи розчинників на 10 см вище від лінії старту. Пластинку виймають з камери і висушують на повітрі. Після цього пластинку проявляють реактивом Драгендорфа в модифікації Мунье. Одержані величини  $R_f$  та забарвлення плям отруйних речовин у витяжках співставляємо (порівнюємо) з величинами  $R_f$  речовин-свідків, які ми одержали на попередньому занятті при хроматографуванні модельних витяжок із лужного середовища. Робимо висновки про наявність відповідних отруйних речовин.

Виявлення отруйних речовин основного характеру у витяжках при допомозі методу УФ-спектроскопії проводять так як описано в методичній вказівці до заняття №3.

### Питання для самостійної підготовки студентів

1. Коефіцієнт розподілу та його вплив на розташування плям досліджуваних речовин на хроматограмах.
2. Сорбенти, які використовуються в хроматографії в тонкому шарі сорбенту і фактори, які впливають на їхню активність.
3. Переваги та недоліки пластинок з готовим шаром силікагелю.
4. Що називається рухомою та нерухомою фазами при розділенні речовин в тонкому шарі сорбенту?
5. Принцип підбору систем розчинників для хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
6. Вплив концентрації речовин і об'єму досліджуваного розчину на результати розділення речовин методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
7. Які фактори треба враховувати при виборі робочої довжини хвилі, який спектр вбирання досліджуваної речовини має декілька максимумів?

8. Що відбувається з молекулою речовини при поглинанні квантів видимого або УФ-світла?
9. Навести приклади хромофорних груп.
10. Чи можна достовірно визначити ідентичність речовини тільки на основі її спектрів вбирання в УФ- і видимій областях?
11. Які зміни в спектрах називають гіпсохромним або батохромним зсувом?
12. Які фактори впливають на положення плям речовин на хроматограмах? При яких умовах величина  $R_f$  може вважатися константою?
13. Яка залежність сорбційної здатності речовин від природи радикалу і характеру функціональних груп?
14. Як впливає розчинність досліджуваних речовин в системі розчинників на форму плям і значення величини  $R_f$ ?
15. Чи залежить величина  $R_f$  досліджуваних речовин від полярності розчинників, які входять до складу системи розчинників?
16. Яка достовірність результатів ідентифікації речовин методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту із "свідком" при використанні декількох систем розчинників?
17. Які фактори впливають на час утримання ( $t_R$ ) речовин в газорідній хроматографії?
18. На основі яких параметрів хроматограми в ТШС проводять ідентифікацію речовин?
19. Спосіб ідентифікації речовин методом газорідної хроматографії при проведенні спрямованого (скерованого) і неспрямованого аналізу.
20. На основі результатів яких досліджень можна зробити висновок про виявлення конкретних речовин в біологічному матеріалі (на прикладі аміназину і морфіну).
21. Доцільність фармакологічних досліджень при проведенні аналізу біологічного матеріалу на окремі речовини або групи речовин.
22. Які фактори впливають на положення максимумів вбирання? Можливість використання УФ-спектроскопії для ідентифікації речовин, виділених із біологічного матеріалу і рідин організму?
23. Математичний вираз закону світловбирання Бугера-Ламберта-Бера.

### Заняття 7

## ВИДІЛЕННЯ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ ОТРУТ ГРИБІВ

Актуальність теми: Смертельними є отруєння блідою поганкою (*Amanita phalloides*), яка містить біциклічні окта- та гептапептиди (аманітини та фалоїдини). Токсикологічне значення має також мухомор червоний (*Amanita muscaria*), відвар якого використовується як галюциноген.

Мета: Оволодіти методиками виділення токсинів грибів роду мухомор з біологічного матеріалу та виявлення їх в одержаних витяжках за допомогою осадкових і кольорових реакцій та хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Навчальна мета: Студенти повинні вміти:

- виділяти пептидні токсини з плодових тіл блідої поганки та з біологічного матеріалу;
- виявляти аманітини і фалоїдини у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою кольорових реакцій;
- ідентифікувати аманітини і фалоїдини у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою хроматографії в тонкому шарі сорбенту;
- виділяти мускарин з плодових тіл мухомора червоного та з біологічного матеріалу;
- виявляти мускарин у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою кольорових реакцій,
- ідентифікувати мускарин у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати хімічні властивості досліджуваних класів сполук (органічна хімія, біологічна хімія), токсикологічні властивості мускарину та пептидів блідої поганки (фізіологія, фармакологія), техніку виконання реакцій осадження, крапельних і пробіркових реакцій, методику хроматографії в тонкому шарі сорбенту (аналітична хімія).

#### Класифікація грибних токсинів

За клінічними ознаками	За хімічною будовою
1. Токсини, які подразнюють шлунково-кишковий тракт.	Альдегіди і кетони
2. Токсини-аглютиніни.	Будова не відома
3. Токсини, які діють на периферичну нервову систему: а) холінергічної дії; б) антабусоподібної дії.	Мускарин Коприн
4. Токсини, які діють на центральну нервову систему: а) психотоміметики; б) галюциногени.	Похідні ізоксазолу Похідні індолу
5. Токсини, які руйнують клітини певних органів (цито- та плазмотоксичної дії).	Циклопептиди Похідні гідразину
6. Токсини, які впливають на функцію нирок (нефротоксини).	Похідні дипіридилу

#### Лабораторна робота

**Ізолювання мускарину з мухомора.** 10 грамів плодових тіл досліджуваних грибів подрібнюють і поміщають у фарфорову чашку. Утворену масу заливають дистильованою водою до покриття твердих частинок, додають 2 н. розчин сульфатної кислоти до рН 2 (за універсальним індикатором) і кип'ятять цю масу 5 хв. Суміш охолоджують і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат переносять у роздільну лійку, додають 10 % розчин гідроксиду амонію до рН 10-11 (за універсальним індикатором) і двічі екстрагують мускарин хлороформом порціями по 5 мл. Хлороформний екстракт об'єднують, переносять у випарну чашку і висушують на повітрі. Сухий залишок використовують для дослідження на наявність мускарину та інших четвертинних амонійних основ.

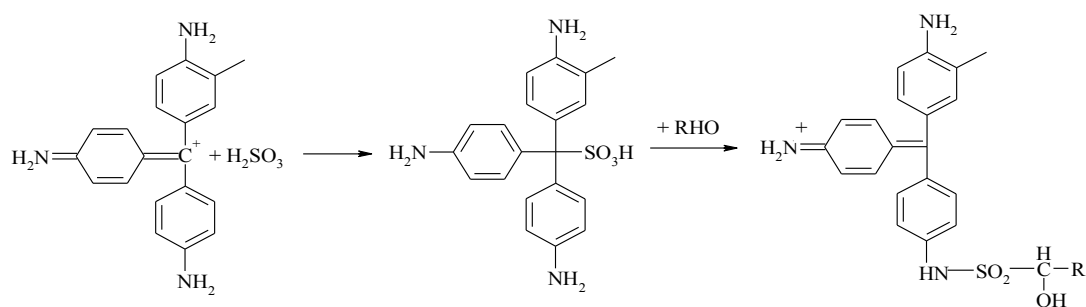
#### Якісні реакції на мускарин

**Реакція з реактивом Драгендорфа.** До сухого залишку на фарфоровій пластинці додають 1-2 краплі реактиву Драгендорфа. Виникає червоне забарвлення. Чутливість реакції становить 6 мкг.

**Реакція з дипікриламином.** До сухого залишку на фарфоровій пластинці додають 1-2 краплі 0,2 % розчину дипікриламіну в 50 % ацетоні. Виникає синьо-фіолетове забарвлення, що стає більш інтенсивним після нагрівання при 80°C впродовж 5 хв. Межа виявлення – 3 мкг.

**Реакція з реактивом Шиффа.** До сухого залишку на фарфоровій пластинці додають 1 краплю розбавленої хлоридної кислоти. Суміш перемішують скляною паличкою і додають 1 краплю реактиву Шиффа – виникає фіолетове забарвлення.

При взаємодії реактиву Шиффа з альдегідами, деякими кетонами, окисниками та ненасиченими сполуками утворюється пурпурно-фіолетовий барвник (фуксин):



**Реакція з сіллю Рейнеке.** 0,5 мл фільтрату вносять у пробірку і додають 5 крапель 2 % розчину солі Рейнеке  $(\text{NH}_4)[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{NCS})_4] \cdot 2/3\text{H}_2\text{O}$  в етанолі. Впродовж 2-3 хв випадає осад пурпурового кольору. При додаванні до суміші 5 мл ацетону осад розчиняється і колір розчину змінюється на синій.

З метою підвищення чутливості цю реакцію виконують як мікрокристалоскопічну. Для цього на предметне скло наносять 2 краплі фільтрату і 1 краплю реактиву. Предметне скло злегка підігрівують і через 5-10 хв. спостерігають під мікроскопом утворення кристалів, що мають характерну форму і забарвлення.

### Хроматографія в тонкому шарі сорбенту

На лінію старту хроматографічної пластинки «Сорбфіл», «Silufol» або іншої пластинки з закріпленим шаром силікагелю наносять 1-2 краплі досліджуваної витяжки з біологічного матеріалу. Після висихання плям пластинку поміщають у хроматографічну камеру із одною з систем розчинників:

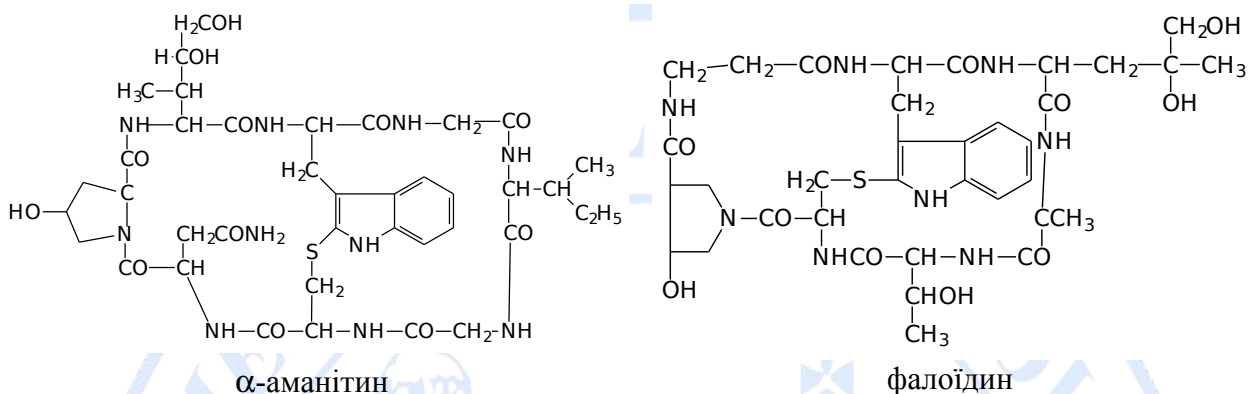
- 1) н-бутанол – метанол – вода (10 : 3 : 2),
- 2) 2-бутанол – 95 % етанол – льодяна оцтова кислота – вода (80:20:10:30).

Проявник – реактив Драгендорфа. Плями мускарину забарвлюються в оранжево-червоний колір на жовтому тлі сорбента. Чутливість виявлення мускарину можна підвищити до 0,4 мкг, обприскуючи пластинку 5 % розчином сульфатної кислоти після реактиву Драгендорфа.  $R_f$  мускарину в системі розчинників № 2 становить 0,55.

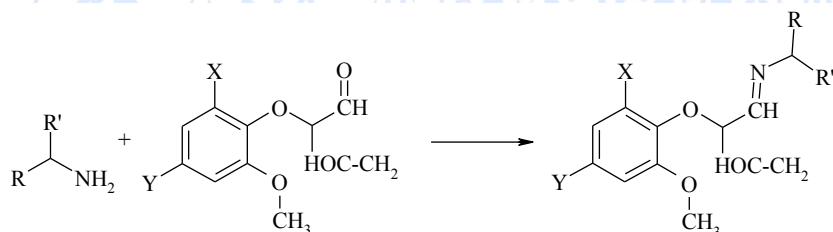
**Ізолювання пептидних токсинів білої поганки.** 10 грамів плодівих тіл досліджуваних грибів подрібнюють, поміщають у ступку і розтирають з 20 мл етилового спирту до однорідної маси. До утвореної маси додають 2 н. розчин сульфатної кислоти до рН 2 (за універсальним індикатором). Суміш залишають на 20-30 хвилин, періодично перемішуючи її за допомогою скляної палички та контролюючи величину рН. Після настоювання суміш проціджують через декілька шарів марлі. Твердий залишок відкидають, а рідину поміщають у роздільну лійку і підлужнюють 10 % розчином аміаку до рН 10.

Токсини грибів екстрагують хлороформом двічі порціями по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднують, поміщають у випарну чашку і висушують насухо на повітрі або потоком повітря. Сухий залишок використовують для дослідження на наявність грибних отрут.

### Якісні реакції на токсини білої поганки

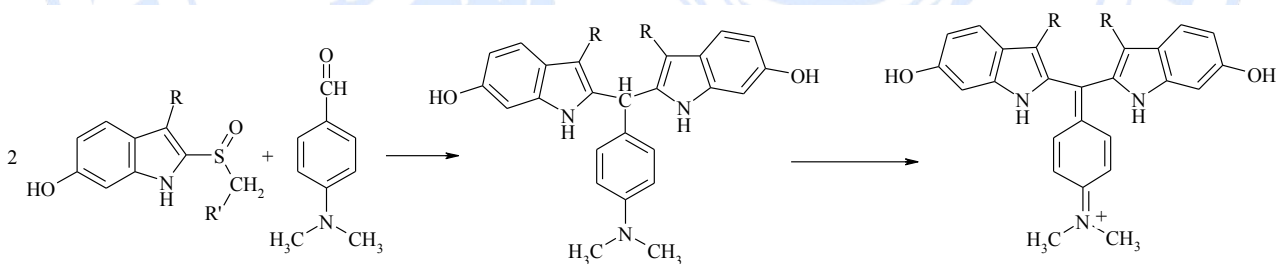


**Проба Мейкснера** застосовується для виявлення аманітинів безпосередньо у плодкових тілах та споровому порошку білої поганки. Проба Мейкснера полягає в утворенні основи Шиффа з лігніном, в складі молекул якого є альдегідні групи. Сама реакція проводиться крапельним методом безпосередньо на клаптику газетного паперу або лігніну і може бути виконана у польових умовах.



На газетний папір або лігнін наносять 1-2 краплі соку білої поганки або 2-3 краплі спиртової витяжки і чекають поки сік повністю поглинеться і пляма підсохне. На пляму наносять 1 краплю концентрованої хлоридної кислоти. При наявності анатоксинів через 1-2 хвилини виникає синя або синьо-фіолетова пляма; за невеликої концентрації забарвлення виникає повільніше.

**Реакція з реактивом Ерліха (п-диметиламінобензальдегідом).** Реакція Ерліха – це кольорова проба на індол. Індол утворюється з амінокислоти триптофану, яка є складовою частиною біциклічних олігопептидів токсинів білої поганки. п-диметиламінобензальдегід утворює з інделом продукт конденсації синього або пурпурового кольору. Ця реакція відбувається в кислому середовищі:



Реактив Ерліха є 1 % розчином п-диметиламінобензальдегіду у суміші етанолу і концентрованої хлоридної кислоти (4:1). Цей реактив може зберігатися тривалий час і використовуватися для експрес-аналізу гострих отруєнь грибами.

У пробірку вносять 0,1-0,2 мл досліджуваної витяжки з біологічного матеріалу, додають 0,5 мл реактиву Ерліха і зміст пробірки збовтують. Впродовж 1-2 хвилин виникає пурпурове забарвлення.

**Реакція з розчином хлориду паладію.** На фільтрувальний папір наносять краплю витяжки з біологічного матеріалу і додають 1-2 краплі реактиву – виникає жовте забарвлення.

Виготовлення реактиву: 0,2 г хлориду паладію (II) розчиняють в 10 мл 10 % хлоридної кислоти і доводять об'єм розчину водою до 200 мл.

**Реакція осадження.** У пробірку або у лунку на фарфоровій пластинці вносять 5 крапель досліджуваної витяжки з біологічного матеріалу. Додають по 1 краплі розчину нітропрусиду натрію, хлориду цинку і 2-3 краплі розчину піридину в спирті – випадає рожевий осад.

### **Хроматографія в тонкому шарі сорбенту**

На лінію старту хроматографічної пластинки «Сорбфіл», «Silufol» або іншої пластинки з закріпленим шаром силікагелю наносять 1-2 краплі досліджуваної витяжки з біологічного матеріалу. Пластинку поміщають у хроматографічну камеру із одною з систем розчинників:

- 1) ізобутиловий спирт – етилацетат – вода (14 : 12 : 5);
- 2) метилетилкетон – вода (1 : 1).

Після підйому фронту розчинника на потрібну висоту пластинку витягають з камери і висушують на повітрі до повного зникнення запаху органічного розчинника. Після повного висихання пластинку обробляють одним з наведених нижче способів для проявлення плям токсинів блідої поганки:

- 1) Пластинку обприскують 1 % розчином коричневого альдегіду у метанолі. Пластинку висушують і витримують в парах концентрованої хлоридної кислоти. Плями аманітинів забарвлюються у фіолетовий колір, а плями фалоїдинів – у блідо-голубий.
- 2) Пластинку обприскують розчином сульфанілової кислоти у хлоридній кислоті (діазореактив Паулі), а після підсушування – 10 % розчином карбонату калію. Плями аманітинів забарвлюються в інтенсивно-червоний колір, а фалоїдинів – у блідо-жовтий.

У протоколах студенти записують колір плям та величину їх хроматографічної рухливості ( $R_f$ ).

### **Питання для самопідготовки студентів**

1. Особливості грибів як продуктів харчування та специфіка отруєнь, що викликаються грибами.
2. Токсикологічна характеристика отруту шляпкових грибів, що діють на периферичну нервову систему.
3. Токсикологічна характеристика отруту шляпкових грибів, що діють на центральну нервову систему.
4. Токсикологічна характеристика отруту шляпкових грибів з гепатотоксичною дією.
5. Токсикологічна характеристика отруту шляпкових грибів з нефротоксичною дією.
6. Особливості ізолювання грибних отрут з біологічного матеріалу.
7. Методи хіміко-токсикологічного аналізу грибних токсинів.

### ***Розділ VI. Експрес-аналіз гострих інтоксикацій лікарськими речовинами (алкалоїдами і їх синтетичними аналогами) та отрутами природного походження***

З метою надання висококваліфікованої медичної допомоги при гострих отруєннях невідомими речовинами, необхідно проводити лабораторно-токсикологічну діагностику отруєнь, яка передбачає:

– специфічне токсикологічне обстеження для екстреного виявлення токсичних речовин у біологічних середовищах організму;

- специфічне обстеження з метою визначення характерних змін біохімічного складу крові;
- неспецифічне біохімічне обстеження для діагностики важкості токсичного ураження функції печінки, нирок та інших органів і систем.

Інструментальні експрес-методи визначення токсичних речовин у біологічних середовищах організму (кров, сеча, спинномозкова рідина) повинні бути швидкими (1-2 год), достатньо точними і специфічними. Ці вимоги задовольняють хроматографія в тонких шарах сорбенту, ВЕРХ, ГХ і спектрофотометрія. Вони є необхідними для правильного проведення курсу лікування та антидотної терапії.

*Загальні принципи надання невідкладної допомоги у разі гострих отруєнь.* Під час надання невідкладної допомоги застосовують наступні заходи:

- прискорене виведення токсичної речовини з організму (методи активної детоксикації);
- нейтралізація отрут за допомогою протиготрут (антидотна терапія);
- симптоматична терапія, скерована на підтримання та захист життєво важливих функцій організму, вибірково уражених токсичною речовиною.

### ***Методи активної детоксикації.***

1. Припинення контакту з отруйним середовищем (у випадках інгаляційних отруєнь). Потерпілого необхідно негайно винести із забрудненого середовища на свіже повітря.

2. Змивання токсичної речовини у разі перкутанного отруєння. Ретельно обмивають шкіру проточною водою, видаляють токсичну речовину. У разі попадання отрути в очі на кон'юнктиву її також змивають.

3. Промивання шлунка за допомогою зонда здійснюють у разі перорального отруєння. Для цього використовують 12-15 літрів води кімнатної температури (18-20°C) порціями по 250-500 мл. У разі важких форм отруєнь хворих, які втратили свідомість (отруєння снодійними та ін.), в першу добу шлунок промивають 2-3 рази. У випадку отруєння наркотичними препаратами рекомендується промивати шлунок через кожні 4 год, тому що можливе повторне надходження їх в шлунок із кишечника внаслідок зворотної перистальтики та заcodування в шлунок жовчі, яка містить метаболізовані речовини (морфін). Промивання шлунка на до госпітальному етапі приводить до зниження концентрації токсичних речовин у крові.

Після промивання шлунка вводять 100-130 мл 30 % розчину натрію сульфату (чи магнію сульфату), або вазелінової (чи соняшникової олії) як проносний засіб.

Для адсорбції токсичних речовин, які є в шлунково-кишковому тракті, використовують активоване вугілля з водою у вигляді кашки по 1-2 столові ложки всередину до і після промивання шлунка або 5-6 таблеток карболену.

За відсутності зонда виконують беззондове промивання шлунка: потерпілому дають випити 1 л води і викликають блювання, натискаючи на корінь язика. Процедуру повторюють до отримання чистих промивних вод.

Штучно не можна викликати блювання хворим у коматозному стані (можливість асфіксії та аспірації шлункового вмісту в дихальні шляхи); з порушеною серцево-судинною системою і атеросклерозом (може виникнути колапс та крововилив в мозок); вагітним (може стимулювати пологи); які перенесли судомний приступ (приступ може повторитися).

Після поступлення потерпілого в стаціонар шлунок промивають повторно, навіть якщо він був промитий на до госпітальному етапі.

4. Проносні засоби призначають практично всім хворим, навіть тим, яким промивали шлунок. Найчастіше використовують магнію сульфат або натрію сульфат в дозі 0,5 г/кг, розчинений у 200-300мл води. Як проносне можна призначати рослинне масло в дозі 0,5 г/кг (протипоказане у випадку отруєння жиророзчинними отрутами – фосфорорганічними сполуками, похідними бензолу, продуктами переробки нафти).

### Антидотна терапія

Антидотна терапія ефективна лише на початкових стадіях гострих отруєнь, тривалість яких різна і залежить від токсикокінетичних особливостей токсичної речовини.

*Антидоти, які найчастіше використовують у випадках гострих отруєнь*

Токсична речовина, яка спричинила отруєння	Назва антидоту
Анілін, калію перманганат	Аскорбінова кислота, метиленовий синій
Мухомор, пілокарпін	Атропіну сульфат (0,1% розчин)
Пахікарпін	АТФ 1%
Барбітурати	Бемегрид (0,5%)
Кислоти	Бікарбонат натрію (4% розчин)
Антикоагулянти непрямодії	Вітамін К (1% розчин)
Тубазид, фтивазид	Піридоксину гідро хлорид (5% розчин)
СО, Н <sub>2</sub> S	Кисень в інгаляції
Синильна кислота	Метиленовий синій (1% розчин)
Препарати опію	Налорфін (0,5% розчин), налоксон
Гепарин	Протамін сульфат (1% розчин)
Атропіну сульфат	Пілокарпін (1% розчин)
Укуси змій	Проти зміїна сироватка
Барій та його солі	Магнію сульфат (30% розчин)
Мідь і її солі, миш'як, сулема, фенол, ртуть	Унітіол (5% розчин)
Серцеві глікозиди	Калію хлорид, унітіол (5% розчин)
Метиловий спирт, етиленгліколь	Етиловий спирт (30% розчин всередину, 5% розчин в/в)

Антидотна терапія високо специфічна і тому може бути застосована при достовірній клініко-лабораторній ідентифікації гострого отруєння.

Нейтралізувати або зменшити дію отрути в організмі можна різними способами.

а) *Сповільнення всмоктування отрути з шлунково-кишкового тракту* досягають за допомогою неспецифічних сорбентів, обволікальних і зв'язувальних засобів (активоване вугілля, ентеросорбенти, іноді біла глина (100 г на один прийом), яєчні білки (3 на 1 л води) та ін.

б) *Нейтралізація отрут шляхом хімічної взаємодії з ними.* Розчин КМnO<sub>4</sub> при отруєнні оплатами, тіосульфат натрію нейтралізує токсичні сполуки миш'яку, ртуті, свинцю, а ціаніди переводить у родаміни, які є менш токсичними.

в) *Нейтралізація отрут, які всмокталися парентерально за допомогою хімічних антидотів.*

г) *Конкуренцію з отрутою за біохімічний субстрат.* Так, метиленовий синій використовують при отруєннях синильною кислотою, нітридами, аніліном. Він є акцептором водню, частково знімає блокаду тканинного дихання, сприяє перетворенню метгемоглобіну в гемоглобін. Налорфін, конкурентний антагоніст опіатів, ліквідує пригнічене дихання, спричинене наркотичними анальгетиками. Холінолітики та ре активатори холін естерази відіграють роль антидотів конкурентної дії у випадках отруєнь холіноміметичними та антихолінестеразними речовинами.

д) *Імунологічні антидоти* застосовують при лікуванні отруєнь укусів змій. Також запропонована моно валентна антидигоксинова сироватка у разі отруєнь дигоксином. Недоліками антитоксичної імунотерапії є мала ефективність у разі запізненого застосування (через 3-4 год після отруєння) і можливість розвитку у хворих анафілаксії)ції

Знешкодження всмоктаної отрути – антидотна терапія (введення протиотрут різного характеру).



**Заходи щодо прискороного видалення з організму токсинів** полягають у зменшенні концентрації отрути у крові і тканинах завдяки посиленому введенню рідини в організм:

1. Ентеральне зондове водне навантаження.
2. Стимуляція діурезу салуретиками.
3. Форсований діурез.
4. Гемосорбція
4. Гемодіаліз.
5. Перитонеальний діаліз.
6. Замінне переливання крові.
7. Плазмафарез.

**Боротьба з наслідками отруєння – симптоматична терапія** (регуляція життєво важливих функцій організму, які порушуються внаслідок потрапляння отрути в організм):

1. Регідратаційна терапія (ентеральна або парентеральна) до закінчення симптомів зневоднення (ексикозу).
2. Корекція електролітних порушень шляхом введення сольових розчинів, на фоні лабораторного контролю вмісту електролітів у крові.
3. Контроль та підтримка вітальних функцій.
4. Корекція балансу кислотно-лужного середовища (КЛС).
5. Глюкокортикоїдна терапія (за показаннями).
6. Введення вітаміну Е в дозі 2 мг/кг на добу перорально.
7. Внутрішньовенне введення 20% розчину глюкози з інсуліном та вітамінами С, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>.
8. В разі наявності показань – використання ШВЛ (штучна вентиляція легень).
9. Корекція гіпокальціємії.

Для виявлення лікарських препаратів, які стали причиною отруєнь в практичній роботі токсикологічних, наркологічних та судово-токсикологічних лабораторій використовують методи скринінгу.

Слово “скринінг” (screening) у перекладі з англійської мови означає «просіювання», «відбір», «сортування». З необхідністю проведення попередніх досліджень (скринінгом) хімік-токсиколог стикається під час приведення нескерованого дослідження на пошук невідомої речовини, так як невідомою речовиною може бути будь-яка з тисячі або й більше часто вживаних лікарських препаратів. Аналітичний скринінг – це система методичних прийомів, що дозволяють під час виконання пошукових операцій виключити («відсіяти») чи визначити групи речовин чи індивідуальну сполуку ще на етапі попереднього дослідження. Скринінг застосовують для аналізу багатокомпонентних сумішей, а також при неспрямованому аналізі – пошуку невідомої речовини чи групи речовин.

Хімічний скринінг за своєю суттю є поєднанням компромісних рішень багатьох тестів, які можуть бути і взаємосуперечними. Тести (аналітичні методики), що застосовуються для хімічного скринінгу, повинні бути:

1. достатньо чутливими, щоб виявляти відповідні речовини, які знаходяться у досліджуваних об'єктах у токсикологічно-значущих кількостях;
2. достатньо селективними, щоб звести до мінімуму помилково-позитивні та негативні результати;
3. достатньо ефективними (за їх вартістю і тривалістю аналізу), щоб дослідити велику кількість об'єктів за якомога коротший час.

Хімічний скринінг може складатися з серії дослідів або бути одним дослідженням, що включає в себе визначення численних параметрів (показників), який може бути завершений протягом розумного періоду часу (тобто менше, ніж за один рік або за бюджетний цикл) за розумною вартістю реактивів. Такий скринінг повинен надавати достатню інформацію для ідентифікації потенційних токсикологічно-важливих речовин, а також оцінити їх можливу

кількість. Відповідно проведений скринінг може бути основою для подальшого хіміко-токсикологічного аналізу об'єктів дослідження з метою більш повної характеристики отруйної речовини та самого отруєння.

Попередні (скринінгові) тести використовуються для зменшення обсягу зайвих досліджень та зменшення числа імовірних досліджуваних сполук за допомогою декількох дослідів. Зазвичай скринінговий тест є дуже чутливий але не специфічним. Він використовується як початковий крок для подальшого визначення імовірної причини отруєння.

Скринінг повинен виключити наявність тієї чи іншої речовини у досліджуваній пробі (абсолютний негатив) або встановити імовірність (імовірний позитив) ідентичності речовини. Ця мета найчастіше досягається шляхом виконання серії кольорових реакцій (хромогенних тестів) на ті препарати, що найчастіше застосовуються, або належать до числа заборонених засобів.

Для проведення скринінгових тестів можуть бути також використані мікрокристалічні реакції, хроматографія в тонкому шарі сорбенту чи імунохімічні методи аналізу.

Попередні випробування (тести) повинні супроводжуватися підтверджуючими реакціями для достовірної ідентифікації виявленої речовини. Ними підтверджують наявність речовини або інших речовин у зразку. Ці реакції можуть бути не настільки чутливими, але повинні бути достатньо специфічними для того, щоб застосовуватися для ідентифікації та для кількісного визначення виявленої речовини.

Ідентифікація виявлених в ході скринінгу речовин проводиться за допомогою специфічних хімічних реакцій та інструментальних методів аналізу: УФ- та ІЧ-спектроскопія, вискоефективна рідинна хроматографія, хромато-мас-спектроскопія.

При проведенні неспрямованого (не скерованого) дослідження об'єктів хіміко-токсикологічного аналізу обов'язково виконують попередні проби (скринінг) на наявність наркотичних і психотропних засобів, а також лікарських засобів, які найчастіше використовуються з метою самогубства:

Анальгетики	Похідні ацетамінофену, піразолону, саліцилової кислоти і трамадол
Антидепресанти	Трициклічні (іміпрамін, амітриптилін)
Антигістамінні засоби	Дифенгідраміні (димедрол)
Антипсихотичні	Похідні бутирофенону (галоперидол)
Транквілізатори	Похідні 1,4-бензодіазепіну
Марихуана	Тетрагідроканабінон та його похідні
Спазмолітики	Тропанові алкалоїди
Кокаїн	Кокаїн та його суміші
Наркотичні анальгетики	Ізохінолінові алкалоїди (морфін), продукти їх хімічної модифікації (кодеїн, героїн) та їх синтетичні аналоги (метадон, фентаніл)
Стимулятори ЦНС	Похідні фенілалкіламіну (амфетамін, метамфетамін), похідні фенілпропанолу (ефедрин, псевдоефедрин)
Заспокійливі засоби	Похідні барбітурової кислоти
Галюциногени	Індолові алкалоїди та похідні лізергінової кислоти

Для більшості цих токсикологічно важливих речовин розроблені скринінгові тести, які можна виконати у польових умовах. У таблиці нижче наведено перелік попередніх якісних проб на токсикологічно важливі речовини.

Речовина	Реактив	Склад реактиву	Забарвлення продукту реакції
Опіати	Маркі	Формальдегід,	Пурпуровий

Амфетаміни		концентрована сульфатна кислота	Оранжево-коричневий
Кокаїн	Тіоцанат кобальту	Тіоцанат кобальту, гліцерин, хлорид на кислота, хлороформ	Синій
Барбітурати	Ділле-Коппані	Кобальту ацетат і ізопропіламін	Фіолетово-синій
LSD та індолові алкалоїди	Ван Урка (Ерліха)	п-Диметиламінобензальдегід, хлоридна кислота, етанол	Синьо-фіолетовий
Канабіноїди (марихуана)	Дюкена	Ванілін, ацетальдегід, етанол, хлороформ	Пурпуровий
Ефедрин	Чен-Као	Міді сульфат, натрію гідроксид	Фіолетовий
Саліцилати	Феруму (III) хлорид	Феруму (III) заліза	Синьо-фіолетовий
Похідні піразолону	Нітрузування	Нітрит натрію, хлоридна кислота	Зелений / фіолетовий
Фенотіазини	ФПН	Хлорид заліза, хлоратна кислота, нітратна кислота	
Метамфетамін, вторинні аміни	Саймона	Натрію нітропрусид, натрію карбонат, ацетальдегід (ацетон)	Синій (з ацетоном – пурпуровий)

## Заняття 8

### ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ БАРБІТУРАТАМИ

**Актуальність теми:** В клінічній практиці частими є випадки гострих отруень снодійними засобами, в тому числі і барбітуратами. Тому оволодіння методиками експрес-аналізу біологічних рідин на наявність барбітуратів є актуальним.

**Мета:** Навчити студентів методик експрес виділення, виявлення та кількісного визначення барбітуратів в крові та сечі.

**Навчальні цілі:** В процесі лабораторного заняття навчити студентів:

1. техніки ізолювання барбітуратів з біологічних рідин;
2. проводити попередні проби на виявлення барбітуратів в крові та сечі;
3. ідентифікувати барбітурати та їх метаболіти методами хроматографії (ТШХ та ГРХ) та УФ-спектроскопії;
4. визначати кількісний вміст барбітуратів фізико-хімічними методами аналізу.

**Міжпредметна інтеграція:** Студенти повинні знати:

- механізм токсичної дії та клінічну картину гострих отруень барбітуратами (клінічна фармація);
- шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму, шляхи виведення з організму барбітуратів (фармакологія, клінічна фармація);
- реакції виявлення барбітуратів (фармацевтична хімія, токсикологічна хімія);
- особливості хроматографічних та спектрофотометричних методів аналізу (аналітична хімія);
- надання першої медичної допомоги та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні барбітуратами.

Всі барбітурати – слабкі кислоти з  $pK_a$  від 7,24 (фенобарбітал) до 7,96 (пентобарбітал). Кислотні властивості зумовлені кето-енольною та лактам-лактимною таутомерією.

Всмоктування із шлунково-кишкового тракту (ШКТ) залежить від:

- 1)  $pK_a$  – тому що ця величина впливає на проходження речовин через мембрани (речовини в неіонізованій формі всмоктуються краще);
- 2) ліпофільності;
- 3) пасивної дифузії (для речовин з великою молекулярною масою – дифузія менша).

Полярна частина молекули (незаміщене кільце барбітуратів) є однією із найбільших неіоногенних водорозчинних функціональних груп. В молекулі барбітуратів ці полярні групи з'єднані з неполярними ділянками молекул –  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  (алкільні, арильні, галогеналкільні тощо), таким чином коефіцієнт розподілу ( $K_p$ ) між ліпідною і водною фазами для молекул барбітуратів в основному близький до 100. Тобто у барбітуратів з однієї сторони наявні достатні характеристики розчинності для доброго всмоктування із ШКТ та доброго транспортування у водну частину біологічних рідин, а з другої сторони – барбітурати характеризуються достатньою ліпофільністю, щоб проникати в центральну нервову систему (ЦНС), де їхні неіоногенні характеристики можуть сприяти зв'язуванню з ліпопротеїнами.

Барбітурати використовують у медичній практиці як заспокійливі, снодійні, протисудомні засоби та для наркозу. Сон під дією барбітуратів, за своїм перебігом відрізняється від природного сну. Барбітурати полегшують засинання, але змінюють фазову структуру сну. Ці препарати швидко всмоктуються в шлунково-кишковому тракті та проникають через гемато-енцефалічний бар'єр.

Смертельна доза від 2 до 20 г.

Токсична дія препаратів пов'язана з пригнічувальним впливом на ЦНС (вимиканням функції вищих вегетативних центрів).

Розрізняють три ступені отруєнь барбітуратами. *Легкий ступінь отруєння*, який проявляється сонливістю але сон неглибокий (хворий пробуджується на оклик або від больового подразнення), м'язовий тонус дещо знижений, рефлекси збережені. *Отруєння середньої важкості* – патологічний сон, знижений м'язовий тонус з пригніченням рефлексів, зіниці помірно звужені, гіперсаливація, бронхорея, дещо знижені АТ і температура. Олігурія. *Бабітурова кома* – глибоке пригнічення ЦНС. Спостерігають арефлексію, відсутність дефекації і сечовипускання. Часто міоз. Унаслідок пригнічення судинно-рухового центру і прямого паралітичного впливу на судинну стінку розвивається гостра серцево-судинна недостатність, колапс, набряк легень. Виникає порушення дихання, інколи його зупинка (наслідок механічної асфіксії або паралічу дихального центру). У пост коматозному стані спостерігають ускладнення: пневмонія, трофічні розлади на шкірі тулуба та нижніх кінцівок, емоційна лабільність, депресія.

Помітна динаміка неврологічних симптомів отруєння і відсутність стійкої осередкової симптоматики відрізняють ці коматозні стани від ком, викликаних порушенням мозкового кровообігу або черепно-мозковою травмою.

Центральні порушення дихання спричинені прямою пригноблюючою дією токсичної дози барбітуратів і інших снодійних засобів на довгастий мозок.

Внаслідок кардіотоксичної дії барбітуратів спостерігається порушення функції серцево-судинної системи (тахікардія і гіпотонія, приглушеність тонів серця, систолічний шум).

Трофічні розлади займають помітне місце в клінічній симптоматиці гострих отруєнь снодійними засобами. Вони відмічені у вигляді бульозного дерматиту і некротичного дерматоміозиту з пролежнями, що швидко розвиваються.

Порушення функції нирок в основному пов'язані з гострою серцево-судинною недостатністю (колапс), що викликає олігурію внаслідок зниження ниркового кровообігу.

Барбітурати розподіляються по всіх тканинах і біологічних рідинах організму, але їх концентрація може бути різною залежно від жиророзчинності, зв'язків з білками, ступеня іонізації молекул, інтенсивності кровотоку в тканинах тощо.

До природних процесів детоксикації при отруєнні барбітуратами відносяться:

- 1) перерозподіл препаратів в організмі в зв'язку з їх жиророзчинністю і здатністю зв'язуватися з білками;
- 2) метаболічні перетворення в печінці в менш активні і неактивні речовини;
- 3) виділення препаратів і їх метаболітів з сечею;
- 4) розвиток гострої або хронічної толерантності до препаратів. Зв'язок барбітуратів з білками плазми в кількісному відношенні виглядає так: амітал-натрій 50-60 %, етамінал-натрій 50-55 %; фенобарбітал 15 %; барбітал 5 %.

Барбітурати легко всмоктуються в травному тракті шляхом пасивної дифузії, цей процес значно прискорюється в присутності алкоголю. Найвища концентрація в плазмі досягається для барбіталу через 4-8 год, для фенобарбіталу через 12-18 год. Ослаблення перистальтики кишечника при коматозному стані затримує барбітурати в шлунку до декількох діб.

Завдяки добрій водорозчинності, екскреція із сечею – основний шлях елімінації барбітуратів в незміненому вигляді. Реабсорбція в ниркових канальцях залежить від об'єму та рН сечі. При великих значеннях  $pK_a$  речовин їхня реабсорбція зменшується.

Барбітурати короткої дії метаболізують в більшій мірі ніж барбітурати довготривалої дії. Барбітурати (за винятком стійкого барбіталу) зазнають, в основному в печінці, таких перетворень: 1) окислення одного з радикалів в положенні 5 до спиртів; 2) окислення до кислот і кетонів (тіопентал-натрій); 3) десульфування (тіобарбітурати); 4) деметилювання (N-метилбарбітурати); 5) ароматичне гідроксилювання ароматичних радикалів; 6) N-метилювання; 7) дебензоїлювання (N-бензоїлпохідні барбітурової кислоти); 8) гідроліз піримідинового циклу з утворенням сечової кислоти (близько 8 %); 9) реакції кон'югації.

Похідні барбітурової кислоти виділяються з сечею як в незмінній формі так і у вигляді метаболітів. Барбітурати пролонгованої дії (фенобарбітал і інші), через великий відсоток зв'язування з білками плазми, в значній мірі виділяються з сечею в нативній незмінній формі (барбітал в печінці метаболізує мало і частково виводиться з жовчю через ШКТ), а барбітурати короткої дії (секобарбітал, амобарбітал тощо), які характеризуються високою ліпофільністю, інтенсивно метаболізують і виділяються з сечею переважно у вигляді метаболітів.

Таким чином, при експрес-діагностиці гострих отруєнь барбітуратами, об'єктами дослідження можуть бути кров (для барбітуратів зв'язаних з плазмою) і сеча (для барбітуратів в незміненому вигляді, а також їх метаболітів).

#### *Лікувальні заходи при отруєннях барбітуратами*

- 1) боротьба з порушенням дихання (інкубація у разі бронхореї, а при набряку гортані – трахеотомія) Відсмоктування слизу з верхніх дихальних шляхів і бронхів, штучне дихання;
- 2) оксигенотерапія;
- 3) повторні промивання шлунка, сольові проносні засоби;
- 4) форсований діурез (у 3-4 рази прискорює виведення барбітуратів з крові, зменшує коматозний період);
- 5) антидотна терапія: бемеград (антагоніст барбітуратів) 5-10 мл 0,5 % в/в або внутрішньокраплинно.

При злякисній гіпертермії: дантролен, д/в, крапельно. Для інактивації отрути в шлунку вугілля активоване у дозі 1 г/кг; цитрат магнію 5-10 % розчин.

### ***Лабораторна робота студентів***

**Попередня проба виявлення барбітуратів у сечі.** В ділильну лійку вносять 10 мл сечі та по краплях додають насичений розчин оксалатної кислоти до  $pH = 2 - 2,5$ . Проводять двократну екстракцію похідних барбітурової кислоти діетиловим ефіром (по 10 мл). Ефірні витяжки з'єднують і випаровують насухо. Сухий залишок розчиняють в 1 мл хлороформу. До

хлороформного розчину додають 2 краплі свіжовиготовленого 1 % розчину літію гідроксиду в метанолі. Поява голубого забарвлення вказує на наявність барбітуратів у сечі.

**Виділення барбітуратів із крові.** В колбу на 50 мл вносять 5 мл крові, додають насичений розчин оксалатної кислоти до  $\text{pH} = 2 - 2,5$  і залишають на 30 хв при періодичному перемішуванні. Потім в колбу додають 5 мл 30 % водного розчину трихлорацетатної кислоти. Вміст колби перемішують, кількісно переносять в центрифужну пробірку і центрифугують 30 хв при 6000 об/хв. Надосадову рідину зливають. До осаду додають розчин оксалатної кислоти, перемішують скляною паличкою і настоюють 10 хв при періодичному перемішуванні. Потім додають 2 мл 30 % водного розчину трихлорацетатної кислоти, перемішують і центрифугують. Надосадову рідину зливають і об'єднують з надосадовою рідиною, одержаною при першому центрифугуванні. Об'єднану кислотну фазу переносять у роздільну лійку і тричі екстрагують хлороформом (по 10 мл). Хлороформні витяжки об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр, змочений хлороформом, і випаровують насухо.

Сухий залишок досліджують на наявність і вміст барбітуратів хімічними та фізико-хімічними методами.

**Виділення барбітуратів із сечі.** У ділительну лійку вносять 10 мл сечі, краплями додають насичений розчин оксалатної кислоти до  $\text{pH} = 2 - 2,5$  і 10 мл діетилового ефіру. Вміст роздільної лійки збовтують. Після розділення фаз відділяють ефірну витяжку. Водну фазу ще раз збовтують з 10 мл діетилового ефіру. Ефірні витяжки об'єднують і випаровують насухо.

Сухий залишок досліджують на наявність і вміст барбітурату за допомогою хімічних і фізико-хімічних методів.

#### **Виявлення барбітуратів за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту**

Цей метод дає змогу виявити і відрізнити один від одного окремі барбітурати та їх метаболіти. Для цього використовують системи розчинників: ацетон – хлороформ (2:8), бутанол – аміак – вода (340:3:57), бутанол – ацетатна кислота – вода (4:1:5).

Проявляють зони барбітуратів на пластинках послідовною їх обробкою 0, 01 % розчином дифенілкарбазону в хлороформі, а потім 5 % розчином  $\text{HgSO}_4$ . В зоні розташування барбітуратів появляються червоно-фіолетові або синьо-фіолетові плями.

#### **Виявлення похідних барбітурової кислоти мікрокристалоскопічними реакціями.**

У розчинах сухих залишків виявляють похідні барбітурової кислоти мікрокристалоскопічними реакціями:

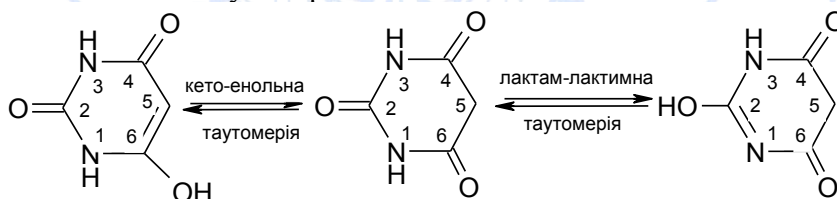
- 1) з концентрованою сульфатною кислотою;
- 2) з хлорцинкйодом;
- 3) з розчинами феруму (III) хлориду і калію йодиду;
- 4) з дийодкупратом калію в розчині йоду;
- 5) з солями купруму (II) в піридині.

Методика проведення цих реакцій, форма і забарвлення кристалів описані у занятті №

2.

#### **Виявлення барбітуратів за УФ-спектрами поглинання.**

Спектрофотометричний аналіз барбітуратів ґрунтується на здатності барбітуратів до кето-енольної або амідно-імідної таутомерії:



При  $\text{pH} 2,0$  барбітурат знаходиться в розчині у вигляді кетонної (неіонізованої) форми. При  $\text{pH} 10,0$  утворюється моноімідольна форма (в гетероциклічному ядрі виникає

подвійний зв'язок, здатний до поглинання в ультрафіолетовій області спектра, яке спостерігається при 240 нм). При рН 13, 0 і вище, в розчині присутня диімідольна форма (в кільці виникають два подвійні зв'язки максимум абсорбції яких спостерігається при 255–260 нм).

Методика виконання описана у темі заняття №3.

Метод дозволяє виявити похідні барбітурової кислоти.

Похідні барбітурової кислоти	рН	Положення максимумів поглинання
5,5-похідні (барбітал, барбаміл, бутобарбітал, фенобарбітал, циклобарбітал, етамінал)	рН 10 рН 2 рН 13	240 нм - 255
1,5,5-похідні (гексенал, бензонал)	рН 10 рН 2 рН 13	240 нм - 240
Тіобарбітурати	рН 10 рН 2 рН 13	255 та 340 нм 239 та 290 нм 305 нм.

### Аналіз похідних барбітурової кислоти в біологічних рідинах методом газорідинної хроматографії (ГРХ)

*Підготовка проби до аналізу:* 2 мл досліджуваної біологічної рідини підкислюють 0,5 мл насиченого розчину оксалатної кислоти, додають 2,5 г безводного натрію сульфату і тричі екстрагують діетиловим ефіром (і по 5 мл). Ефірний шар відділяють, розчинник випаровують.

**Методика 1.** Сухий залишок розчиняють в 1 мл хлороформу і по 2 мкл хлороформного розчину вводять у випарник газового хроматографа.

*Умови хроматографування:* хроматограф з полум'яно-іонізаційним детектором; колонка скляна чи металічна (100 см х 0,3 см); насадка – 3 % QF-1 на супелкопорті (80 – 100 меш); температура термостата випарника 200°C; температура термостата колонки 180°C; газ-носії – азот; швидкість потоку газу-носія – 24 мл/хв; швидкість водню – 30 мл/хв; швидкість повітря – 300 мл/хв.

Якісний аналіз проводять за параметрами затримування відносно ноксирону. Стандартними розчинами є хлороформні розчини барбітуратів і ноксирону з концентрацією 100 мкг/мл.

Межа виявлення: від 0,5 мкг до 1,5 мкг барбітуратів.

**Методика 2.** Сухий залишок розчиняють в ацетоні і по 1 мкл ацетонового розчину вводять в хроматограф.

*Умови хроматографування:* хроматограф з полум'яно – іонізаційним детектором (ПД); колонка з нержавіючої сталі (200 см х 0,3 см); насадка – SE-30 ( 3 %) на Хроматоні – N-DMCS (0,20 – 0,25 мм); температура термостата колонок – 210 °С; температура термостата випарника – 300 °С; газ-носії – азот; швидкість азоту і водню – 40 мл/хв; швидкість повітря – 350 мл/хв.

Межа виявлення: від 0,5 мкг до 1,5 мкг барбітуратів.

### Кількісне визначення барбітуратів

Для кількісного визначення барбітуратів, виділених з біологічного матеріалу, застосовують фотоколориметричні, спектрофотометричні та газохроматографічні методи.

**Фотоколориметричний метод.**

Сухі залишки, що містять барбітурати, розчиняють у 6 мл хлороформу. До одержаних розчинів додають по 5 мл 0, 125 % розчину кобальту ацетату в метиловому спирті і по 1 мл 50 % розчину ізопропіламіну в метиловому спирті. Оптичну густину забарвлених у фіолетовий колір розчинів вимірюють за допомогою фотоелектроколориметра (світлофільтр зелений, кювета 20 мм). Вміст барбітурату розраховують за допомогою градувального графіка.

#### **Спектрофотометричні методи.**

**Методика 1.** Сухий залишок розчиняють в 40 мл суміші, яка складається із 0,3 н. розчину амонію гідроксиду і насиченого розчину тетраборату натрію (співвідношення 1:3). Оптичну густину одержаного розчину вимірюють при допомозі спектрофотометра (кювета 1 см, довжина хвилі 240 нм). Вміст барбітуратів визначають за питомим коефіцієнтом світлопоглинання ( $E_{1cm}^{1\%}$ ), який для барбіталу становить –395, для барбіталу – 560, для фенобарбіталу – 460, для етаміналу – 395.

Вміст барбітурату у 5 мл крові розраховують за формулою:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 1000}{E_{1cm}^{1\%} \cdot l \cdot 100},$$

де: X – кількість барбітурату в 5 мл крові, мг;

D – оптична густина;

$E_{1cm}^{1\%}$  – питомий коефіцієнт світлопоглинання барбітурату;

l – товщина шару розчину у кюветі;

V – об'єм розчину, отриманого після розчинення сухого залишку, мл.

**Методика 2.** У пробірку із притертим корком вносять 1 мл плазми крові або 0,5 мл сечі. Вносять по 0,24 мл суміші насиченого розчину оксалатної кислоти з 50 % розчином фосфорно-вольфрамової кислоти (1:1), 2,5 г безводного натрію сульфату і тричі екстрагують хлороформом (6:4:4 мл). До об'єднаних хлороформних витяжок додають 4 мл дистильованої води і після енергійного збовтування центрифугують. Водний шар відкидають. До хлороформної витяжки додають 4 мл боратного буферу (рН = 13), збовтують 1 хв і центрифугують. 3 мл верхнього шару боратного буферу переносять у кювету (l=1 см) і вимірюють оптичну густину розчину з при довжині хвилі 260 нм. Розчином порівняння служить насичений хлороформом боратний буферний розчин (рН = 13).

Потім у досліджуваній розчин і розчин порівняння відміряють однакові об'єми розчину хлоридної кислоти (до рН = 10). Повторно вимірюють оптичну густину. Обчислюють різницю оптичної густини розчинів при рН = 13 і рН = 10 і розраховують концентрацію (C, мкг/мл) за формулою:

$$C = \frac{k_x \Delta D_x}{V},$$

де: V – об'єм плазми;

$k_x$  – зведений коефіцієнт вбирання світла;

$\Delta D_x$  – різниця оптичних густин при рН = 13 і рН = 10.

Величина  $k_x$  для барбіталу – 180,0, для барбіталу – 255,0, для фенобарбіталу – 200,0, для етаміналу – 340,0, середнє значення суми барбітуратів – 260,0.

**Кількісний газохроматографічний аналіз** барбітуратів проводять при умовах, які наведені вище при проведенні якісного аналізу. Кількісне визначення проводять методом абсолютного калібрування, або методом внутрішнього стандарту (внутрішній стандарт – ноксирон). Стандартні розчини барбітуратів і ноксирону готують у хлороформі або в ацетоні з концентрацією 100 мкг/мл.

### **Питання для самопідготовки студентів**

1. Токсикологічне значення барбітуратів.
2. Фізичні і хімічні властивості барбітуратів.
3. Механізми токсичної дії барбітуратів.



4. Токсикокінетика (шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму отрути, шляхи виведення з організму) барбітуратів різних спектрів дії. Вплив природи радикалів похідних барбітурової кислоти на токсикокінетику.

5. Токсикодинаміка барбітуратів.

6. Об'єкти дослідження для лабораторної експрес – діагностики гострих отруень барбітуратами та їх характеристика.

7. Попередні проби для лабораторної експрес – діагностики гострих отруень барбітуратами.

8. Методи виділення барбітуратів та їх метаболітів із різних об'єктів біологічного походження при проведенні лабораторної експрес – діагностики гострих отруень .

9. Хімічні та фізико-хімічні методи якісного та кількісного аналізу барбітуратів та їх метаболітів при експрес – діагностиці гострих отруень.

10. Інтерпретація результатів дослідження біологічних рідин на наявність і вміст барбітуратів.

11. Перша медична допомога та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні барбітуратами.

### Заняття 9

## ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ПОХІДНИМИ 1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНУ

Актуальність теми: В клінічній практиці частими є випадки гострих отруень похідними 1,4-бензодіазепіну. Тому оволодіння методиками експрес-аналізу біологічних рідин на наявність даної групи препаратів є актуальним.

Мета: Навчити студентів методик експрес виділення, виявлення та кількісного визначення похідних 1,4-бензодіазепіну в біологічних рідинах.

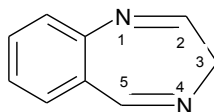
Навчальні цілі: В процесі лабораторного заняття навчити студентів:

1. техніки ізолювання похідних 1,4-бензодіазепіну з біологічних рідин;
2. проводити попередні проби виявлення похідних 1,4-бензодіазепіну в крові та сечі;
3. ідентифікувати похідні 1,4 бензодіазепіну та їх метаболіти після кислого гідролізу якісними реакціями, за продуктами флуоресценції та методом хроматографії (ТШХ);
4. визначати кількісний вміст похідних 1,4-бензодіазепіну фотоколориметрично.

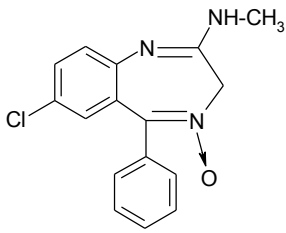
Міжпредметна інтеграція: Студенти повинні знати:

- механізм токсичної дії та клінічну картину гострих отруень похідними 1,4-бензодіазепіну (клінічна фармація);
- шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму, шляхи виведення з організму похідних 1,4-бензодіазепіну (фармакологія, клінічна фармація);
- реакції виявлення похідних 1,4-бензодіазепіну (фармацевтична хімія, токсикологічна хімія);
- особливості ТШХ та фотоколориметричного методів аналізу (аналітична хімія);
- надання першої медичної допомоги та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні похідними 1,4-бензодіазепіну.

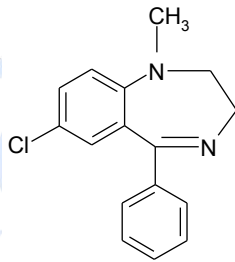
Похідні 1,4-бензодіазепіну являють собою групу лікарських засобів, що містять конденсовану систему бензольного і семичленного діазепінового кілець:



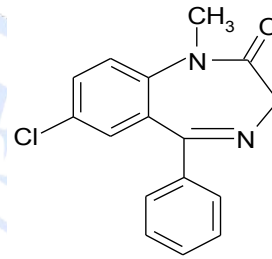
До похідних 1,4-бензодіазепіну відносяться хлордіазепоксид (лібріум, хлосепід, еленіум), діазепам (седуксен, сібазон, реланіум, валіум, апаурин), оксазепам (нозепам, тазепам), нітразепам (еуноктин, радедорм) та ін.



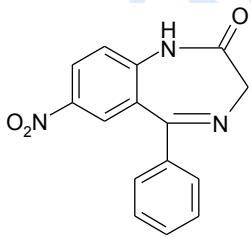
Хлордіазепоксид



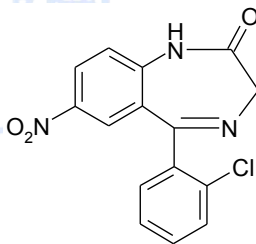
Мезапам (медазепам, рудотель)



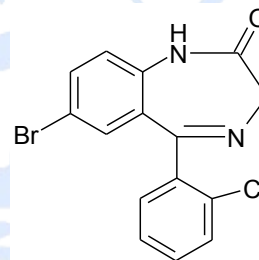
Діазепам



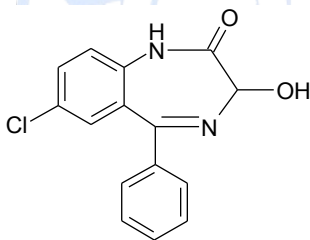
Нітразепам



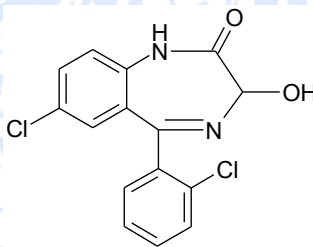
Клоназепам (антелепсин)



Феназепам



Оксазепам



Лоразепам (тавор, атіван)

Похідні 1,4-бензодіазепіну відносяться до групи транквілізаторів. Вони проявляють снодійну, психотропну, протисудомну, антиаритмічну, центральну міорелаксантну, анксиолітичну (антифобічну) дію, заспокійливо діють на ЦНС, потенціюють дію анальгетиків та снодійних засобів. Смертельна доза похідних 1,4-бензодіазепіну 1 – 2 г, токсична концентрація у крові становить 5 – 20 мг/л, смертельна – понад 50 мг/л.

Психотропна і нейротоксична дія зумовлені гальмуванням ЦНС, ослабленням процесів збудження підкоркових утворень головного мозку, гальмуванням нейронів спинного мозку і таламуса (центральна міорелаксація).

Клінічні ознаки отруєння подібні до симптомів при отруєнні барбітуратами.

Швидко всмоктуються із шлунку та тонкого кишечника, знаходяться позаклітинно утворюючи неміцний зв'язок з білками.

Зв'язуються з білками плазми, у вільному стані в плазмі знаходиться лише 5–10 % введеної дози речовини. Добре проникають крізь плацентарний і гематоенцефалічний бар'єри. У лікворі міститься майже така ж кількість як і у крові. Максимальна концентрація в плазмі похідних 1,4-бензодіазепіну спостерігається через 2-3 год.

Фармакокінетичні константи деяких похідних 1,4-бензодіазепіну:

Лікарський засіб	pKa	Період піввиведення (T <sub>1/2</sub> , год)	Об'єм розподілу Vd	Зв'язування з білками (%)
Хлордіазепоксид	4,6	8–28	0,3–0,5	94-97

Діазепам	3,3	20–96	0,7	98
Нітразепам	3,2	21–28	2,1	85
Оксазепам	1,7; 11,6	7–14	1,6	90

Похідні бензодіазепіну піддаються перетворенням в основному у печінці під впливом ферментів мембран цитоплазматичного ретикулу гепатоцитів. Перетворення йдуть в двох основних напрямках: N-деметилування і гідроксилювання бензодіазепінового циклу в положеннях 3 і 9. Утворюються три основних метаболіти: дезметилдіазепам, 3-оксидіазепам і оксазепам. Оксазепам є діючим біологічноактивним метаболітом всіх похідних бензодіазепіну і широко використовується як самостійний лікарський засіб. Всі названі метаболіти водорозчинні.

Метаболіти інактивуються в печінці шляхом розриву діазепінового кільця з утворенням бензофенонів, або шляхом кон'югації з глюкуроною чи сульфатною кислотою. Не кон'юговані метаболіти можуть мати фармакологічну активність.

Багато бензодіазепінів метаболізують з утворенням спільних (однакових) метаболітів, наприклад амінохлорбензофенону (АХБ).

Виводяться з калом (20 %), до складу якого вони попадають з жовчю, і з сечею (60%). У сечі переважають кон'югати. Незначна кількість виводиться з організму в незміненому вигляді. Більшість бензодіазепінів екскретуються з сечею у вигляді метаболітів.

Метаболіти виявляються у сечі протягом декількох днів після однократного поступлення в організм.

В кислому середовищі (як і в організмі) похідні 1,4-бензодіазепіну розкладаються до відповідних бензофенонів (при нагріванні цей процес прискорюється). При цьому деякі бензодіазепіни утворюють однакові бензофенони. Так, хлордіазепоксид, діазепам, медазепам утворюють амінохлорбензофенон (АХБ), феназепам – амінобромхлорбензофенон (АБХБ), нітразепам – амінонітробензофенон (АНБ). Інші бензодіазепіни розкладаються з утворенням індивідуальних бензофенонів.

В кислому середовищі також руйнуються кон'югати з глюкуроною кислотою з вивільненням нативних бензодіазепінів.

*Лікувальні заходи при отруєннях похідними 1,4-бензодіазепіну:*

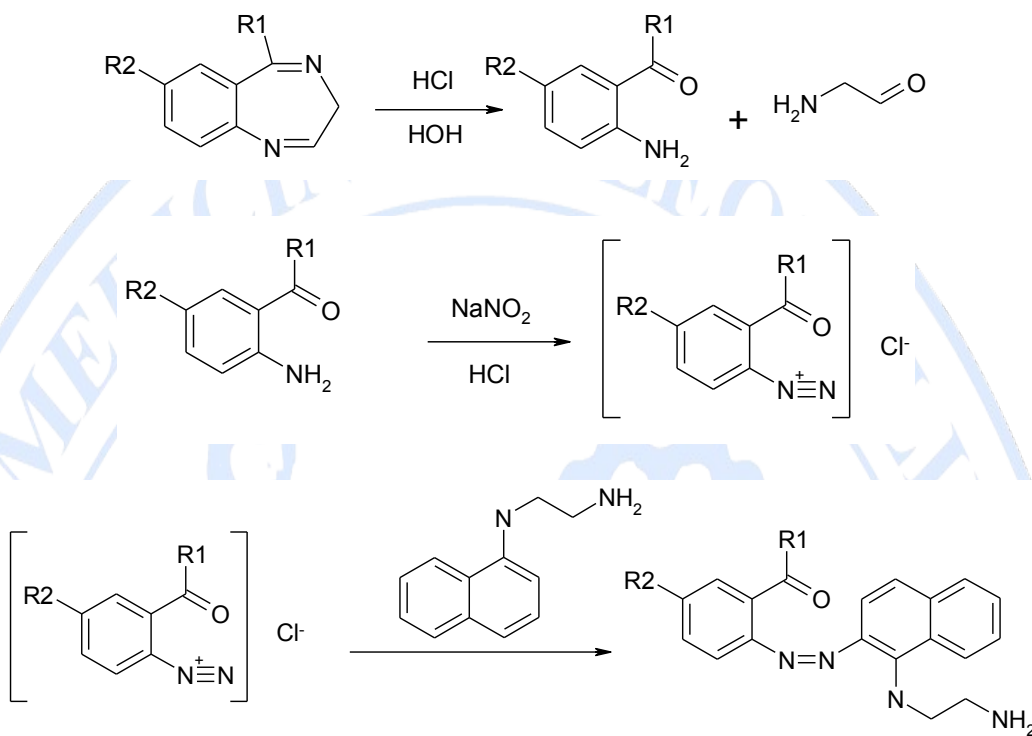
Антидотна терапія: флюмазенил д/в, крапельно; налоксон в 5 % розчині глюкози д/в, крапельно; алілнорморфін д/в.

Для інактивації отрути в шлунку: глина біла; крохмаль; вугілля активоване; цитрат магнію 5-10 % розчин; сульфат магнію 10 % розчин.

### ***Лабораторна робота студентів***

***Попередня проба на наявність хлордіазепоксиду у крові.*** Від 5 до 10 мл плазми крові або сечі підлучнюють аміаком до рН 8-9 і двічі збовтують з хлороформом по 10 мл. З'єднані хлороформні витяжки збовтують з 2 мл води. Водну фазу відділяють, а хлороформний шар збовтують з 5 мл 6 н. розчину хлоридної кислоти протягом 5 хв. Водні хлористоводневі витяжки відділяють від хлороформу, нагрівають на водяному нагрівнику, а потім ці витяжки нагрівають при 125 °С на парафіновому нагрівнику протягом 30 хв (при цьому утворюється продукт гідролізу хлордіазепоксиду – 2-аміно-5-хлорбензофенон). До охолодженої рідини додають 0,5 мл 10 % розчину натрію нітриту і через 3 хв додають 0,5 мл 0,5 % розчину амонію сульфамінату та залишають на 3 хв. Після цього додають 0,5 мл 0,1 % розчину N-1-нафтилетилендіаміну дигідрохлориду.

При наявності хлордіазепоксиду у крові або сечі появляється вишнево-червоне забарвлення:



**Попередня проба на наявність нітразепаму в сечі.** Нітразепам можна виявити в сечі у незміненому вигляді і у вигляді 7-амінопохідних та 7-ацетиламінопохідних, які є його метаболітами. Для цього 5 мл сечі підлучнюють аміаком до рН 10 і додають 250 мг натрію дитіоніту. Суміш збовтують протягом 10 хв, а потім нагрівають при 50 °С протягом години і охолоджують. Охолоджену рідину 10 хв збовтують з 10 мл суміші, яка складається з рівних об'ємів метиленхлориду і етилацетату. Органічну фазу відокремлюють і збовтують з 10 мл 5 % розчину натрію тетраборату. Водну фазу відділяють від фази органічних розчинників. Фазу органічних розчинників збовтують з 5 мл 0,2 н. розчину хлоридної кислоти і кислий водний розчин відокремлюють від фази органічних розчинників. До 4 мл охолодженої кислій водної фази додають 0,2 мл 0,4 н. розчину натрію нітриту. Через 5 хв до цієї проби додають 0,2 мл 2 % розчину амонію сульфамінату. Рідину добре перемішують і залишають на 5 хв, а потім додають 0,2 мл 0,4 % розчину N-1-нафтилетилендіаміну дигідрохлориду.

При наявності нітразепаму в сечі появляється вишнево-червоне забарвлення ( $\lambda_{\max} = 555$  нм).

## I. Експрес-аналіз за продуктами гідролізу похідних 1,4-бензодіазепіну

### Виділення похідних 1,4-бензодіазепіну із об'єктів дослідження у вигляді бензофенонів.

До 5 – 10 мл крові чи сечі додають 2 мл 2 н. хлоридної кислоти і нагрівають на водяному нагрівнику в мірній пробірці із зворотним холодильником протягом 1 год. Після охолодження до гідролізату додають насичений розчин натрію гідроксиду до рН 8-10 і екстрагують хлороформом три рази по 5 мл. Органічний шар відділяють і ділять на дві частини. Одну частину упарюють до 0,3 мл і використовують для виявлення за допомогою реакцій ідентифікації і методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

Виявлення продуктів гідролізу похідних 1,4-бензодіазепіну методом ТІІХ. На хроматографічну пластинку наносять екстракти із гідролізатів крові і гідролізати (бензофенони) речовин-свідків. Підсушену на повітрі пластинку хроматографують у камері насиченій парами системи розчинників: ацетон – хлороформ (2:8). Досліджувані речовини на пластинці виявляють за реакцією діазотування і азосполучення. Для цього пластинку обприскують послідовно: 0,1% розчином натрію нітриту, 2 н. розчином хлоридної кислоти,

через 1 хв - 0,5 % розчином амонію сульфамінату і 0,1 % лужним розчином  $\beta$  - нафтолу. Після проявлення пластинки порівнюють забарвлення та значення величин  $R_f$  досліджуваних речовин і речовин-свідків.

Кількісне фотоколориметричне визначення продуктів гідролізу похідних 1,4-бензодіазепіну. Другу частину витяжки випаровують насухо, розчиняють в 3 мл води і додають 1 мл 0,1 % розчину натрію нітриту. Через 5 хв додають 0,5 мл 1 % розчину амонію сульфамінату. Розчин струшують протягом 5 хв, а потім додають 1 мл 0,1 % лужного розчину  $\beta$ -нафтолу. Через 15 хв вимірюють оптичну густину розчину за допомогою фотоколориметра (кювета 10 мм, світлофільтр зелений).

Вміст визначають за градувальним графіком, який будують за відомими концентраціями гідролізатів (бензофенонів) відповідних бензодіазепінів.

## **II. Експрес-аналіз похідних 1,4-бензодіазепіну без попереднього гідролізу**

Виділення похідних 1,4-бензодіазепіну із об'єктів дослідження. До 5-10 мл біологічної проби (кров, сеча, перитонеальна рідина тощо) додають насичений розчин оксалатної кислоти до рН 2,0 – 2,5 і настоюють при перемішуванні 1 год. Потім пробу переносять у роздільну лійку, додають розчин амонію гідроксиду до рН 7,0 і проводять дворазову екстракцію хлороформом (по 5 мл). Хлороформну витяжку відокремлюють, а до водної витяжки у роздільній лійці додають розчин амонію гідроксиду до рН 10,0 і тричі екстракують хлороформом (по 5 мл). Всі хлороформні витяжки об'єднують і фільтрують через паперовий фільтр, змочений хлороформом і упарюють до 3 мл. Дану витяжку використовують для дослідження.

Виявлення похідних 1,4-бензодіазепіну за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту. На дві хроматографічні пластинки ("Silufol" та скляну пластинку із закріпленим шаром сорбенту) наносять по 0,25 мл упарених досліджуваних хлороформних витяжок і розчини негідролізованих речовин-свідків. Обидві пластинки хроматографують у системі розчинників: ацетон – хлороформ (2:8). Досліджувані речовини на пластинці «Silufol» спочатку виявляють за флуоресценцією в УФ-променях, а потім проявляють реактивом Драгендорфа.

Скляну хроматографічну пластинку спочатку розглядають в УФ-променях. Потім її обприскують 6 н. розчином хлоридної кислоти, по краях пластинки у горизонтальному положенні кладуть вузькі предметні скельця (товщиною 2-3 мм) і зверху накривають скляною пластинкою по всьому периметру хроматографічної пластинки. В такому положенні хроматографічну пластинку поміщають у термостат на 45 хв при 120 °С. Після охолодження пластинки її обприскують послідовно: 0,1 % розчином натрію нітриту, 2 н. розчином хлоридної кислоти і 0,1 % лужним розчином  $\beta$  - нафтолу.

Після проявлення пластинок порівнюють забарвлення та значення величин  $R_f$  досліджуваних речовин і речовин-свідків.

### Виявлення похідних 1,4-бензодіазепіну за допомогою кольорових реакцій

Хлороформну витяжку (1 мл) вносять у ряд фарфорових чашок і випаровують до сухих залишків. До вказаних залишків додають по 2 краплі відповідних реактивів. і проводять реакції:

- з нінгідрином;
- з реактивом Маркі;
- з реактивом Фреде;
- з реактивом Манделіна;
- з реактивом Цімермана (розчин А – 1 % метанольний розчин 2,4 динітробензолу; розчин Б – 15 % розчин калію гідроксиду);
- діазотування після гідролізу витяжки.

Одержані результати порівнюють з результатами контрольних проб (реакцій з речовинами-свідками).

Виявлення похідних 1,4-бензодіазепіну за допомогою флуоресцентної реакції.

0,5 мл хлороформної витяжки випаровують до сухого залишку. При додаванні до сухого залишку концентрованих кислот (сульфатної чи хлоридної) спостерігається поява жовто-зеленого забарвлення. Продукти цієї реакції флуоресціюють при довжині хвилі 254 нм.

Ця реакція дозволяє відрізнити феназепам, діазепам, нітразепам та медазепам, які мають флуоресценцію різних кольорів:

Препарат	Колір флуоресценції ( $\lambda = 254$ нм)
Феназепам	яскраво-зелений
Діазепам	зелено-блакитний
Нітразепам	блакитний
Медазепам	фіолетово-блакитний

Нижня межа виявлення: 5-10 мкг речовини у досліджуваній пробі.

Кількісне визначення похідних 1,4-бензодіазепіну фотоколориметричним методом.

0,5 мл хлороформної витяжки вносять у градуйовану пробірку, випаровують насухо, додають 2 мл 2 н. хлоридної кислоти. Пробу нагрівають протягом 1 год на водяному нагрівнику із зворотним холодильником. Після охолодження до гідролізату додають насичений розчин натрію гідроксиду до рН 8-10 і тричі екстрагують хлороформом (по 5 мл).

Хлороформні витяжки об'єднують та випаровують. Сухий залишок розчиняють в 3 мл 2 н. розчину хлоридної кислоти, додають 1 мл 0,1 % розчину натрію нітриту і 1 мл 0,1 % лужного розчину  $\beta$  - нафтолу (хімізм реакції див.вище). Через 15 хв вимірюють оптичну густину розчину за допомогою фотоколориметра (кювета 10 мм, світлофільтр зелений).

Вміст визначають за градувальним графіком, який будують за відомими концентраціями гідролізатів (бензофенонів) відповідних бензодіазепінів.

### **Питання для самопідготовки студентів до заняття**

1. Фізичні та хімічні властивості похідних 1,4 – бензодіазепіну.
2. Токсикологічне значення похідних 1,4 – бензодіазепіну.
3. Механізми токсичної дії похідних 1,4 – бензодіазепіну.
4. Токсикокінетика (шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму отрути, шляхи виведення з організму) похідних 1,4 – бензодіазепіну.
5. Токсикодинаміка похідних 1,4 – бензодіазепіну.
6. Об'єкти дослідження для лабораторної експрес – діагностики при гострих отруєннях похідними 1,4 – бензодіазепіну та їх характеристика.
7. Методи виділення похідних 1,4 – бензодіазепіну та їх метаболітів із об'єктів біологічного походження, що застосовують при проведенні лабораторної експрес – діагностики гострих отруень .
8. Попередня проба на похідні 1,4-бензодіазепіну в екстрактах з сечі та крові.
9. Хімічні та фізико-хімічні методи якісного та кількісного аналізу похідних 1,4 – бензодіазепіну та їх метаболітів при експрес-діагностиці гострих отруень.
10. Інтерпретація результатів дослідження біологічних рідин на наявність і вміст похідних 1,4 – бензодіазепіну. Вплив факторів та механізми їх впливу на результати аналізу.
11. Перша медична допомога та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні похідними 1,4 – бензодіазепіну.

### **Заняття 10**

### **ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ПОХІДНИМИ ФЕНОТІАЗИНУ**

Актуальність теми: В клінічній практиці зустрічаються випадки гострих отруєнь похідними фенотіазину. Тому оволодіння методиками експрес-аналізу біологічних рідин на наявність даної групи препаратів є актуальним.

**Мета:** Навчити студентів методик експрес виділення, виявлення та кількісного визначення похідних фенотіазину в біологічних рідинах.

**Навчальні цілі:** В процесі лабораторного заняття навчити студентів:

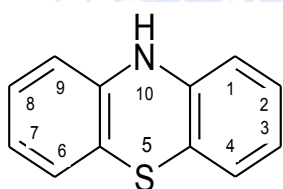
- техніки ізолювання похідних фенотіазину з біологічних рідин;
- проводити попередні проби виявлення похідних фенотіазину в крові та сечі;
- ідентифікувати похідні фенотіазину та їх метаболіти якісними реакціями та методом хроматографії (ТШХ);

- визначати кількісний вміст похідних фенотіазину фотоколориметрично.

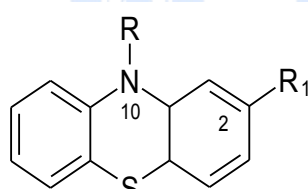
**Міжпредметна інтеграція:** Студенти повинні знати:

- механізм токсичної дії та клінічну картину гострих отруєнь похідними фенотіазину
- аміназину, дипразину, фторацизину, тизерцину, етаперазину тощо (клінічна фармація);
- шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму, шляхи виведення з організму похідних фенотіазину (фармакологія, клінічна фармація);
- реакції виявлення похідних фенотіазину (фармацевтична хімія, токсикологічна хімія);
- особливості ТШХ, УФ-спектрофотометричного та фотоколориметричного методів аналізу (аналітична хімія);
- надання першої медичної допомоги та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні похідними фенотіазину.

Препарати фенотіазинового ряду містять різні радикали у фенотіазині в положенні 2 та 10:



фенотіазин



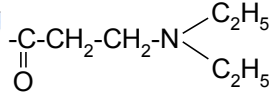
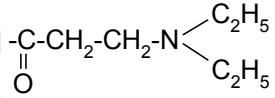
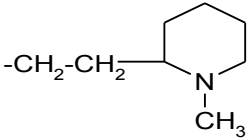
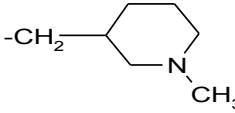
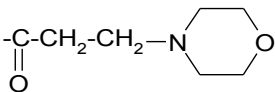
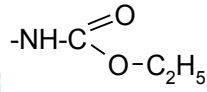
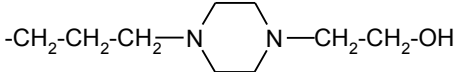
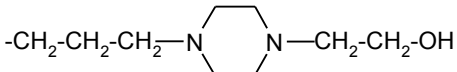
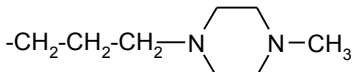
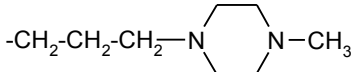
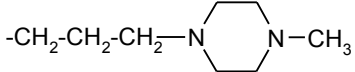
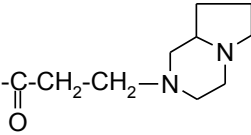
загальна формула похідних фенотіазину

Фенотіазин застосовується лише у ветеринарній практиці. В медичній практиці використовують його похідні, оскільки сам фенотіазин є токсичним.

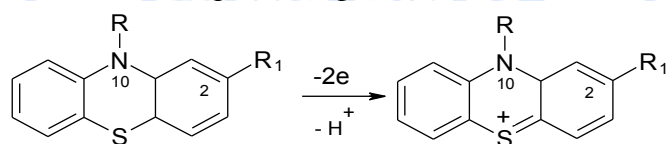
Розрізняють три типи фенотіазинів, в залежності від замісників:

- з бічним аліфатичним ланцюгом (група аміназину);
- піперидинові фенотіазини (група тіорідазину);
- піперазинові фенотіазини (група флуфеназину).

Назва препарату	R	R <sub>1</sub>
Аміназин	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-Cl
Пропазин	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-H
Дипразин	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-H
Левомепромазин (тизерцин)	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	-OCH <sub>3</sub>

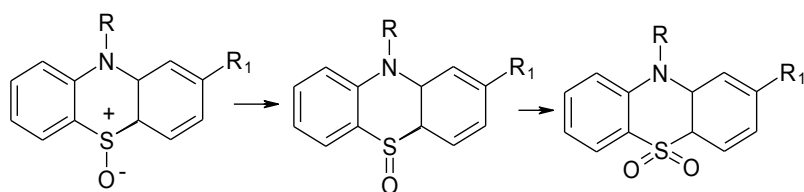
Хлорацизин		-Cl
Фторацизин		-CF <sub>3</sub>
Тіорідазин (сонапакс)		-SCH <sub>3</sub>
Мепазин		-H
Етмозин		
Етаперазин (феназин, хлорпіпазин)		-Cl
Фторфеназин (флуфеназин)		-CF <sub>3</sub>
Трифтазин (стелазин)		-CF <sub>3</sub>
Метеразин (хлормепразин)		-Cl
Тіетилперазин		-SC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Нонахлазин		-Cl

Під впливом різних окисників фенотіазин і його похідні окислюються з утворенням кольорових сполук. Хімізм цих реакцій можна виразити таким чином. Спочатку утворюється первинний продукт окиснення катіон-радикал феназтіонію:



Пізніше окиснення проходить за наступною схемою:





Похідні фенотіазину відносяться до нейролептичних засобів із широким спектром дії (психотропна, седативна, антигістамінна, протиблювотна, антипсихотична, антидепресивна, антигалюциногенна, антиаритмічна, судинорозширююча, коронаророзширююча). Вони також знижують температуру тіла, знижують тонус скелетних м'язів, знижують артеріальний кров'яний тиск, потенціюють засоби, які пригнічують ЦНС.

Токсична дія – психотропна і нейротоксична – зумовлені пригніченням ретикулярної формації мозку, гангліолітичним та адренолітичним ефектом. Токсична доза фенотіазинів – понад 500 мг. Смертельна доза 5 –10 г. Токсична концентрація у крові – 1-2 мг/л, смертельна концентрація – 3-12 мг/л.

Отруєння чи передозування даною групою препаратів супроводжується різкою слабкістю, запамороченням, сухістю у роті, нудотою. Можливі судоми та втрата свідомості, коматозний стан неглибокий, сухожиліні рефлекси підвищені, зіниці звужені. Прискорення пульсу, зниження артеріального тиску без ціанозу. Шкірні алергічні реакції. По виході з коми можливі явища паркінсонізму.

Більшість фенотіазинів є достатньо сильними основами з  $pK_a$  від 9 до 10. Відсоток зв'язування з білками плазми у них досить високий (у аміназину 91-95 %).

У крові знаходиться 60-70 % введеної дози фенотіазинів і вони включаються у enteroгепатичний цикл. Найвищі концентрації фенотіазинів знаходяться у легенях та мозковій тканині.

Висока ліпофільність фенотіазинів ( $K_p$  близько 200) сприяє їх активному всмоктуванню, а їх основний характер забезпечує схильність до утворення стійких комплексів з альбумінами плазми за типом іонних асоціатів (фенотіазини – основи, альбуміни – кислі білки), і іншими типами протеїнів, в результаті чого, фенотіазини депонуються в різних тканинах: легені > тканини мозку > печінка > нирки > селезінка.

Ксенобіотики, зв'язані з білками плазми, не піддаються клубочковій фільтрації, але можуть виділятися в ниркових каналцях. Внаслідок їх виходу із плазми буде відбуватися дисоціація комплексу білок–фенотіазин до встановлення рівноваги між зв'язаними і вільними молекулами в плазмі. Звільнена фракція виводиться, а наведений процес буде повторюватися до повного виведення речовини. Особливості екскреції ліпофільних сполук полягає в тому, що навіть після проникнення їх через клітинні мембрани, вони можуть пасивно реабсорбуватися завдяки градієнту концентрацій. Крім того, полярні метаболіти ліпофільних сполук переважно швидко повертаються в кровообіг і лише потім виводяться.

Фенотіазини метаболізують з утворенням великих кількостей метаболітів (до 160). В організмі похідні фенотіазинів піддаються метаболізму шляхом:

- 1) N–деметилування (~ 20 %),
- 2) N–деалкілування,
- 3) гідроксилування ( $\approx$  30 %) по аліфатичному ланцюгу та ароматичному циклі в *n*-положенні до атома нітрогену фенотіазинового циклу,
- 4) окиснення сірки до сульфоксиду і сульфону (~ 6 %),
- 5) реакції кон'югації з глюкуроновою, сульфатною та ацетатною кислотами.

Окислені ( $\approx$  30%) і гідроксильовані (у *n*-положенні до нітрогену) метаболіти проявляють фармакологічну активність, а глюкуроніди – фармакологічно неактивні.

Фенотіазини виводяться в однаковій мірі нирками (~ 50 %) і через ШКТ (~ 50 %). За добу виводиться близько 20 % від введеної дози. Від 10 % до 12 % виводиться у незміненому вигляді з сечею.

Сліди метаболітів фенотіазину можна виявити у сечі через 6-12 місяців. Такий довгий період виведення пояснюється сильним зв'язуванням фенотіазинів з білками плазми і тканинами організму. Висока (постійна) концентрація фенотіазинів у плазмі зумовлює їх повільний вихід із органів і тканин в яких вони депонуються.

Внаслідок особливостей розподілу фенотіазинів і їх метаболітів, які зумовлені їх високим ступенем зв'язування в організмі, фенотіазини поволі екскретуються з сечею. І тому в сечі концентрація фенотіазинів невелика, а для дослідження беруть кров (плазму).

*Лікувальні заходи при отруєннях похідними фенотіазину.*

1. Для зняття екстрапірамідних симптомів дом'язово вводять тремблекс, акінетон або біперидену–лактат; перорально – циклодол.

2. При гіпотензії - реополіглюкін та інші плазмозамінники, глюкокортикоїди довенно для усунення гіповолемії. Ангіотензинамід (гіпертензин) у фізіологічному розчині натрію хлориду або 5 % розчині глюкози, пітуїтрин дом'язово.

3. Після усунення гіпотензії проводиться форсований діурез без олушення плазми, тому що похідні фенотіазину є основами

4. Діалізуючий розчин з рН 7,1-7,25.

### *Лабораторна робота студентів*

#### **Попередня проба на наявність похідних фенотіазину в сечі**

До 1 мл сечі додають 1 мл реактиву ФНП (Фореста). Поява рожево-червоного забарвлення вказує на наявність аміназину. При наявності дипразину, тіопроперазину, метеразину, етаперазину, етацизину проявляється рожеве забарвлення, тизерцину і левомепромазину – синьо-фіолетове, етмозину – синє (трициклічний антидепресант імізін дає синьо-зелене забарвлення, яке швидко зникає), стелазину і трифтазину – оранжеве.

(Реактив Фореста (ФНП) – суміш феруму (III) хлориду, хлорної та нітратної кислот).

**Виділення похідних фенотіазину.** До 5 – 10 мл біологічної проби (кров, сеча, перитонеальна рідина тощо) додають 20 мл 30 % розчину ацетатної кислоти до рН 2,0-2,5 і залишають на годину при перемішуванні. Потім додають 30 % розчин натрію гідроксиду до рН 11 – 13. При цьому випадає осад, який відцентрифугують. Центрифугат зливають, а до осаду додають 20 мл 30 % розчину ацетатної кислоти до рН 2,0-2,5 і настоюють 20 хв при перемішуванні. Потім додають розчин натрію гідроксиду до рН 11 – 13 і знову центрифугують. Центрифугати об'єднують, вносять в ділільну лійку і тричі екстрагують хлороформом (15, 10 і 5 мл). Хлороформну витяжку використовують для дослідження на наявність і вміст похідних фенотіазину (підтвердження результатів попередніх проб).

**Виявлення похідних фенотіазину за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту.** 1/5 частину хлороформної витяжки випаровують до сухого залишку, який розчиняють в 0,5 мл хлороформу. Цей розчин наносять на дві хроматографічні пластинки порівну. Поряд на лінію старту наносять розчини речовин-свідків. Одну пластинку хроматографують у системі розчинників: етилацетат-ацетон-25 % розчин аміаку в етанолі (1:1) у співвідношенні 50 : 45 : 4, а другу пластинку хроматографують у системі розчинників: етилацетат - метанол – 25 % розчин аміаку (42,5 : 5 : 2,5). Після хроматографування першу пластинку проявляють сумішшю концентрованої сульфатної кислоти і етанолу та нагрівають, а другу пластинку проявляють реактивом ФНП. Після проявлення пластинок порівнюють забарвлення та значення величин  $R_f$  досліджуваних речовин і речовин-свідків.

#### **Виявлення похідних фенотіазину за допомогою хімічних реакцій.**

2/5 частини хлороформної витяжки вносять порівну у ряд фарфорових чашок і випаровують. До сухих залишків додають відповідні реактиви і проводять такі реакції:

- з розчином феруму(III) хлориду;
- з концентрованою сульфатною кислотою;
- з концентрованою нітратною кислотою;

- з концентрованою хлоридною кислотою;
- з реактивом Маркі;
- з реактивом Манделіна;
- з бромною водою;
- з реактивом ФПН.

Після проведення кольорових реакцій одержані результати порівнюють з результатами проведених контрольних проб (аналогічних реакцій з речовинами-свідками).

**Кількісне визначення похідних фенотіазину.** Сухий залишок розчиняють в 0,5 мл 0,2 н. розчину хлоридної кислоти. Потім ще 2 рази змивають по 0,5 мл 0,2 н розчину хлоридної кислоти. До 1,5 мл досліджуваного розчину, який містить від 20 до 100 мкг/мл похідних фенотіазину вносять (при охолодженні водою і перемішуванні суміші) 0,5 мл 1 М розчину арсенатної кислоти і 1,5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Реакційну суміш нагрівають протягом 10 хв. на водяному нагрівнику при  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , потім охолоджують до кімнатної температури. Загальний об'єм доводять до 5 мл 0,2 н. розчином хлоридної кислоти. Оптичну густину розчину вимірюють за допомогою фотоколориметра (кювета 10 мм, світлофільтр – зелений).

### Питання для підготовки студентів до заняття

1. Фізичні і хімічні властивості похідних фенотіазину.
2. Токсикологічне значення похідних фенотіазину.
3. Механізми токсичної дії похідних фенотіазину.
4. Токсикокінетика (шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму отрути, шляхи виведення з організму) похідних фенотіазину.
5. Токсикодинаміка похідних фенотіазину.
6. Об'єкти дослідження для лабораторної експрес – діагностики при гострих отруєннях похідними фенотіазину та їх характеристика.
7. Попередні проби для лабораторної експрес – діагностики гострих отруєнь похідними фенотіазину.
8. Методи виділення похідних фенотіазину та її метаболітів із різних об'єктів біологічного походження при проведенні лабораторної експрес – діагностики гострих отруєнь.
9. Хімічні та фізико-хімічні методи якісного та кількісного аналізу похідних фенотіазину та їх метаболітів для лабораторної експрес – діагностики гострих отруєнь.
10. Інтерпретація результатів дослідження біологічних рідин на наявність і вміст похідних фенотіазину. Вплив факторів та механізми їх впливу на результати аналізу.
11. Перша медична допомога та засоби антидотної терапії при гострому отруєнні похідними фенотіазину.

### Заняття 11

#### ЕКСПРЕС-АНАЛІЗ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЙ ОПІАТАМИ ТА КАНАБІНОЇДАМИ

**Актуальність теми:** У зв'язку з поширенням наркоманії досить частими є випадки гострих чи смертельних отруєнь алкалоїдами опію та їх синтетичними аналогами (морфіном, кодеїном, теб'айном, папаверином, наркотином, етилморфіном, героїном), а також представниками канабіноїдів (марихуани, гашишу). Тому оволодіння методиками експрес-аналізу біологічних рідин на наявність даної групи препаратів є актуальною.

**Мета:** Навчити студентів методик експрес виділення, виявлення та кількісного визначення алкалоїдів опію, їх синтетичних аналогів та канабіноїдів в біологічних рідинах.

**Навчальні цілі:** В процесі лабораторного заняття навчити студентів:

- техніки ізолювання наркотичних сполук з біологічних рідин;

- проводити попередні проби виявлення алкалоїдів опію та канабіноїдів в крові та сечі;
- ідентифікувати алкалоїди опію, канабіноїди та їх метаболіти якісними реакціями, методами хроматографії (ТШХ; ГРХ, ВЕРХ), імуноферментним способом аналізу;
- визначати кількісний вміст досліджуваних сполук фотоколориметрично.

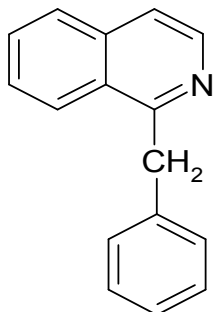
**Міжпредметна інтеграція:** Студенти повинні знати:

- механізм токсичної дії та клінічну картину гострих отруень алкалоїдами опію і їх синтетичними аналогами (морфіном, кодеїном, тебаїном, папаверином, наркотином, етилморфіном, героїном), та канабіноїдами (марихуани, гашишу, гашишною олії). (клінічна фармація);
- шляхи проникнення в організм, розподіл в організмі, напрямки метаболізму цих наркотичних сполук в організмі (фармакологія, клінічна фармація);
- експрес-методи виявлення даних наркотичних сполук (фармацевтична хімія, токсикологічна хімія);
- особливості ТШХ, УФ-спектрофотометричного, газо-хроматографічного методів аналізу (аналітична хімія);
- надання першої медичної допомоги та засоби антидотної терапії при гострих отруєннях представниками алкалоїдів опію, їх синтетичними аналогами та канабіноїдами.

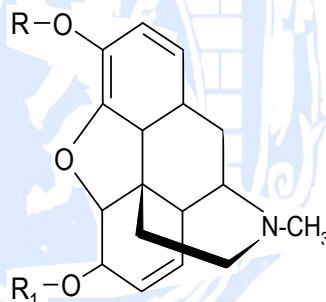
### Загальна характеристика опіатів

Опій — це висушений молочний сік, який виділяється з недостиглих головок маку снодійного. Опій може містити від 2 до 20 % алкалоїдів. В опії міститься понад 20 алкалоїдів, які належать до двох груп:

А) Похідні бензилізохіноліну  
папаверин, наркотин, нарцеїн



Б) Похідні фенантренизохіноліну  
морфін, кодеїн, тебаїн



Препарати алкалоїдів опію та їх синтетичні замінники знайшли широке застосування у медицині. Вони проявляють знеболювальну та спазмолітичну дію, характеризуються снодійним ефектом, сповільнюють внутрісерцеву провідність, знижують збудливість серцевого м'яза, викликають брадикардію, пригнічують кашлевий центр, сповільнюють перистальтику кишечника. Смертельна доза опію 2-3 г, опіатів – у межах від 100 мг до 1 г.

При отруєннях спостерігається: гіперемія обличчя, головокружіння, відчуття жару та спраги, нудота. Потім розвивається сомноленція, блідість шкіри, міоз, брадикардія, кома (поверхнєве дихання – Чейна-Стокса, ціаноз, арефлексія, зіниці звужені і не реагують на світло), зниження температури тіла. Інколи виникає збудження та судоми.

Викликають ейфорію та пристрасть, депресія та паралічі центрального характеру (депресія дихання з наступною гіпоксією), збудження центру блукаючого нерва (брадикардія тощо), центру ядра окорухового нерва (міоз) та блювотного центру.

Наркотичну дію проявляють алкалоїди опію (морфін, кодеїн, тебаїн) та його синтетичні замінники (діонін, героїн), які відносяться до похідних фенантренохіноліну.

Опій містить також ряд інших речовин і деякі з них мають діагностичне значення (меконова кислота і меконін).

Опій та його деякі алкалоїди і синтетичні аналоги мають виражену наркотичну дію.

Доказом наявності опію у крові і в сечі є виявлення в ньому морфіну, кодеїну, наркотину, меконової кислоти і меконіну. Виявлення меконової кислоти і меконіну дає змогу відрізнити опій від опіопону, в якому цих речовин немає.

**Опіопон** (пантопон) — це суміш п'яти алкалоїдів опію (морфіну – 0,67 %, кодеїну – 0,072 %, тебаїну – 0,005 %, наркотину – 0,27 % і папаверину – 0,036 %), яка не містить меконової кислоти і меконіну.

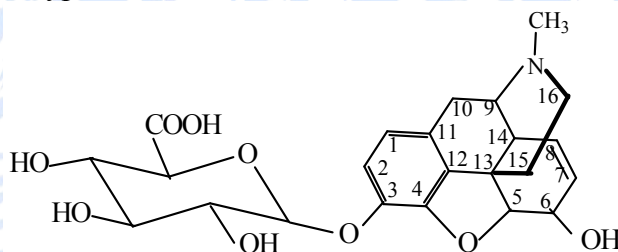
Основним шляхом метаболізму опіатів є їх біотрансформація (у першій фазі) у морфін. У другій фазі біотрансформації опіати та їх метаболіти (які мають у 3-му чи 6-му положеннях фенантренохінолінового циклу гідроксильні групи) утворюють парні сполуки (кон'югати) з глюкуроною кислотою.

**Морфін** є головним алкалоїдом опію, в якому міститься 3—20 % цього алкалоїду. У молекулі морфіну містяться атом азоту, гідроксильна група фенольного характеру і гідроксильна група спиртового характеру, які і зумовлюють хімічні властивості цього алкалоїду.

Основа морфіну мало розчиняється у воді (у холодній 1 : 5000, у гарячій 1 : 500), діетиловому ефірі (1 : 7630), бензолі (1 : 1600), хлороформі (1 : 1500), краще розчиняється в етиловому спирті (у холодному 1:250, киплячому 1 : 13).

Морфін швидко всмоктується при підшкірних та дом'язових ін'єкціях (максимальна концентрація у плазмі через 15 хв), а також при пероральному поступленні (15–60 хв). Частина морфіну із крові знову потрапляє у шлунок (це потрібно мати на увазі при отруєннях!). Близько 35 % дози морфіну зв'язується білками плазми крові. Швидко виводиться із кров'яного русла і накопичується у паренхіматозних органах (печінці, нирках, легенях, селезінці). В незміненому стані виводиться із сечею від 2 % до 12 %.

Метаболізує в основному в печінці. Від 60 до 80 % морфіну виділяється у вигляді глюкуронідів. До 15 % глюкуронідів може виводитися через ШКТ. Кількісно важливим метаболітом є морфін-3-глюкуронід:



У вигляді цього метаболіту за 48 год виводиться з сечею до 70 % введеної дози морфіну.

Незначна кількість морфіну в організмі зазнає N-деметилування (утворюється норморфін) і O-метилування (утворюється кодеїн).

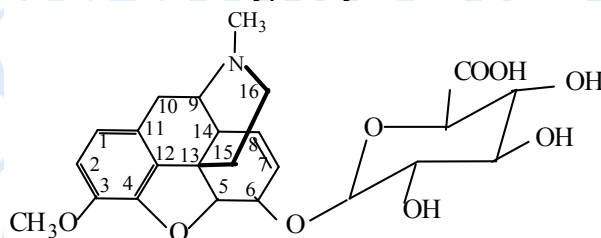
Період піввиведення морфіну становить 1,7–4,5 год. За перші 8 год після введення морфіну в організм 50 % його виділяється з організму з сечею у вигляді глюкуроніду. В сукупності різними шляхами за першу добу з організму виводиться понад 90 % введеної дози морфіну.

**Кодеїн** є монометилним ефіром морфіну. В опії міститься близько 0,2—2 % інколи до 6 % кодеїну.

Основа кодеїну розчиняється в холодній (1 : 120) і киплячій (1 : 20) воді, діетиловому ефірі (1 : 50), хлороформі (1 : 2), етиловому спирті (1 : 2).

Кодеїн добре всмоктується із ШКТ. Максимальний рівень у крові досягається за 2–4 год. Близько 30 % кодеїну зв'язується білками крові.

Кодеїн інтенсивно метаболізує. Частина кодеїну зв'язується з глюкуроною кислотою і виділяється з сечею у вигляді кодеїн–6–глюкуроніду:



Деяка кількість (10-15 %) кодеїну О-деметилується (утворюється морфін) та N-деметилується (утворюється норкодеїн) і виводиться у вигляді кон'югатів метаболітів, утворених у I-ій фазі. У сечі після вживання кодеїну поряд з метаболітами виявляється також вільний кодеїн, норкодеїн та морфін.

Незначна кількість кодеїну виділяється з сечею в незміненому вигляді. Через 6 год після надходження кодеїну в кров з організму виділяється близько двох третин дози, а через 24 год він майже повністю зникає з організму.

**Діонін (етилморфін)** одержують синтетичним шляхом із морфіну. Білий кристалічний порошок без запаху, гіркий на смак. Розчиняється у воді (1 : 12), етиловому спирті (1 : 25). Майже не розчинний у діетиловому ефірі і хлороформі.

За токсикокінетичними параметрами подібний до кодеїну (схема метаболізму наведена вище).

**Героїн (діацетилморфін, діаморфін, ацетоморфін)** — це синтетичний препарат, який добувають ацетилюванням морфіну (містить домішку – моноацетилморфін). Героїн наркотик, токсичніший від морфіну. Основа героїну розчиняється в хлороформі (1 : 5), етиловому спирті (1 : 31), діетиловому ефірі (1 : 100), важко розчиняється у воді (1 : 1700).

**Метаболізм.** Героїн є складним ефіром. Він швидко розкладається спочатку до моноацетилморфіну, а потім до морфіну і ацетатної кислоти. Період піврозпаду героїну становить 3 хв, а ацетилморфіну трохи більший. В зв'язку з цим концентрація героїну і ацетилморфіну у крові швидко знижується, а натомість концентрація морфіну (продукту метаболізму) повільно підвищується. Виділяється героїн з організму у вигляді морфіну (7-8 %) та глюкуронідів морфіну (50-60 %) і інших метаболітів морфіну (див. вище), а також у вигляді 6-ацетилморфіну (див. схему вище).

*Лікувальні заходи при отруєннях опіатами.*

Послідовність лікувальних заходів:

- 1) забезпечення адекватної вентиляції легень (санація дихальних шляхів, оксигентерапія, ШВЛ);
- 2) антидотна терапія (введення налоксону (1-2 мл), кордіаміну (2-4 мл) довенно струминно) повторно;
- 3) призначення адреноміметиків при зниженні артеріального тиску;
- 4) заходи з видалення опіатів - промивання шлунка, форсований діурез, діалізуючий р-н (рН 8,0-8,4) ;
- 5) дегідратаційна терапія (манітол, лазикс);
- 6) олужнення крові (застосовують (3% розчин гідрокарбонату натрію 200-400 мл);
- 7) застосування медикаментів, що поліпшують метаболізм в ЦНС (пірацетам, актовегін тощо).

**Аналіз опіатів.** Алкалоїди опію, меконову кислоту і меконін ізолюють з біологічного матеріалу підкисленою водою чи підкисленим спиртом. З кислого середовища із витяжок екстрагуються наркотин, меконова кислота і меконін. З лужного середовища екстрагують морфін, діонін, кодеїн і ймовірні залишки героїну.

Опіати (похідні фенантренизохіноліну) при нагріванні з концентрованими хлоридною і сульфатною кислотами при 140 — 150 °С, перетворюються на апоморфін.

Ця властивість опіатів покладена в основу їх виявлення реакцією Пелагрі та методом ТШХ (за продуктами гідролізу).

*Високоєфективна рідинна хроматографія.* Кількісне визначення вмісту героїну методом ВЕРХ проводять на колонках типу  $C_8$ ,  $C_{18}$ . В якості елюенту використовують суміші: 1 % розчин амонію ацетату (рН 5,8) – ацетонітрил (65:35); 0,015 М  $KH_2PO_4$  – ацетонітрил (70:30) та ряд інших сумішей. УФ–детектування проводиться при 235 нм.

Особливості кількісного визначення героїну методом ВЕРХ в ацетильованому опії, а також в інших кустарно виготовлених зразках пов'язані з тим, що в лужному та нейтральному водному середовищі героїн гідролізує до  $O^6$ -моноацетилморфіну. У зв'язку з цим кількісне визначення героїну проводять при рН 4-5. При рН 3,7 гідроліз героїну не проходить. Цим методом можна чітко розділити наркотиковмісні суміші, якісно і кількісно визначити мікродомішки. При застосуванні УФ-детектора з діодною матрицею можна ідентифікувати героїн в ацетильованому опії.

### ***Висновки та інтерпретація результатів експрес-аналізу опіатів***

1. Для проведення експрес-діагностики гострого отруєння опіатами найдоцільніше брати сечу через 3–15 годин після отруєння. Терапевтичні дози опіатів виводяться з організму протягом кількох годин, а деякі метаболіти – протягом 2-3 діб.

2. При отруєнні героїном необхідно проводити дослідження на морфін і його метаболіти, тому, що героїн дуже швидко гідролізує з утворенням морфіну.

3. Наявність у сечі одночасно морфіну та кодеїну, може свідчити про отруєння тільки самим кодеїном тільки в тому випадку, коли його концентрація вища від концентрації морфіну, який є метаболітом кодеїну. Доказом отруєння кодеїном служить наявність у сечі кодеїн-6-глюкуроніду.

4. Наявність у сечі морфіну та його кон'югату може вказувати на отруєння або морфіном, або героїном. Одночасна наявність у сечі 6-ацетилморфіну вказує на отруєння героїном.

5. При одночасному виявленні морфіну, кодеїну, тебаїну і наркотину проводять дослідження на меконову кислоту і меконін. При виявленні останніх, роблять висновок про отруєння опієм, а відсутність меконової кислоти і меконіну свідчить про отруєння омнопіном.

### ***Лабораторна робота студентів***

#### ***Дослідження опіатів***

*Попередня проба на наявність кодеїну в сечі.* В роздільну лійку вносять 50 мл сечі, підлужнюють розчином аміаку до рН 10, додають 50 мл хлороформу і збовтують протягом 5 хв. Хлороформну витяжку відділяють від водної фази і збовтують з 3 мл води протягом 3 хв. Водну фазу відділяють, а хлороформну витяжку фільтрують через безводний сульфат натрію і випаровують насухо. Сухий залишок розчиняють в 1 мл етилового спирту. Одержаний спиртовий розчин використовують для виявлення кодеїну за допомогою хімічних реакцій:

а) на фільтрувальний папір наносять краплю одержаного спиртового розчину і додають краплю реактиву Маркі. При наявності кодеїну пляма забарвлюється в синьо-зелений колір з фіолетовим відтінком (паралельно проводять контрольну пробу);

б) на фільтрувальний папір наносять краплю 0,5 % розчину ванадату амонію і краплю 2 % розчину сульфатної кислоти. При наявності кодеїну появляється зелене забарвлення, яке переходить в синє (паралельно проводять контрольну пробу).

#### **Виділення опіатів із об'єктів дослідження**

*Методика 1.* До 5-10 мл біологічної проби (сеча, кров, перитонеальна рідина тощо) додають насичений розчин оксалатної кислоти до рН 2,0–2,5 і настоюють при перемішуванні 1 год. Потім пробу переносять у роздільну лійку, додають розчин амонію гідроксиду до рН 8,5-9,0 і тричі екстрагують хлороформом (по 5 мл). Хлороформні витяжки об'єднують і фільтрують через паперовий фільтр, змочений хлороформом і упарюють до 2 мл.

*Методика 2.* До 5 мл сечі (крові тощо) додають 8 мл 40 % розчину натрію гідросульфату і 15 % розчин хлоридної кислоти до рН 1-2. Пробу нагрівають на киплячому водяному огрівнику 10 хв. Після охолодження додають 2 мл трихлороцтової кислоти, перемішують, залишають на 5 хв. Рідину фільтрують через паперовий фільтр і переносять у роздільну лійку. До фільтрату додають 25 % розчин амонію гідроксиду до рН 6-7 і додають кристалічний натрію гідрокарбонат до насичення (0,5 г). Проводять триразову (по 10 мл) екстракцію сумішшю: хлороформ – н-бутанол (9:1). Одержані витяжки об'єднують, фільтрують через безводний натрію сульфат і упарюють до 2 мл.

#### **Виявлення опіатів методом ТШХ**

*Методика 1.* 1/5 частину хлороформної витяжки випаровують до сухого залишку, який розчиняють в 0,5 мл хлороформу і розчин порівню наносять на дві хроматографічні пластинки. Поряд на лінію старту наносять розчини речовин-свідків (алкалоїди опію та синтетичні аналоги морфіну, конц. 20 мкг/мл). Обидві пластинки хроматографують у системі розчинників: етилацетат - метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (17 : 2 : 1). Після хроматографування і висушування пластинок, першу пластинку проявляють реактивом Драгендорфа (модифікованим за Муньє), а другу пластинку проявляють крапельним методом реактивом Маркі (суміш концентрованої сульфатної кислоти і формальдегіду). Після проявлення пластинок порівнюють забарвлення та значення величин  $R_f$  досліджуваних проб і речовин-свідків.

*Методика 1. (за продуктами гідролізу опіатів).* 1/5 частину хлороформної витяжки випаровують насухо. До сухого залишку (або до 5 мл сечі чи крові) додають 5 мл концентрованої хлоридної кислоти і нагрівають зі зворотним холодильником на гліцериновій лазні 60 хв. Гідролізати охолоджують, фільтрують і проводять дворазову екстракцію діетиловим ефіром по 5 мл. Потім до водних витяжок додають кристалічний натрію карбонат до рН 9 і проводять триразову (по 5 мл) екстракцію сумішшю: хлороформ – н.бутанол (9:1). Органічну фазу об'єднують, фільтрують через безводний натрію сульфат, упарюють до 0,5 мл і хроматографують на пластинці “Sorbfil” у системі розчинників: етилацетат - метанол – 25 % розчин аміаку (17 : 2 : 1). Як свідки використовують гідролізати опіатів, які отримують в аналогічних умовах. Пластинку проявляють реактивом Маркі (крапельним методом). Після проявлення пластинок порівнюють забарвлення та значення величин  $R_f$  гідролізітів досліджуваних проб і гідролізітів речовин-свідків (алкалоїдів опію та синтетичних аналогів морфіну).

*Системи розчинників для окремих опіатів.* Для морфіну: діетиловий ефір – ацетон – 25 % розчин аміаку (40 : 20 : 2). Для кодеїну: хлороформ – ацетон – діетиламін (50 : 30 : 2). Для наркотину: хлороформ – ацетон – 25 %-й розчин аміаку (30 : 30 : 2). Для етилморфіну: діетиламін – диметилформамід – етиловий спирт – етилацетат (2:5:20:75). Для героїну: ацетонітрил – етанол – вода – ацетатна кислота (50:50:50:5).

**Виявлення опіатів за допомогою хімічних реакцій.** 1/5 частини хлороформної витяжки вносять порівню у ряд фарфорових чашок і випаровують до сухих залишків. До вказаних залишків додають по 2 краплі відповідних реактивів і проводять реакції з реактивами:

*Маркі; Манделіна; Фреде; Ердмана; з розчином феруму (III) хлориду; з концентрованою нітратною кислотою; з гексаціанофератом (III) калію і феруму (III) хлоридом; реакцію Пеллагрі.*



Після проведення кольорових реакцій одержані результати порівнюють з результатами проведених контрольних проб (аналогічних реакцій вказаних реактивів з речовинами-свідками).

**Виявлення опіатів за УФ – спектрами.** УФ-спектри алкалоїдів опію у різних розчинниках мають максимуми поглинання при наступних довжинах хвиль:

Речовина	Розчинник	$\lambda$ мах, нм	Речовина	Розчинник	$\lambda$ мах, нм
<i>морфін</i>	Етанол	287	<i>героїн</i>	Етанол	281
	0,1 н. NaOH	250 та 296		0,5 н. NaOH	298
	0,1 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	284		0,1 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	279
	вода	285		0,1 н. HCl	278
<i>кодеїн</i>	етанол	286	<i>меконова кислота</i>	вода	210, 284, 303
<i>етилморфін</i>	0,1 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	285 і згин при 277	<i>апоморфін</i>	0,1 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	273 і згин при 305
<i>наркотин</i>	Етанол	291, 310	<i>папаверин</i>	0,1 н. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	250, 284, 301
	вода	313		0,1 н. HCl	

#### Виявлення алкалоїдів опію в сечі імуноферментним методом аналізу

1/5 частини досліджуваної хлороформної витяжки використовують для імуноферментного аналізу. Виявлення проводять за допомогою імуноферментної тест-системи до складу якої входять:

1. Полістиролові планшети на 96 лунок

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A

B

C

D

E

H

2. Набір з 10 реагентів (P):

P1 - 1 моль/л натрій карбонатний буферний розчин з бактеріостатиком, рН 9,6 ±0,3 (1 ампула, 4 мл)

P2 - модифікований морфін для адсорбції на планшеті, ліофілізований (1 ампула)

P3- 1,5 моль/л калій фосфатний буферний розчин з бактеріостатиком, рН 7,4±0,2 (1 ампула)

P4 - 12,5 % розчин детергенту типу твін-20 (1 ампула, 4 мл);

P5 - позитивний контроль (стандарт), 10 мкг морфіну в сольовому розчині з бактеріостатиком. (1 флакон, 1 мл);

P6 - антитіла кроликові проти опіатів, мічені пероксидазою хрину - кон'югат ліофілізований (1 ампула, 40 ±10 мкг);

P7 - 1 моль/л фосфатно-цитратний буферний розчин з бактеріостатиком (1 ампула, 1 мл);

P8 - ортофенілєндіамін (2 таблетки, 8 мг);

P9 - гідроперит (1 таблетка);

P10 - негативний контроль - сольовий розчин з бактеріостатиком (1 ампула, 1 мл).

Аналіз опіатів за допомогою ІФА починають з приготування розчинів.

РОЗЧИН 1 - Р1 розводять 20 мл дистильованої води ( зберігають не більше 10 днів при температурі 4-6° С).

РОЗЧИН 2 - Р2 розчиняють в 20 мл розчину 1 (використовують протягом години).

РОЗЧИН 3 - Р3 розчиняють в 600 мл дистильованої води (зберігають не більше 7 днів при температурі 4 - 6 °С).

РОЗЧИН 4 - Р4 розчиняють в 600 мл розчину 3 і використовувати для промивання планшетів (зберігають не більше 7 днів при температурі 4 - 6°С).

РОЗЧИН 5 - Р5 розчиняють в 20 мл розчину 4 до концентрації морфіну 500 мг/мл (позитивний контроль). Використовують для приготування стандартних розчинів (СР) в кількісному варіанті ІФА (зберігають не більше 5 год при температурі 4-6 °С).

РОЗЧИН 6 - Р6 розчиняють в 5 мл розчину 4 (зберігають не більше 24 год при температурі 4 - 6 °С).

РОЗЧИН 7 - Р7 розвести в 21 мл дистильованої води (зберігають не більше 10 днів при температурі 4 - 6 °С).

РОЗЧИН 8 - Р8 (одну таблетку) розчиняють в 21 мл розчину 7, додаючи 0,05 мл розчину пероксиду водню. Останній готують шляхом розчинення 1 таблетки Р9 в 50 мл дистильованої води. Розчин пероксиду водню придатний для використання, якщо при розведенні його в 15 разів оптична густина при довжині хвилі 230 нм буде дорівнювати  $1,2 \pm 0,05$ .

Після одержання робочих розчинів приступають до послідовного виконання окремих операцій ІФА.

1. Адсорбція антигену ( модифікованого морфіну) на планшеті.

Планшети попередньо обробляють етанолом (20 мл на 1 планшет) і висушують в термостаті. В усі лунки вносять по 0,2 мл розчину 2 і ставлять планшет в холодильник на 18 год ( при температурі 4-6 °С), після чого розчин 2 з лунок видаляють струшуванням.

2. Промивка планшетів. В усі лунки вносять по 0,2 мл розчину 4 і через 1 хв видаляють розчин струшуванням, залишки розчину 4 - постукуванням перевернутого планшета по фільтрувальному папері. Операцію повторюють 3 рази. Промиті планшети, готові для проведення ІФА, зберігають протягом 5 днів в холодильнику.

3. Внесення позитивного контролю і СР в лунки планшета.

В лунки А1 і В1 вносять по 0,05 мл розчину 5. В лунці А1 - позитивний контроль. В лунки, починаючи з В1 до Н1, вносять по 0,05 мл розчину 4. Перемішують вміст лунки В1, відбирають 0,05 мл розчину і переносять в лунку С1, перемішують. З лунки Д1 переносять 0,05 мл у наступну лунку і так далі, до лунки Н1, з лунки Н1 0,05 мл розчину видаляють. В кожній лунці, з А1 до Н1, повинно бути по 0,05 мл СР з концентрацією морфіну 500, 250, 127, 62, 31, 15,5 і 7 нг/мл (для побудови калібрувального графіка можна приготувати на планшеті і другий ряд СР).

4. Внесення аналізованих зразків.

Беруть 0,1 мл досліджуваної сечі і до неї додають 0,9 мл розчину 4, після чого розведений в 10 разів зразок сечі вносять у 2 лунки (по 0,05 мл в кожную).

5. Внесення негативного контролю.

Негативний контроль (Р10) в кількості 0,1 мл доводять розчином 4 до об'єму 10 мл і по 0,05 мл вносять в лунки А11 і А12.

6. Зв'язування антигену з антитілами, міченими пероксидазою хрину.

В усі лунки з розчинами вносять по 0,05 мл розчину 6, струшують планшет протягом 5 хв на шейкері і інкубують в термостаті при температурі  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  протягом 30 хв.

7. Промивка планшета.

Промивку планшета проводять , як описано вище (пункт 2).

8. Додавання субстрату.

У всі лунки з аналізованими розчинами додають по 0,2 мл розчину 8, приготовленого безпосередньо перед його внесенням. Суміш витримують 10 - 15 хв в темному місці при кімнатній температурі і зупиняють реакцію, додаючи в усі лунки планшета по 0,025 мл 2 М розчину хлоридної або сульфатної кислоти. Додавання кислот для зупинки реакції необхідно проводити максимально швидко, щоб інтервал часу між додаванням кислоти в першу і останню лунку був мінімальним.

#### Оцінка результатів імуноферментного аналізу.

Результати аналізу оцінюють візуально, порівнюючи забарвлення лунок стандарту морфіну (А1 - Н1) із забарвленням лунок в досліджуваних пробах, або спектрофотометричним методом при довжині хвилі 492 нм (плейтфотометр ІФКО-2).

**Кількісне визначення імуноферментним методом.** Кількість морфіну в досліджуваних пробах визначають за градувальним (калібрувальним) графіком залежності середньої оптичної густини двох - трьох паралельних визначень від концентрації морфіну-стандарту в напівлогарифмічних координатах. По осі абсцис відкладають значення С (С - концентрація морфіну в мг/мл), по осі ординат - відношення оптичної густини D/Do (D - оптична густина стандартного розчину, Do - оптична густина «сліпого» досліджу за відсутності морфіну).

Дані для побудови калібрувального графіку заносять в таблицю, як це вказано нижче.

*Форма запису даних для побудови калібрувального графіку при ІФА*

№ з/п	С, мг/мл	Lg С	D	Do	D/Do
1	500	2,7	0,40	0,88	0,47
2	250				
3	125				
4	62				
5	31				
6	15				
7	7,5	0,9	0,68	0,88	0,80

#### **Фотоколориметричне визначення морфіну**

*Метод 1.* В мірну колбу на 25 мл вносять 5 мл розчину калію силікату, 4 мл води, 2 мл 0,5 н. розчину хлоридної кислоти, 9 мл кремній-молібденової кислоти. Через 3 хв до суміші додають 2 мл досліджуваного розчину і перемішують. Потім додають 5 мл 6% розчину аміаку. Рідина забарвлюється в синій колір. Оптичну густину забарвленого розчину вимірюють за допомогою фотоколориметра, використовуючи червоний світлофільтр і кювету з товщиною робочого шару 10 мм). Вміст морфіну визначають за попередньо побудованим градувальним графіком.

*Метод 2.* Досліджувану хлороформну витяжку випаровують. Сухий залишок розчиняють у 20 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти, розчин фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу на 25 мл і вміст колби доводять до мітки 0,1 М розчином HCl. Із мірної колби відбирають 5,0 мл розчину, вносять у пеніциліновий флакон і додають 1 мл 2%-го розчину натрію нітриту – появляється буре забарвлення. Через 15 хв додають 2 мл 10 %-го розчину аміаку і залишають на 5 хв. Внаслідок утворення 2-нітрозоморфіну появляється оранжеве забарвлення розчину. Оптичну густину забарвленого розчину вимірюють за допомогою фотоколориметра ( світлофільтр з  $\lambda_{\text{ef}} = 440$  нм, кювета – 10 мм). Вміст морфіну визначають за градувальним графіком.

#### **Екстракційно-фотоколориметричний метод визначення кодеїну**

В роздільну лійку вносять 1 мл досліджуваного хлороформного розчину, додають 9 мл ацетатної буферної суміші (рН 4,6), 5 мл 0,1 %-го водного розчину тропеоліну 00 та 4 мл хлороформу. Вміст ділильної лійки збовтують протягом 5 хв. Через 3 хв від водного шару відділяють хлороформну витяжку. Екстракцію проводять ще 4 рази.

Хлороформні витяжки об'єднують та доводять хлороформом до 25,0 мл. До 5,0 мл отриманого хлороформного розчину додають 2,5 мл 1 %-го розчину концентрованої сульфатної кислоти в метиловому спирті. Оптичну густину отриманого фіолетово-червоного розчину вимірюють за допомогою фотоелектроколометра (світлофільтр зелений з  $\lambda_{\text{эф.}} = 440$  нм, кювета 10 мм).

Розрахунок вмісту кодеїну в пробі проводять за градувальним (калібрувальним) графіком. Межа визначення – від 0,2 до 2,0 мг кодеїну в пробі.

### **Аналіз опіатів методом газорідної хроматографії**

Умови хроматографування: детектор - полум'яно-іонізаційний (ПІД); температура термостата випарника - 275°C; температура термостата детектора - 280°C; температура термостата колонок в ізотермічному режимі 250 °C; температура термостата колонок з програмуванням температури від 150 до 280 °C зі швидкістю 9 °C / за хвилину; набивна колонка довжиною 2-3 метри і діаметром 2 мм, з нанесеною фазою OV-17 (3 %), OV-101 чи SE -30 (3 % - 5 %) на носії supelcorog (90/100 меш), або капілярна колонка довжиною 10-25 метрів і діаметром 0,2 мм з нанесеною фазою OV-101; розподіл потоку газу-носія для капілярної колонки - 1 : 60; газ-носії - гелій або азот; швидкість газу-носія 20 мл/хв.

Газорідна хроматографія дозволяє розділювати компоненти опію та ацетильованого опію, а також виявляти і визначати кодеїн, морфін, героїн (діацетилморфін), моноацетилморфін, папаверин, наркотин та ацетилкодеїн.

### **Загальна характеристика канабіноїдів**

Канабіноїди – речовини природного походження, які містяться у коноплях будь-якого виду роду *Cannabis* і мають наркотичну дію. З конопель одержують такі наркотичні засоби : марихуану, гашиш і гашишну олію.

Марихуана (синонім: канабіс; жаргонні назви: травка, ботва, план, маруха, мацанка, дура, індичка) - це суміш висушених або не висушених верхівок з плодами, суцвіттями, листям та залишками стебел конопель (без центрального стовбура і гілок), які мають смолу, що містить тетрагідроканабінол. У рослині коноплі може міститися від 1 до 10 % тетрагідроканабінолу (ТГК).

Гашиш (синоніми: анаша, смола канабісу; жаргонні назви: план, божа корівка, травка, банг, дом, драп, дуд, дурь, дурдецело, дурман, золь, зуфель, кахдуд, канар, кумар) – це суміш висушеної смоли й пилку коноплі, або суміш, виготовлена шляхом обробки (подрібнення, пресування тощо) верхівок рослини коноплі з різними наповнювачами. Може бути у формі таблеток, кульок, спресованих брикетів, пасти тощо. Має характерний запах і колір від світло-зеленого до коричневого. До складу гашишу входить кілька десятків органічних речовин, макро- і мікроелементи.

Гашишна олія (жаргонна назва: хімка) – це наркотичний засіб, який одержують шляхом екстракції різними розчинниками або жирами з різних частин конопель, що вміщують тетрагідроканабіноли. Може бути у вигляді розчинів або густої в'язкої маси зеленого або темно-зеленого кольору з характерним запахом.

Наркотичні засоби, отримані з коноплі, вживають в основному палінням. При цьому марихуану та гашиш змішують з тютюном, а розчини гашишної олії або закачують в сигарету, або замочують сигарету в гашишну олію. Після висушування сигарета готова до вживання. Інколи наркотики вживають з їжею (жують, їдять з медом або цукром, п'ють з

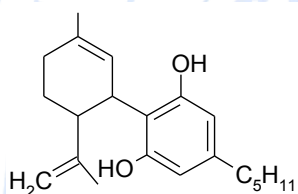
чаєм). Наприклад, марихуану чи гашиш кип'яють з молоком, а потім його п'ють. Марихуану та гашиш смажать з олією або харчовим жиром і вживають перорально. Розчини канабіноїдів вводять також парентерально.

При курінні канабіноїди швидко всмоктуються в легенях протягом декількох хвилин. Максимальна концентрація їх у крові спостерігається через 5-30 хв з наступним швидким зниженням за рахунок розподілу по тканинах і процесів метаболізму. При пероральному введенні концентрація цих речовин наростає повільно і досягає максимальних значень через 1,5—3 години.

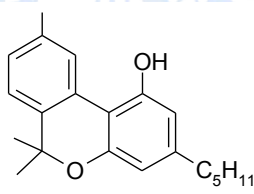
При вживанні канабіноїдів настає ейфорія, збудження, потім з'являються почуття страху, галюцинації, депресія, сонливість. Інколи виникає розлюченість, прагнення до безглузлого і жорстокого кровопролиття.

Токсична дія канабіноїдів проявляється в їх психотропній дії на ЦНС.

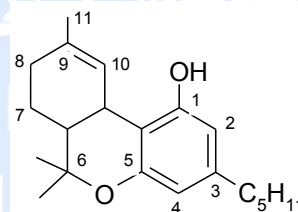
**Хімічний склад марихуани, гашишу і гашишиної олії.** До канабіноїдів належать канабінол, канабідіол, канабіцикллол, канабігерол, канабіхромен, тетрагідроканабіноли та деякі інші канабіноїди, а також їхні кислоти. Найбільш важливі з цих речовин: канабідіол (КБД), канабінол (КБ),  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол ( $\Delta^9$ -ТГК) і  $\Delta^8$ -тетрагідроканабінол ( $\Delta^8$ -ТГК), а також відповідні їм кислоти. Фармакологічно активними речовинами, що мають наркотичну дію є КБ і  $\Delta^9$ -ТГК.



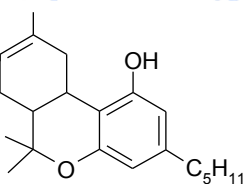
канабідіол (КБД)



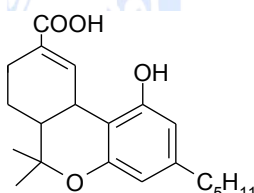
канабінол (КБ)



$\Delta^9$ -тетрагідроканабінол ( $\Delta^9$ -ТГК)

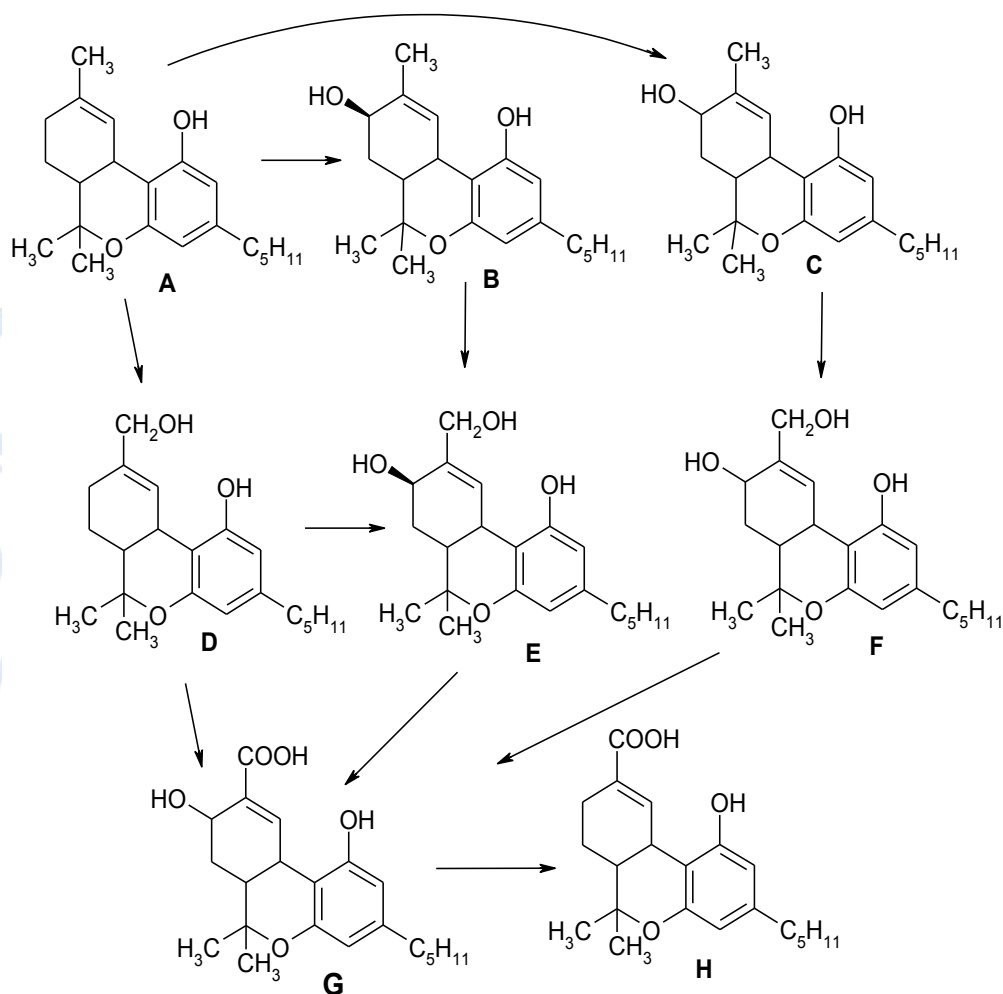


$\Delta^8$ -тетрагідроканабінол ( $\Delta^8$ -ТГК)



$\Delta^9$ -тетрагідроканабінолова кислота

**Основні шляхи метаболізму ТГК:**



**A** —  $\Delta^9$ -ТГК; **B** — 8 $\beta$ -ОН- $\Delta^9$ -ТГК; **C** — 8 $\alpha$ -ОН- $\Delta^9$ -ТГК; **D** — 11-ОН- $\Delta^9$ -ТГК; **E** — 8 $\beta$ ,11-дигідрокси- $\Delta^9$ -ТГК; **F** — 8 $\alpha$ ,11-дигідрокси- $\Delta^9$ -ТГК; **G** — 8 $\alpha$ -гідрокси- $\Delta^9$ -ТГК-кислота; **H** — 11-нор-9-карбоксі- $\Delta^9$ -ТГК-кислота

Фізіологічно активний  $\Delta^9$  - тетрагідроканабінол під дією кислот перетворюється на  $\Delta^8$ -тетрагідроканабінол, а під впливом кисню — на фізіологічно неактивний канабінол. Основним неактивним метаболітом ТГК у сечі є 11-нор-9-карбоксі- $\Delta^9$ -ТГК-кислота і її кон'югат із глюкуроною кислотою. Деякі з метаболітів ТГК активні, а 11-гідрокси- $\Delta^9$ -ТГК навіть перевершує його за своєю фармакологічною активністю.

При нагріванні гашишу до 150 °С і вище, кількість  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінолу в ньому збільшується майже на 1 %. Це збільшення відбувається за рахунок перетворення інших канабіноїдів (при підвищеній температурі) на  $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол. Очевидно, цим і пояснюється підвищена наркотична дія гашишу при курінні, ніж при вживанні іншими способами.

За 5 днів виводиться 80-90 % прийнятої дози ТГК, з них 20 % — із сечею у вигляді метаболітів, які на 80 % зв'язаних із глюкуроною чи сульфатною кислотами. При парентеральному введенні з сечею виділяється 15-25 %  $\Delta^9$ -ТГК, а з калом 37-45 %. При пероральному 10-20 %  $\Delta^9$ -ТГК виводиться з сечею, а з каловими масами — 34-44 %.

Об'єктами дослідження є слина, сеча, кров, змиви зі слизової оболонки ротової порожнини, змиви з пальців рук курців гашишу, недокурени цигарки з вмістом гашишу, напої, харчові продукти та деякі інші об'єкти.

Лікувальні заходи при отруєннях канабіноїдами.

Для інактивації отрути в шлунку: глина біла; крохмаль; вугілля активоване; цитрат магнію 5-10 % розчин; сульфат магнію 10 % розчин.

## Лабораторна робота з дослідження канабіноїдів

**Виділення канабіноїдів із об'єктів дослідження.** До 5-10 мл біологічної проби (слина, сеча, кров тощо) у роздільній лійці додають насичений розчин оксалатної кислоти до рН 4,0 – 5,0 і проводять дворазову екстракцію гексаном (по 5 мл) і 2 рази етилацетатом (5 мл). Потім у роздільну лійку додають розчин амонію гідроксиду до рН 8,0 – 9,0 і знову проводять дворазову екстракцію гексаном (по 5 мл) і 2 рази етилацетатом (5 мл). Всі витяжки об'єднують і фільтрують через паперовий фільтр, змочений гексаном і впарюють до 3 мл.

**Виявлення гашишу в слині наркоманів.** Беруть 3-5 мл слини, а потім ротову порожнину промивають 50 мл 75 %-го етилового спирту, насиченого натрію хлоридом. Слину і змив з ротової порожнини об'єднують, переносять у ділительну лійку, додають 50 мл насиченого водного розчину хлориду натрію і 10 мл етилацетату.

Вміст ділительної лійки збовтують-протягом 5 хв і залишають на такий самий час для розділення фаз. Потім відділяють фазу органічного розчинника від водної фази, яку ще 2 рази збовтують з новими порціями етилацетату (по 10 мл). Етилацетатні витяжки об'єднують, додають до них 1,5 г безводного натрію сульфату і збовтують протягом 10 хв. Потім етилацетат відфільтровують від натрію сульфату. Етилацетат упарюють до невеликого об'єму (2 — 3 краплі). В упареній етилацетатній витяжці виявляють канабіноїди хімічними реакціями та методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту так, як зазначено нижче.

**Виявлення гашишу в змивах з пальців рук наркоманів.** Пальці рук протирають тампоном вати або марлі, змоченим етиловим спиртом. З цих тампонів на повітрі випарюють етиловий спирт. Потім тампони заливають 5 мл діетилового ефіру, настоюють протягом 3—5 хв і розчинник зливають. Настоювання тампона з новою порцією діетилового ефіру (5 мл) проводять ще раз. Ефірні витяжки з тампона об'єднують і упарюють до невеликого об'єму. В упареній витяжці визначають канабіноїди методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту та хімічними реакціями, як зазначено нижче.

### Виявлення канабіноїдів хімічними реакціями

**Реакція з тривким синім Б на фільтрі.** Досліджувану витяжку випаровують насухо. Сухий залишок розчиняють у двох краплях петролейного ефіру, розчин переносять на паперовий фільтр і сушать. На одержану пляму (на фільтрі) наносять 1 мг суміші порошку тривкого синього Б і безводного натрію сульфату (1 : 100) та 2 краплі 10 %-го водного розчину натрію гідрокарбонату.

Поява на фільтрі пурпурово-червоного або фіолетового забарвлення вказує на наявність канабіноїдів. Це забарвлення є комбінацією кольорів, що дають компоненти коноплі: кислотна фракція дає жовто-оранжеве забарвлення; канабінолу – фіолетове; тетрагідроканабінолу - червоне; канабідіолу - оранжеве.

**Реакція з тривким синім Б у пробірці.** Досліджувану витяжку вносять у пробірку і випаровують насухо. Додають у пробірку невелику кількість суміші солі тривкого синього Б та натрію сульфату (у співвідношенні 2,5:100). Потім додають 25 крапель хлороформу, струшують 1 хв, додають 25 крапель 0,1 М розчину натрію гідроксиду і знову струшують дві хвилини.

Поява в нижньому (хлороформному) шарі пурпурово-червоного забарвлення вказує на можливу присутність канабіноїдів. Забарвлення верхнього шару до уваги не береться.

**Реакція з реактивом Буке.** До сухого залишку досліджуваної витяжки додають суміш, яка складається з 1 мл ацетону і 0,5 мл реактиву Буке (концентрована сульфатна кислота і етиловий спирт у співвідношенні 2 : 3). При наявності канабіноїдів появляється коричнево-червоне забарвлення. Межа виявлення — 1 мкг канабіноїдів у пробі.

**Реакція з реактивом Дюкенуа.** У пробірку вносять досліджувану витяжку, випаровують її і додають 2 мл реактиву Дюкенуа (0,4 г ваніліну розчиняють у 20 мл 95 % етанолу і додають 0,5 мл ацетальдегіду). Вміст пробірки інтенсивно збовтують протягом 2 хв.

Потім додають 2 мл концентрованої хлоридної кислоти, струшують і залишають на декілька хвилин. При наявності канабіноїдів у досліджуваному матеріалі нижній хлороформний шар забарвлюється в рожевий колір, який переходить у синій, а потім у темно-фіолетовий.

*Реакція з реактивом Паулі.* Кілька крапель досліджуваної витяжки наносять на фільтрувальний папір і обприскують реактивом Паулі (розчин А – суміш рівних об'ємів 0,5% сульфанілової кислоти в 0,1 М хлоридній кислоті і 0,5 % натрію нітриту в тій же кислоті; розчин Б – 1 М розчин натрію гідроксиду). Забарвлення плями нанесеного на папір фільтрату в жовтий колір свідчить про наявність канабіноїдів у досліджуваному об'єкті.

### **Дослідження канабіноїдів методом ТШХ**

*Метод 1.* На пластину наносять досліджувані проби, а поряд як речовини-свідки наносять екстракти марихуани (гашишу, розчину гашишної олії) з відомим складом канабіноїдів.

Хроматографування проводять в таких системах розчинників: толуен (бензен, гексан) - діетиловий ефір (4:1); петролейний ефір - діетиловий ефір (4:1); циклогексан - ізопропанол - діетиламін (7:5:1).

Як проявник використовують 0,5 % розчин тривкого синього Б (або тривкого синього ББ) у 10 % розчині натрію гідрокарбонату. Зони канабіноїдів мають різні забарвлення та різні значення  $R_f$ . Ідентифікацію канабіноїдів проводять шляхом порівняння забарвлення та величин  $R_f$  досліджуваних речовин та речовин-свідків.

*Метод 2.* Розділення канабіноїдів здійснюють за допомогою системи розчинників, яка складається з диметилформаміду і бензену (1 : 1). Крім, цієї системи для хроматографування канабіноїдів придатні системи розчинників:

- етанол - гексан (1 : 4),
- діетиловий ефір- пентан (1 : 4),
- діетиламін- гексан-бензен (1 : 10 : 25).

Потім пластинку підсушують на повітрі і обприскують реактивом Паулі (див. вище), під дією якого плями канабіноїдів на пластинці забарвлюються в жовтий або жовто-бурий колір. Ідентифікацію канабіноїдів проводять шляхом порівняння величин  $R_f$  досліджуваних речовин та речовин-свідків.

### **Дослідження канабіноїдів методом ГРХ.**

Досліджувану витяжку випаровують і розчиняють в етанолі. У випарник хроматографа вводять 1—2 мкл спиртового розчину витяжки.

*Умови хроматографування:* детектор – ПД; скляна колонка довжиною 1,5 м; твердий носій – хроматон N; рідка нерухома фаза – OV-17 (3 %); температура термостата колонки — 215 °С; температура термостатів дозатора і детектора — 250 °С; газ-носії — азот або гелій, із швидкістю 30 мл/хв. Канабіноїди ідентифікують за параметрами їх затримання.

### **Питання самопідготовки студентів до заняття**

1. Попередня проба виявлення кодеїну в сечі живих осіб?
2. Сформулюйте принцип імуноферментного методу аналізу і назвіть його етапи.
3. Дайте оцінку чутливості, специфічності і точності імуноферментного методу аналізу.
4. Яка реакція лежить в основі кількісного фотоколориметричного визначення морфіну?
5. Яка реакція лежить в основі кількісного фотоколориметричного визначення кодеїну?
6. Дайте характеристику алкалоїдів опію та синтетичних аналогів морфіну.
7. Наведіть схему метаболізму опіатів.
8. Які об'єкти дослідження придатні для експрес-діагностики гострого отруєння опіатами і чому?
9. Які висновки можна зробити при виявленні у сечі морфіну і його метаболітів? Обґрунтуйте відповідь.



10. Хімічні методи аналізу опіатів.
11. В чому полягає суть реакції Пелагрі?
12. Виділення опіатів із об'єктів дослідження.
13. Виявлення опіатів за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
14. Наведіть логічну схему аналізу для диференціації (відрізнення) опіатів.
15. Дати характеристику канабіноїдів (хімічний склад, токсична дія). $\Delta^9$ -тетрагідроканабінол
16. Дати характеристику об'єктів дослідження при отруєнні канабіноїдами.
17. Хімічні методи виявлення канабіноїдів.
18. Які проявники використовують при дослідженні канабіноїдів методом ХТШС.
19. Дослідження слини і шкіри рук на наявність канабіноїдів.

*Розділ VII. Група отруйних речовин, які ізолюються з біологічного матеріалу неполярними (малополярними) органічними розчинниками. Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного дослідження пестицидів (отрутохімікатів)*

Велику групу токсикантів складають отрутохімікати – (пестициди). *Пестициди* - речовини хімічного чи біологічного походження, що використовуються для боротьби з організмами, які шкодять оброблюваним сільськогосподарським культурам і запасам сільськогосподарських продуктів, для знищення небажаної рослинності, збудників хвороб, переносників захворювань тварин і рослин, а також для регулювання розвитку організмів.

До отрутохімікатів належать речовини різних класів неорганічних (арсено-, мідь-, ртуть-, сірковмісні сполуки) та органічних сполук: хлорорганічні пестициди (ХОП), органічні сполуки фосфору або фосфорорганічні пестициди (ФОС), похідні карбамінової кислоти, похідні сечовини та тіосечовини, похідні гетероциклічних сполук, нітропохідні пестициди, синтетичні піретроїди, органічні сполуки ртуті, органічні сполуки олова, отрутохімікати рослинного походження (алкалоїди похідні піридину і піперидину).

За спрямованістю дії пестициди поділяють на такі групи: *Інсектициди* - препарати, призначені для боротьби із шкідливими комахами; *Акарициди* - препарати для боротьби з кліщами; *Фунгіциди* – для боротьби з хворобами та фітопатогенними грибами - збудниками хвороб рослин; *Бактерициди* - для боротьби зі збудниками бактеріальних хвороб рослин, тварин та людини; *Антисептики* - препарати для запобігання руйнуванню різних матеріалів мікроорганізмами; *Гербіциди* - препарати для боротьби з бур'янами; *Зооциди (дератизатори, родентициди)* - для боротьби з гризунами; *Молюскоциди (лімациди)* - для боротьби з молюсками; *Нематоциди* - препарати для боротьби з круглими черв'яками; *Ретарданти* - регулятори росту (стимулювання та гальмування) рослин; *Дефоліанти* - для видалення листя; *Десиканти* - для підсушування рослин; *Репеленти* - для відлякування комах; *Атрактанти* - для приваблення комах; *Статеві стерилізатори комах*.

Пестициди при їх виробництві та застосуванні у сільському господарстві можуть забруднювати навколишнє середовище. Пестициди та його метаболіти і продукти розпаду, а також продукти взаємодії з іншими хімічними речовинами і хімічні домішки, які шкідливо впливають на організм, називаються залишковими кількостями пестицидів.

Пестициди потрапляють в атмосферне повітря, ґрунти, стічні та питну води, в їстівні частини рослин, у корми, у продукти харчування (молоко, м'ясо, жир, кури, яйця). Багато пестицидів здатні тривалий час зберігатися в середовищі, що оточує людину, переходити з одного об'єкта в інший, перетворюватися, надходити в організм людини і нагромаджуватися в ньому.

Отрутохімікати часто стають причиною смертельних отруєнь. Для метаболізму речовин цієї групи характерне явище «летального синтезу», при якому токсичність метаболітів є більшою ніж токсичність вихідних речовин.

## Заняття 12

### ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ПЕСТИЦИДІВ (ФОП) ТА ІНШИХ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ СПОЛУК (ФОС) ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ. ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕСТИЦИДІВ У ВИТЯЖКАХ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЕНЗИМНИМИ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Актуальність теми. Фосфорорганічні пестициди (ФОП) мають широке застосування в сільському господарстві, тваринництві та побуті. Всі ФОП є токсичними для людей і тварин. Отруєння ФОП в основному є випадковими та навмисними. Смертність при гострих отруєннях ними становить 20-25 %. Виділення ФОП із об'єктів біологічного походження є необхідним у практиці хіміка-токсиколога при аналізі об'єктів дослідження на можливість отруєння пестицидами. Виявлення фосфоровмісних пестицидів у витяжках із біологічного матеріалу фізико-хімічними і ензимними методами є необхідним в практиці хіміка – токсиколога для підтвердження ідентичності отруйних речовин.

Мета. Навчити студентів методів виділення пестицидів із об'єктів дослідження та способів ідентифікації фосфоровмісних пестицидів за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту, газорідної хроматографії і ензимними методами.

Навчальні цілі. Студенти повинні вміти:

- ізолювати пестициди із об'єктів дослідження;
- проводити очистку витяжок;
- проводити очистку речовин, виділених із біологічного матеріалу;
- правильно робити висновки по результатах аналізу і складати акт судово-токсикологічного аналізу;
- проводити аналіз фосфоровмісних отрутохімікатів за допомогою:
  - методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту;
  - методу газорідної хроматографії;
  - ензимного методу.

Міжпредметна інтеграція. Студенти, вивчивши навчальні дисципліни на попередніх курсах повинні знати: шляхи надходження пестицидних засобів в організм, їх розподіл у внутрішніх органах і тканинах та шляхи виділення із організму (фармакологія), вплив рН середовища і температури на гідроліз складних ефірів (кафедра органічної хімії), теоретичні основи екстракції (кафедра фізичної хімії і кафедра аналітичної хімії), загальні закономірності біотрансформації ксенобіотиків (кафедра біологічної хімії), біологічна роль і властивості ферментів (кафедра біологічної хімії, механізм дії і симптоми отруєння антихолінестеразними препаратами (кафедра фармакології), хімічні і фізіологічні антидоти, які використовують для лікування отруєнь антихолінестеразними препаратами (кафедра фармакології).

З попередніх курсів студенти повинні мати знання з виявлення сірковмісних сполук (кафедра біоорганічної і фармацевтичної хімії), теоретичні основи і методи хроматографії (кафедра загальної, біоорганічної і фізколоїдної хімії і кафедра токсикологічної та аналітичної хімії), закони поглинання світла розчинами, способи вимірювання оптичної густини розчинів і способи розрахунку кількості речовини в пробі за величиною оптичної густини (кафедра фізики, фізичної хімії і аналітичної хімії), основи газохроматографічного аналізу (кафедра аналітичної хімії).

Для виділення пестицидів з біологічного матеріалу використовують екстракцію органічними розчинниками, перегонку з водяною парою, вакуумну сублімацію, співвипаровування в потоці органічного розчинника, адсорбцію на різних сорбентах.

Основними методами, які забезпечують високий рівень виділення і застосовують для всіх пестицидів, є екстракція органічними розчинниками. Вибір екстрагента і умов екстракції залежить від природи об'єкта та аналізованої сполуки. Втрати пестицидів при екстракції можуть бути обумовлені розчинністю органічних розчинників у воді, а також пестицидів в ендогенних сполуках (жирах, ліпоїдах).

Метод перегонки з водяною парою застосовують для ізолювання хлорорганічних пестицидів (ХОП) – гексахлорциклогексану, гептахлору, 4,4-дихлордифенілтрихлоретану (і деяких інших речовин), із проб, які містять значну кількість жиру чи воску

Сублімація у вакуумі базується на властивостях летких пестицидів звільнюватися при невеликому вакуумі. Метод більш придатний для очищення екстрактів, ніж для ізолювання.

Співвипаровування пестицидів з парами органічного розчинника включає одночасно ізолювання і очищення полягає на виділенні аналізованих речовин з досліджуваної проби парами органічного розчинника

Адсорбцію пестицидів на різних сорбентах застосовують для ізолювання отрут з таких об'єктів як вода, повітря тощо (але не з біологічного матеріалу).

Для одержання очищених витяжок, при проведенні аналізу на стійкі пестициди, використовують сульфонування перед екстракцією отрутохімкатів органічними розчинниками. Метод застосовують для очищення витяжок багатих ліпідами.

Також ефективним методом очищення витяжок є екстракційний метод, який полягає на розподілі речовин між рідинами, що не змішуються.

Для очищення екстрактів від жирів і восків використовують спосіб виморожування, який полягає на поганій розчинності вказаних речовин в холодному ацетоні, від білків – на їх осадженні.

Широко застосовують для очищення екстрактів такі види хроматографії, як колонкова і ХТШС.

### **Лабораторна робота студентів**

#### **Виділення ФОП із біологічного матеріалу.**

I спосіб. В колбу місткістю 500 мл вносять 100 г подрібненого біологічного матеріалу і 150 мл води, підкисленої сульфатною кислотою до рН 2,0-2,5. Суміш залишають на 2 год. При цьому часто перемішують, потім проціджують через марлю. До біологічного матеріалу ще два рази додають воду, підкислену до рН 2,0–2,5 (по 75 мл) і кожний раз настоюють по 1 год., а потім зливають водні витяжки. Об'єднані кислі водні витяжки центрифугують. Центрифугат переносять в роздільну лійку, додають 30 мл хлороформу і суміш збовтують 10 хв. Хлороформну витяжку зливають. ФОП із кислої водної фази ще 4 рази екстрагують хлороформом (по 30 мл). Хлороформні витяжки з'єднують і випаровують при кімнатній температурі насухо. Сухий залишок розчиняють в 5 мл води, потім розчин фільтрують через паперовий фільтр. Фільтрат використовують для виявлення хлорофосу.

II спосіб. До 25 г подрібненого органу, поміщеного в колбу, додають 50 мл гексану і 25 г безводного натрію сульфату. Суміш залишають на 12 год. у закритій колбі при періодичному перемішуванні. Витяжку відфільтровують в колбу для відгонки розчинника чи чашку Петрі. Подрібнені органи знову заливають 50 мл гексану і настоюють при періодичному перемішуванні протягом години. Витяжку відфільтровують і приєднують до попередньої. Розчинник відганяють в роторному випарнику чи чашці Петрі при кімнатній температурі до об'єму 10-20 мл.

*Екстракційне очищення витяжок.* Сконцентровану витяжку за допомогою гексану переносять в роздільну лійку (загальний об'єм гексанової фази 25 мл). Туди ж додають 25 мл диметилформаміду (ДМФА), насиченого гексаном. Суміш енергійно збовтують протягом 3 хв. Після розділення нижню фазу (ДМФА) відділяють, операцію екстракції повторюють знову два рази. Фракції ДМФА об'єднують і зливають в 400 мл 12 % розчину натрію хлориду,

який знаходиться в роздільній лійці об'ємом 500 мл. Суміш перемішують, додають в лійку 10 мл гексану і збовтують фази протягом 3 хв. Після розподілу шарів, водну фазу відділяють і екстрагують ще два рази порціями гексану по 10 мл. Гексанові екстракти об'єднують, відмивають їх від ДМФА розчином натрію хлориду, сушать протягом 30 хв безводним сульфатом натрію (7 г) і декантують в мірну колбу ємністю 50 мл. Осад промивають не менше 3-5 разів гексаном (по 3-5) мл і приєднують до основного розчину. Об'єм розчину в мірній колбі доводять гексаном до мітки і перемішують.

*Хроматографічне очищення.* 25 мл одержаного кінцевого гексанового екстракту випаровують у чашці Петрі (при кімнатній температурі) чи роторному випарнику (при 20 °С і вакуумі-0,86 кг/см<sup>2</sup>) до об'єму 0,5 – 1 мл. За допомогою капіляру розчин наносять у вигляді риски 7 - 7,5 см на стартову лінію хроматографічної пластинки з закріпленим шаром силікагелю КСК. На відстані 2,5 - 3 см від місця нанесення досліджуваного екстракту наносять у вигляді плями діаметром 3 - 5 мм розчин речовини-свідка в бензолі (15 - 25 мкг в плямі). Через 10 хв після нанесення останньої краплі проводять хроматографування в бензолі. Хроматограми висушують при кімнатній температурі протягом 15 - 20 хв. Частина хроматограми, яка відповідає досліджуваному розчину, закривають скляною пластинкою, а відкриту частину обробляють паладієвим або бромфеноловим реагентом. Через 10-30 хв на пластинці появляються плями свідка. Із захищеної частини пластинки відповідно до положення плями свідка, зішкрябають силікагель. Знятий шар силікагелю переносять у скляну хроматографічну колонку, на дно якої попередньо поміщають невеликий тампон вати і пропускають 30 мл суміші гексан-ацетон (1:1), додають порціями по 5 - 8 мл, наносять розчинник на стінки колонки. Елюат кількісно переносять в мірну колбу, доводять гексаном до мітки і аналізують.

### **Виявлення методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ)**

Виявлення ФОП методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту проводять на пластинках з тонким шаром силікагелю, закріпленим добавкою гіпсу або крохмалю.

На хроматографічну пластинку наносять не менше 0,1 об'єму витяжки, попередньо випареної до 0,1 – 0,2 мл. Поряд, в другу точку наносять суміш витяжки і передбачуваної речовини і окремо в третю точку - розчин стандарту.

Для хроматографування рекомендуються такі системи розчинників:

- гексан-ацетон у співвідношеннях 1:1, 2:1 та 4:1;
- гексан-етиловий ефір (10:2);
- гексан-ацетон-бутилацетат (4:1:1).

Проявники:

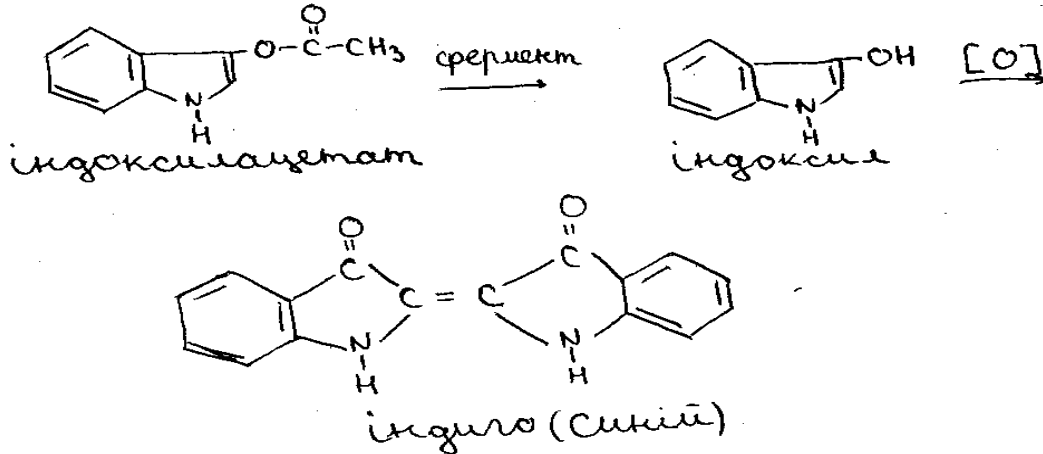
- для проявлення сірковмісних ФОП використовують бромфеноловий синій з срібла нітратом або розчин паладію хлориду;
- для виявлення похідних фосфорної, тіо- і дитіофосфорної кислот використовують розчин 4-(п-нітробензил)-піридину.

При використанні у якості проявника розчину 4-(п-нітробензил)-піридину, пластинку після хроматографування підсушують на повітрі, а потім обприскують 2 % розчином 4-(п-нітробензил)-піридину в ацетоні і ставлять в термостат на 30 хв при 100 °С. Охолоджену пластинку обприскують 1 н. розчином натрію гідроксиду. Плями ФОП забарвлюються в синьо – фіолетовий колір (хімізм реакції див. вище). Виявлення ФОП проводять за появою плям на пластинці, а ідентифікацію за значенням величин  $R_f$  речовин в досліджуваній пробі і свідків, або за значенням величин  $R_s$ .

### **Виявлення хромато-ензимним методом**

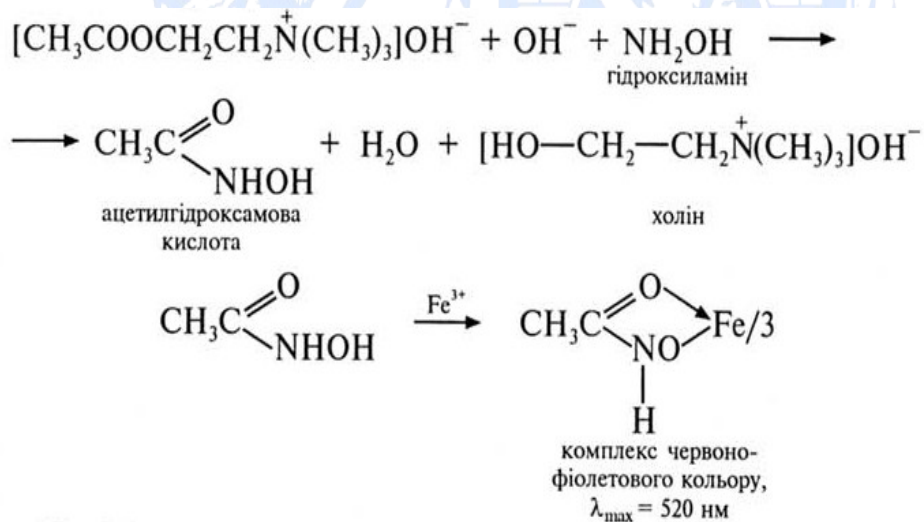
Для хроматографування використовуються такі ж системи розчинників, як і при методі ХТШС (див. вище).

Пластинку після хроматографування витяжки, підсушують, обприскують ферментним реактивом (витяжка із свіжозамороженої печінки телят). Після обприскування пластинку ставлять в термостат на одну годину при 38°C. При наявності на пластинці ФОП, в місці їх розміщення, проходить пригнічення активності холінестерази. Після інкубації в термостаті пластинку обприскують розчином індоксилацетату з домішкою гексаціаноферату (II) і (III). Активна холінестераза гідролізує індоксилацетат до індоксилу, а далі іде реакція утворення індиго. Фон пластинки забарвлюється в синій колір, а місця розміщення ФОП безбарвні.



#### Виявлення ензимним методом

В одну фарфорову чашку вносять декілька крапель досліджуваної витяжки, в другу – таку саму кількість розчинника. Розчинник випаровують насухо при кімнатній температурі. Потім в обидві чашки додають по краплі індикаторної суміші. Через 10 хв додають по краплі 0,4 % водного розчину ацетилхоліну і спостерігають за забарвленням розчинів протягом 30 хв. У присутності ФОП колір рідини досліджуваної проби не змінюється, а забарвлення розчину в досліді з реактивами змінюється з синього до зеленого, потім до жовтого. Проба загальна для всіх токсичних ефірів кислот фосфору.



#### Виявлення методом газоріднинної хроматографії

Ідентифікацію ФОП проводять за відносним часом затримування, використовуючи дві колонки з різними рідкими фазами, які відрізняються селективністю і полярністю (високополярна – ХЕ- 60 і малополярна – SE-30). За стандарт використовують гексановий розчин метафосу – 0,1 мкг/мл.

*Умови хроматографування.* Колонка I – скляна, довжина 2 м, внутрішній діаметр 3,5 мм, рідка нерухома фаза – SE-30 (5 %) на Хроматоні N–AW–DMCS (0,16 – 0,20 мм) , колонка II – скляна, довжиною 1 м, внутрішній діаметр 3,5 мм, заповнена 5 % XE – 60 на хроматоні N–AW–DMCS (0,16 – 0,20 мм), газ-носії – гелій. Швидкість: газу-носія 23 мл/хв; водню – 14 мл/хв, повітря – 24 л/год. Темп. термостата колонки 190°C, випарника - 220°C. Детектор термоіонний.

*Кількісне газо-хроматографічне визначення* проводять методом внутрішнього стандарту. Вміст розраховують за калібрувальним графіком побудованим в осях координат: концентрація досліджуваної речовини – співвідношення висот (площ) піків стандартної і досліджуваної речовин.

*Метод внутрішнього стандарту* (метод відносного калібрування) оснований на введенні в аналізовану суміш відповідної кількості речовини стандарту. При цьому методі будується калібрувальний графік. Для побудови калібрувального графіку готують проби з різним вмістом речовини і в кожену пробу додають точну однакову кількість речовини стандарту. Записують хроматограму і знаходять співвідношення висот (або площ) піків досліджуваної речовини до речовини стандарту. На осі абсцис відкладають співвідношення вагових кількостей досліджуваної речовини до речовини прийнятої за стандарт, на осі ординат співвідношення висот або площ піків. Невідому пробу готують і хроматографують в таких самих умовах. Знаходять співвідношення висот або площ піків і за калібрувальним графіком знаходять кількість досліджуваної речовини в пробі.

### **Кількісне визначення ФОП фотоколориметричним методом**

0,1 мл витяжки вносять у фарфорову чашку і випаровують насухо при температурі не вищій 50°C. Сухий залишок розчиняють в 0,5 мл ацетону, переносять у пробірку із шліфом. У фарфорову чашку ще раз вносять 0,5 мл ацетону і приєднують до розчину у пробірці із шліфом. У пробірку додають 3 мл води, 1 мл універсального буферного розчину з рН 4,5 і 0,5 мл 5 % розчину 4 (п-нітробензил)-піридину в ацетоні. Закривають повітряним холодильником і ставлять на водяний нагрівник на 30 хв. Після охолодження додають 2 мл ацетону, 4 мл етилацетату, 1 мл 1 н. розчину натрію гідроксиду (хімізм реакції див. вище). Оптичну густину ацетонового шару, забарвленого у фіолетовий колір, визначають за допомогою фотоелектроколориметра (кювета 10 мл, світлофільтр – зелений). Кількісний вміст ФОП знаходять за калібрувальним графіком.

### **Питання для самостійної підготовки студентів**

1. Основні класифікації пестицидів.
2. На які групи діляться пестициди залежно від їхньої будови?
3. Роль вчених у розробці способів одержання і аналізу пестицидів (А.Е.Арбузов, М.Б.Мельников, М.А. Клісенко).
4. Основні вимоги, які ставляться до хімічних засобів захисту рослин (гігієнічні і промислові).
5. Правила перевезення, зберігання, відпуску і використання отрутохімікатів і гербіцидів.
6. Основні правила використання гербіцидів і отрутохімікатів у сільському господарстві і побуті.
7. Техніка безпеки при використанні отрутохімікатів у побуті.
8. Механізм дії і біотрансформація пестицидів – похідних карбамінової кислоти і дитіокарбамінової кислоти в організмі людей і тварин.
9. Фізичні і хімічні властивості, токсикологічна характеристика і шляхи проникнення ртутьорганічних отрутохімікатів в організм людей і тварин.

10. Фізичні і хімічні властивості пестицидів – похідних 2,4-дихлорфеноксиацетатної кислоти, їх токсичність і застосування.
11. Фізичні і хімічні властивості і токсикологічна характеристика пестицидів – похідних фенолу і нітрофенолу.
12. Зберігання у зовнішньому середовищі і шляхи перетворення пестицидів – похідних феноксиалкілкарбонових кислот.
13. Пестициди – похідні сечовини і тіосечовини. Їх токсичність і зберігання в об'єктах зовнішнього середовища.
14. Токсикологічне значення ФОП.
15. Фізичні і хімічні властивості пестицидів - ефірів кислот фосфору і карбамінової кислоти і шляхи проникнення їх в організм.
16. Зберігання у зовнішньому середовищі і нормативні терміни «витримування» при використанні фосфорорганічних пестицидів.
17. Залежність токсичності ФОП для теплокровних і комах від хімічної будови і структури молекули.
18. Біотрансформація ФОП в організмі людей і тварин і характеристика токсичних властивостей їх метаболітів.
19. Механізм токсичної дії ФОП на організм людей і тварин.
20. Біотрансформація ФОП в організмі людей і тварин і шляхи виведення їх із організму.
21. Способи виділення ФОП із біологічного матеріалу і рідин організму.
22. На якій властивості жирів і восків основане очищення від них витяжок з біологічного матеріалу ?
23. Назвіть раціональний метод очищення витяжок від білків.
24. Антидотна терапія при отруєннях (ФОС).
25. Холінергичний метод виявлення ФОП із біологічного матеріалу і рідин організму
26. Хроматографічний метод виявлення ФОП у витяжках із біологічного матеріалу.
27. За якими параметрами проводять аналіз пестицидів методом ГРХ?
28. Сформулюйте принцип біологічної проби на ФОП. Дайте оцінку чутливості і специфічності проби.
29. Характеристика основних способів визначення ФОП у витяжках із біологічного матеріалу.
30. Способи виявлення і визначення похідних карбамінової і дитіокарбамінової кислот у витяжках із біологічного матеріалу.
31. Характеристика основних способів і реакцій, які використовуються для виявлення і визначення похідних 2,4-дихлорфеноксиалкілкарбонових кислот.
32. Методи ідентифікації і кількісного визначення пестицидів – похідних фенолу і нітрофенолу.
33. Методи визначення ртутьорганічних пестицидів.

### **Заняття 13**

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ВИТЯЖОК ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА ВМІСТ ФОС ХІМІЧНИМИ РЕАКЦІЯМИ**

*Актуальність теми.* Речовини, які відносяться до групи «отрутохімікати» мають широке застосування у сільському господарстві, побуті і тому дуже часто вони стають причиною гострих та хронічних отруєнь. Виявлення фосфоровмісних пестицидів у витяжках із біологічного матеріалу хімічними, фізико-хімічними і ензимними методами є необхідним в практиці хіміка – токсиколога для підтвердження ідентичності отруйних речовин.

Мета. Навчити студентів способів ідентифікації фосфоровмісних пестицидів за допомогою хімічних реакцій, методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту, газорідної хроматографії і ензимним методами.

Навчальні цілі. Студенти повинні вміти виявляти фосфоровмісні отрутохімікати за допомогою:

- хімічних реакцій;
- методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту;
- методу газорідної хроматографії;
- ензимного методу.

Міжпредметна інтеграція. Студенти повинні знати методи виявлення сірковмісних сполук (кафедра біоорганічної і фармацевтичної хімії), теоретичні основи і методи хроматографії (кафедра загальної, біонеорганічної і фізколоїдної хімії і кафедра токсикологічної та аналітичної хімії), закони поглинання світла розчинами, способи вимірювання оптичної густини розчинів і способи розрахунку кількості речовини в пробі за величиною оптичної густини (кафедра фізики, фізичної хімії і аналітичної хімії), основи газохроматографічного аналізу (кафедра аналітичної хімії).

Для виявлення пестицидів у витяжках із біологічного матеріалу застосовують різні методи: хімічні, фізико-хімічні, ензимні тощо.

Хімічні методи виявлення пестицидів ґрунтовані на використанні реакцій на окремі функціональні групи та атоми (фосфор, хлор, сірку, аміногрупу та ін.) Ензимний метод виявлення фосфоровмісних пестицидів оснований на властивостях ФОП, а також похідних карбамінової кислоти (наприклад, севіну) пригнічувати фермент холінестеразу. Біохімічна проба є чутливішою ніж хімічні методи. При негативному результаті біохімічної проби - дослідження закінчують, при позитивному – для підтвердження проводять дослідження за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів (ХТШС, ГРХ тощо).

Аналіз витяжки з метою діагностики отруєння ФОП проводять за наступною схемою:

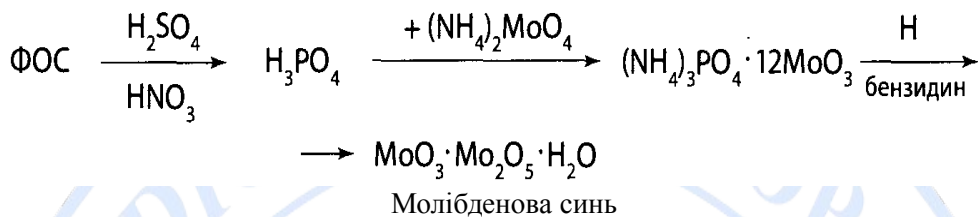
1. Виявлення фосфорорганічних речовин за фосфором.
2. Виявлення фосфорилюючої активності.
3. Виявлення похідних тіо- і дитіофосфорної кислот.
4. Виявлення та ідентифікація методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.
5. Виявлення хромато-ензимним методом.
6. Виявлення за активними функціонально-активними групами та за продуктами гідролізу.
7. Ідентифікація методом спектроскопії.
8. Ідентифікація методом газорідної хроматографії.

### Лабораторна робота студентів

**Виявлення фосфорорганічних речовин за фосфором.** Для виявлення фосфору в органічних речовинах проводять їх мінералізацію, а потім визначають в мінералізаті фосфат-іони. При виявленні ФОП у біологічному матеріалі проводять їх виділення, а для мінералізації використовують залишок витяжки після випаровування розчинника. Мінералізацію проводять сумішшю сульфатної і нітратної кислот або шляхом сплавлення (спікання) залишку витяжки з натрію карбонатом і натрію пероксидом. Для виявлення фосфат-іонів виконують реакцію одержання фосфорномолібденової кислоти. Одержану кислоту переводять у молібденову синь за допомогою одного із відновників (аскорбінова кислота, олова хлорид (II), бензидин тощо).

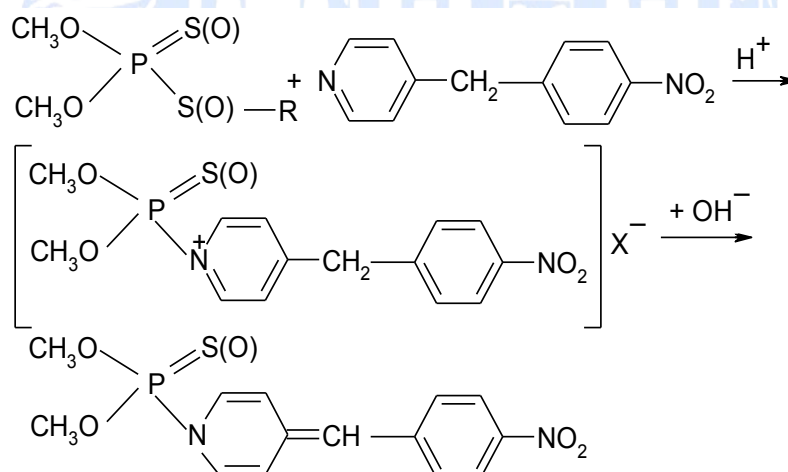
У пробірку вносять 3-5 крапель мінералізату і 5 крапель розчину амонію молібдату. Суміш підкислюють 10% розчином нітратної кислоти. При наявності фосфат-іонів виникає жовте забарвлення. До цього розчину додають 3-5 крапель насиченого водного розчину гідрохлориду бензидину і 10 % розчин аміаку до лужної реакції. При наявності фосфат-іонів розчин забарвлюється в синій колір.





**Виявлення фосфорилуючої активності.** Фосфорилуючі (алкілуєчі) властивості ФОП виявляють за допомогою реакції з 4-(п-нітробензил)-піридином. Частина витяжки випаровують, залишок розчиняють в 0,5 мл ацетону. Розчин переносять у пробірку із шліфом, додають 3 мл води, 1 мл універсальної буферної суміші (рН 4,5) і 0,5 мл 5 % розчину 4-(п-нітробензил)-піридину в ацетоні. Суміш у пробірці нагрівають з повітряним холодильником на киплячому водяному нагрівнику 1 годину. Після охолодження суміш центрифугують 5 хв (при 10000 об/хв). Центрифугат відділяють шляхом декантації у пробірку із скляним корком і додають 2 мл ацетону, 4 мл етилацетату та 1 мл 1 н. розчину натрію гідроксиду. Вміст пробірки перемішують і залишають на 1 хв для розділення фаз. При наявності ФОП органічна фаза забарвлюється в червоно-фіолетовий колір.

Реакція проходить за схемою :



Реакція з 4-(п-нітробензил)-піридином є характерною для ефірів фосфорної, тіо- та дитіофосфорної кислот. Похідні фосфонової кислоти (рипід-п) в реакцію вступають дуже повільно з причини того, що зв'язок Р-С дуже міцний. Винятком є хлорофос, який при першому атомі вуглецю має гідроксильну групу, що сприяє гідролізу. При цьому хлорофос перетворюється в дихлорофос - похідне фосфорної кислоти, який і вступає в реакцію з 4-(п-нітробензил)-піридином.

Чутливість реакції: 0,5 - 2 мкг ФОП у пробі.

### Виявлення похідних тіо- і дитіофосфорної кислот

1. Речовини, які мають кетонну сірку вступають в реакцію з паладію хлоридом з утворенням внутрікомплексних сполук. Продукти реакції мають жовто-коричневе забарвлення. Реакцію виконують на пластинці з тонким шаром сорбенту. Хроматограму обприскують 0,5 % розчином паладію хлориду в 10 % розчині хлоридної кислоти. Після обприскування пластинку нагрівають 5-10 хв при 100 °С. Чутливість реакції 2-10 мкг речовини в пробі.

2. Для виявлення сірковмісних речовин використовують розчин бромфенолового синього з срібла нітратом. В 10 мл ацетону розчиняють 0,05 г бромфенолового синього і об'єм доводять до 100 мл 1 % розчином срібла нітрату в суміші ацетону і води (3:1). Пластинку обприскують і залишають на 5 хвилин. Після цього пластинку повторно обприскують 1 % розчином лимонної кислоти. Плями речовин, які вміщують сірку, забарвлюються в синій колір.

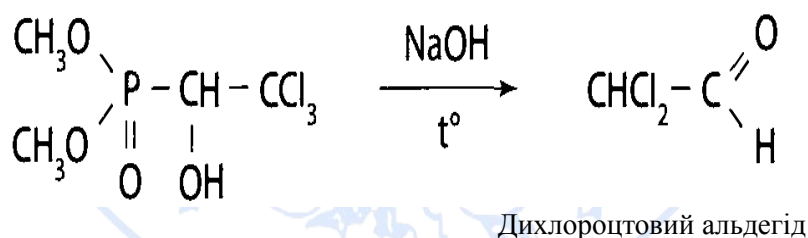
3. Виявлення ФОП похідних дитіофосфорної кислоти проводять реакцією з сульфатом міді. При лужному гідролізі утворюється диметоксидитіофосфорна кислота, яка з сульфатом міді в слабкокислому середовищі утворює внутрікомплексну сполуку:

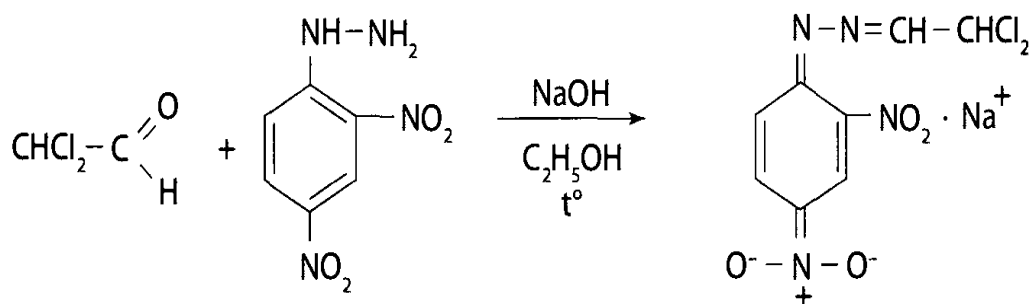
До сухого залишку витяжки додають 1 мл 10 % розчину натрію гідроксиду в спирті і нагрівають на киплячому водяному нагрівнику 10 хв. Після охолодження до суміші по краплях додають 25 % розчин сульфатної кислоти до рН 4-5, 1 мл хлороформу, 2 краплі 10 % розчину міді сульфату і перемішують. При наявності ФОП похідних дитіофосфорної кислоти хлороформний шар забарвлюється в жовтий колір

### Виявлення окремих ФОП за активними функціонально-активними групами та за продуктами гідролізу

#### Реакції виявлення хлорофосу:

- з піридином і натрію гідроксидом (реакція Фудживара). У пробірку вносять 1 мл досліджуваного розчину, 1 мл піридину і 1 мл 50 % розчину натрію гідроксиду. Суміш нагрівають на киплячому водяному нагрівнику 5 хв. При наявності хлорофосу спостерігають червоне або рожеве забарвлення;
- з резорцином: До 1мл досліджуваного розчину додають 2 краплі 1 % розчину резорцину в 20 % розчині натрію карбонату або 1 % розчині натрію гідроксиду. Через 10 хв спостерігається рожеве забарвлення, а через 15-30 хв – жовто-зелена флуоресценція розчину;
- утворення ізонітрилу. До 0,01-0,03 г досліджуваної речовини додають 1 мл етилового спирту. Суміш збовтують, потім додають 2 мл спиртового розчину натрію гідроксиду і 1 краплю аніліну. При нагріванні відчувається характерний запах ізонітрилу;
- з о-толідіном. В фарфорову чашку вносять 0,2-0,5 мл водного або спиртового розчину досліджуваної речовини, 1 мл розчину толідину в ацетоні і 1 мл суміші розчинів водню пероксиду і лугу. В присутності хлорофосу спостерігають жовте або оранжеве забарвлення;
- з 2,4-динітрофенілгідразином. До кількох крапель розчину досліджуваної речовини додають 2 краплі 1,2 н. розчину натрію гідроксиду. Суміш залишають при кімнатній температурі на 20 хв, потім додають 1 краплю 0,1 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину в 4 н. хлоридній кислоті. Пробірку тримають в киплячому водяному нагрівнику 30 хв Суміш охолоджують і додають до неї краплю 4 н. розчину натрію гідроксиду і 0,5 мл етилового спирту. Спостерігають синє або синьо-фіолетове забарвлення;





2,4-динітрофенілгідразин

синьо-фіолетове забарвлення

- з *ацетоном*. До 0,1 – 1,0 мл розчину досліджуваної речовини в етиловому спирті додають 1 мл ацетону і 0,5 мл 0,5 н. спиртового розчину натрію гідроксиду. Через 5-15 хв спостерігають рожеве забарвлення, яке переходить в оранжеве;

- *реакція Шенемана*. До 1 мл розчину досліджуваної речовини в ацетоні додають 0,5 мл розчину о-діанізидину і 2 мл розчину натрію перборату. В залежності від вмісту досліджуваної речовини розчин забарвлюється в жовтий або червоний колір.

**Реакції виявлення дихлорофосу.** Для виявлення *дихлорофосу* використовують кольорові реакції з о-толідином, 2,4-динітрофенілгідразином, ацетоном і реакцію Шенемана (див. хлорофос).

**Реакції виявлення карбофосу.**

- з *діазотованою сульфаніловою кислотою*. 1 мл хлороформної витяжки вносять у пробірку і рідину випаровують насухо. До сухого залишку додають 2 мл води, 1 мл діазотованої сульфанілової кислоти і 0,5 мл 5 % розчину натрію гідроксиду. Спостерігають вишнево-червоне забарвлення розчину;

- з *реактивом Маркі*. У фарфорову чашку вносять 1 мл хлороформного розчину витяжки і хлороформ випаровують насухо. До сухого залишку додають 5-10 крапель реактиву Маркі. Спостерігають утворення оранжевого забарвлення, яке через деякий час переходить в темно-коричневе;

- з *сульфатом міді*:

1 спосіб. 1 мл розчину досліджуваної речовини випаровують насухо. До сухого залишку додають 1 мл 10 % спиртового розчину натрію гідроксиду. Пробірку нагрівають на киплячому водяному нагрівнику 10 хв. При цьому відчувають неприємний запах продуктів розкладу карбофосу. Після охолодження пробірки в неї по краплях вносять 25 % розчин сульфатної кислоти до рН 4-5. Потім додають 1 мл хлороформу і 2 краплі 10 % розчину міді сульфату. Якщо в досліджуваному розчині міститься карбофос, то хлороформ забарвлюється в зеленувато-жовтий колір.

2 спосіб. В роздільну лійку вносять 5 мл чотирихлористого вуглецю, 2-5 крапель розчину досліджуваної речовини і 0,2 мл 5 % розчину натрію гідроксиду. Суміш інтенсивно збовтують 1 хв, потім додають 15 мл 2 % розчину натрію хлориду і рідину знову збовтують 1 хв. Після розділення органічну фазу відділяють, а до водної фази в роздільній лійці додають 5 мл чотирихлористого вуглецю. 0,2-0,3 мл 6 н. розчину хлоридної кислоти і збовтують рідину 30 с. Після розділення фаз, відділяють фазу органічного розчинника, який пізніше досліджують. В роздільну лійку до водної фази додають 1 мл тетрахлоркарбону, 0,4 мл 1 % розчину міді сульфату і суміш збовтують 1 хв. Спостерігають лимонно-жовте забарвлення органічного розчинника.

**Реакції виявлення фосфаміду.**

- з *реактивом Маркі*. У фарфорову чашку вносять краплю досліджуваного розчину і 1-2 краплі реактиву Маркі. Поява рожевого забарвлення вказує на присутність фосфаміду в пробі;

- з *реактивом Фреде*. На предметне скло наносять краплю досліджуваного розчину і 1-2 краплі реактиву Фреде. При наявності фосфаміду спостерігають синьо-зелене забарвлення, яке переходить в зелено-жовте;
- з *реактивом Мілона*. На предметне скло наносять краплю досліджуваного розчину і 1-2 краплі реактиву Мілона. При наявності фосфаміду в досліджуваному розчині через 5-10 хв спостерігають рожеве забарвлення. Потім випадає такого ж кольору осад;
- *реакція Шенемана* (див. хлорофос).

**Реакції виявлення метафосу.** Для виявлення *метафосу* проводять реакцію Шенемана (див. хлорофос).

### Питання для самостійної підготовки студентів

1. Реакції і методи аналізу, які використовуються для виявлення ФОП у витяжках із біологічного матеріалу.
2. Способи дослідження похідних карбамінової і дитіокарбамінової кислот у витяжках із біологічного матеріалу.
3. Характеристика основних способів і реакцій, які використовуються для дослідження похідних 2,4-дихлорфеноксикарбонових кислот.
4. Методи ідентифікації пестицидів – похідних фенолу і нітрофенолу.
5. Методи виявлення ртутьорганічних пестицидів.
6. Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного аналізу пестицидів – органічних сполук олова та ртуті. Методи ідентифікації за нативною формою і за ртуттю (II). Оцінка результатів аналізу.
7. Токсикологічна характеристика та основні методи аналізу синтетичних піретроїдів – пестицидів похідних циклопропанкарбонової кислоти (алетрин, ресметрин, тетраметри, фенотрин, перметрин, циперметрин, дельтаметрин, цигалотрин тощо). Діагностика гострих отруєнь та надання медичної допомоги.

**Розділ VIII. Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного аналізу групи отруйних речовин, які визначаються безпосередньо в біологічному матеріалі - карбону (II) оксид (чадний газ) та отрут які потребують особливих методів виділення (фториди, кремнійфториди, бром, йод).**

### Заняття № 14

#### ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЧАДНОГО ГАЗУ, ОСОБЛИВОСТІ ЙОГО ВИЯВЛЕННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДЕЙ. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ

**Актуальність теми.** Монооксид вуглецю — CO (карбону (II) оксид, чадний газ) є основною причиною смертей під час пожеж. Решта випадків не пов'язаних з пожежами не смертельних та ненавмисних отруєнь CO пов'язані з несправністю опалювальних та вентиляційних систем. Майже у половини хворих після отруєння CO розвиваються віддалені психічні порушення.

**Мета роботи.** Оволодіти методиками виявлення карбоксигемоглобіну в крові та спектрофотометричного визначення монооксиду вуглецю у крові.

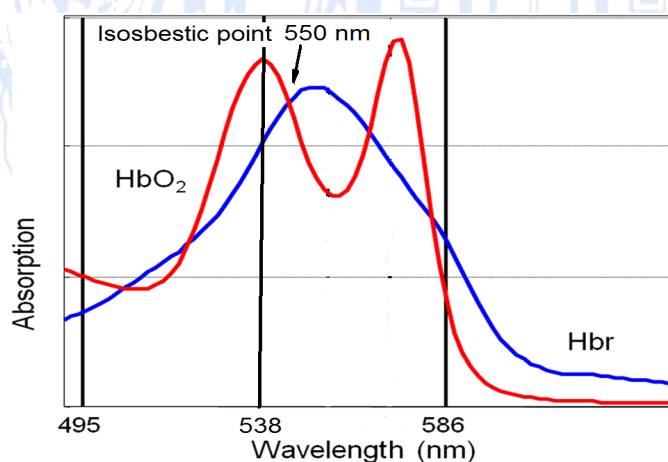
**Навчальні цілі.** Студенти повинні вміти:

- виявляти карб оксигемоглобін в крові за допомогою якісних реакцій;
- кількісно визначати оксид вуглецю в крові спектрофотометричним методом;
- давати оцінку результатам аналізу.

Міжпредметна інтеграція. Студенти повинні знати можливі шляхи проникнення газів в організм (фармакологія), шляхи виведення ксенобіотиків із організму (фармакологія), будову, функції та різні форми гемоглобіну (біологічна хімія).

### Залежність симптомів отруєння від кількості карбоксигемоглобіну в крові

Відносний вміст карбоксигемоглобіну, %	Симптоми отруєння
0 - 10	Ніяких симптомів
10 - 20	Відчуття тиску в скронях, легкий головний біль, розширення кровеносних судин шкіри
20 - 30	Головний біль, відчуття пульсу в скронях
30 - 40	Сильний головний біль, слабкість, запаморочення, туман перед очима, нудота і блювота, колапс
40 - 50	Ті ж симптоми, колапс більш вірогідний, пришвидшення дихання і пульсу
50 - 60	Пришвидшення дихання і пульсу, кома, яка чергується час від часу судомами, чейнстоківське дихання
60 - 70	Ті ж симптоми, послаблення дихання і серцевої діяльності, може наступити смерть
70 - 80	Слабкий пульс, послаблення дихання, зупинка дихання і смерть



Спектри світлопоглинання оксигемоглобіну та дезоксигемоглобіну.

### Лабораторна робота студентів

#### Хімічні методи виявлення монооксида вуглецю в крові

**Попередня проба на карбоксигемоглобін.** Досліджувану кров у розведенні 1:20 змішують з 0,01 М розчином аміаку і порівнюють з нормальною кров'ю, обробленою аналогічно. Рожевий відтінок аналізованої крові вказує на необхідність наступного дослідження.

Іон заліза (II) в молекулі карбоксигемоглобіну міцно зв'язаний з молекулою монооксида вуглецю і не може вступати у взаємодію з більшістю реактивів, що утворюють комплексні або нерозчинні сполуки з іоном заліза. Усі перелічені нижче якісні реакції ґрунтуються на встановленні здатності іона заліза (II) утворювати ті чи інші продукти взаємодії, тобто на наявності в молекулі гемоглобіну незаблокованого (активного) іона заліза (II). Тобто, позитивний ефект реакції свідчить про наявність у крові дезоксигемоглобіну чи

оксигемоглобіну. Кров, що містить карбоксигемоглобін, практично не змінює свого забарвлення від додавання вказаних реактивів, а нормальна кров без карбоксигемоглобіну під дією цих реактивів значно змінює своє забарвлення.

Під час виконання усіх перелічених нижче реакцій виявлення карбоксигемоглобіну слід паралельно проводити дослід з нормальною кров'ю. До обох проб – нормальної і з карбоксигемоглобіном додають однакові об'єми реактивів і спостерігають за змінами, що відбулися в обох пробах під дією реактивів.

**Реакція з розчином гідроксиду натрію (проба Гоппе-Зейлера).** До певного об'єму крові додають такий самий або подвійний об'єм 30 %-го розчину гідроксиду натрію. Кров, що містить карбоксигемоглобін, залишається яскраво-червоною, а кров без карбоксигемоглобіну набуває бурого забарвлення.

Кров, що зазнала гнильних змін, під дією лугу може так само набувати яскраво-червоно забарвлення і без карбоксигемоглобіну через утворення гемохромогену.

**Реакція з сульфідом амонію (проба Сальковського-Катаяма).** До 10 мл дистильованої води додають 5 крапель крові і 5 крапель свіжовиготовленого розчину сульфиду амонію. Суміш обережно збовтують, додають 30 %-й розчин оцтової кислоти до слабкокислої реакції і знову злегка збовтують. Кров, що містить карбоксигемоглобін, має малиново-червоне забарвлення, а кров без карб оксигемоглобіну змінює колір на сіро-зелений.

**Реакція з хініном і сульфідом амонію (проба Хорошкевича-Маркса).** До 2 мл крові додають 4 мл 8 %-го розчину гідрохлориду хініну і суміш кип'ятять нетривалий час. Після охолодження суміші додають 2—3 краплі свіжовиготовленого розчину сульфиду амонію і сильно збовтують.

Кров, що містить карбоксигемоглобін, має світло-червоне забарвлення, а кров без карбоксигемоглобіну набуває брудного червоно-бурого забарвлення.

**Реакція з гексаціанофератом (III) калію (проба Бюркера).** До 5 мл крові додають воду до 500 мл і збовтують. До 5-10 мл одержаного розчину крові додають 5 крапель 1 %-го розчину гексаціаноферату (III) калію  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Кров, що містить карбоксигемоглобін, залишається червоною, а кров без карбоксигемоглобіну змінює забарвлення на жовтий.

**Реакція з гексаціанофератом (III) калію и дихроматом калію (проба Сидорова).** 1 мл крові розбавляють водою до 10 мл. До 2 мл одержаного розчину крові додають 3-5 крапель 20 %-го розчину гексаціаноферату (III) калію і такий самий об'єм 0,01 %-го розчину дихромату калію. Суміш крові і реактивів злегка збовтують. Кров, що містить карбоксигемоглобін, змінює забарвлення на карміново-червоне, а кров без карбоксигемоглобіну набуває коричнево-зеленого забарвлення.

**Реакція з гексаціанофератом (III) калію і оцтовою кислотою (проба Ветцеля).** до 10 мл крові додають 90 мл води. До 10 мл одержаного розчину додають 5 мл 20 %-го розчину гексаціаноферату (III) калію і 1 мл льодяної оцтової кислоти. З крові, що містить карбоксигемоглобін, випадає вишнево-червоний осад, а з крові без карб оксигемоглобіну – сіро-коричневий осад.

**Реакція з таніном (проба Кункеля-Ветцеля).** Кров розбавляють п'ятикратним об'ємом дистильованої води. В пробірку вносять 5 мл цього розчину крові, додають 15 мл 3 %-го водного розчину таніну і добре збовтують. З крові, що містить карбоксигемоглобін, випадає світлий карміново-червоний осад, а з крові без карбоксигемоглобіну випадає сіро-коричневий осад.

**Реакція з формальдегідом (проба Лібмана).** До 5 мл нерозбавленої крові додають 5 мл формаліну (40 %-й розчин формальдегіду) і сильно збовтують. Кров, що містить карбоксигемоглобін, залишається червоного кольору, а кров без карбоксигемоглобіну через декілька хвилин набуває коричнево-чорного забарвлення.

**Реакція з ацетатом свинцю (проба Рубнера).** До 5 мл неразбавленої крові додають 20 мл 5 %-го розчину основного ацетата свинцю і сильно збовтують впродовж 1 хв. Кров, що

містить карбоксигемоглобін, не змінює свого червоного кольору, а кров без карбоксигемоглобіну набуває коричневого забарвлення.

**Реакція з сульфатом міді (проба Залеського).** До 1 мл крові додають воду до 100 мл і добре збовтують. До 5 мл одержаного розчину крові додають 5 крапель 10 %-го розчину сульфату міді і знову добре збовтують. Кров, що містить карбоксигемоглобін, змінює колір на пурпурно-червоний, а кров без карбоксигемоглобіну набуває зеленуватого забарвлення.

*Примітка.* Слід мати на увазі, що кров, яка містить карбоксигемоглобін, практично не змінюється під дією перелічених реактивів. Тому висновок про наявність карбоксигемоглобіну в крові не може ґрунтуватися на позитивному результаті лише однієї реакції з перелічених.

Крім того, у крові осіб, що палять, а також у крові мешканців великих міст завжди міститься невелика кількість карбоксигемоглобіну (до 5 %). Тому при невеликому вмісті монооксиду вуглецю кров також буде давати такий самий результат, як і кров, що не містить карбоксигемоглобін.

### **Кількісне спектрофотометричне визначення оксиду вуглецю в крові за карбоксигемоглобіном**

Для кількісного визначення карб оксигемоглобіну в крові попередньо виготовляють відповідні розчини:

розчин А – розчин досліджуваної крові;

розчин Б – розчин крові, який вміщує карбоксигемоглобін і дезоксигемоглобін;

розчин В – розчин крові, в якій всі форми гемоглобіну ( дезоксигемоглобін, оксигемоглобін і метгемоглобін) повністю переведені в карбоксигемоглобін.

**Виготовлення розчину А.** 1 мл досліджуваної крові, яка не вміщує згустків, вносять в мірну колбу місткістю 100 мл і додають фосфатний буферний розчин з рН 7,38. Рідину збовтують і об'єм її доводять фосфатним буферним розчином до 100 мл. Одержаний при цьому розчин крові повинен бути прозорим.

**Виготовлення розчину Б.** Цей розчин готують із розчину А безпосередньо в кюветі спектрофотометра перед вимірюванням оптичної густини. При цьому в кювету вносять розчин досліджуваної крові (розчин А) в такій кількості, щоб після закриття кювети кришкою між нею і рідиною не було повітря. До розчину А, внесеного в кювету, додають 3 мг дитіоніту натрію. Вміст кювети ретельно перемішують .

**Виготовлення розчину В.** Цей розчин виготовляють в спеціальному апараті, в якому одержують монооксид вуглецю і насичують ним досліджувану кров. При цьому оксигемоглобін крові повністю перетворюється в карбоксигемоглобін. Для переведення метгемоглобіну в дезоксигемоглобін до крові додають дитіоніт натрію, а потім ще раз пропускають оксид вуглецю до насичення.

Для кількісного визначення монооксиду вуглецю необхідно виміряти оптичну густину розчину крові, яка вміщує суміш карбоксигемоглобіну і дезоксигемоглобіну (розчин Б), а потім виміряти оптичну густину розчину крові, насиченої оксидом вуглецю (розчин В). Оптичну густину розчину Б вимірюють при довжинах хвиль 538 і 550 нм. Потім вимірюють оптичну густину розчину В при довжині хвилі 538 нм. Розчином порівняння для обох вимірювань є вода.

Розрахунок вмісту карбоксигемоглобіну в досліджуваній крові Р проводять за формулою (%):

$$P = 100\% - \frac{(D_{COHb} - D_{HbCOHb}) \cdot 100\%}{D_{Hbi} \cdot K}$$

- де:  $D_{\text{сонь}}$  – оптична густина розчину В крові (додатково насиченої монооксидом вуглецю) при 538 нм;  
 $D_{\text{ньсонь}}$  – оптична густина розчину Б крові, обробленого дитіонітом натрію (вміщує суміш дезокси- і карб оксигемоглобіну), при 538 нм;  
 $D_{\text{нб}}$  – оптична густина розчину Б крові в ізобестичній точці (при 550 нм);  
 $K$  – коефіцієнт 0,372.

### Питання для самостійної підготовки студентів

1. Механізм токсичної дії монооксиду вуглецю.
2. Що таке дезоксигемоглобін, оксигемоглобін і метгемоглобін і як вони взаємодіють з монооксидом вуглецю.
3. Симптоми отруєння монооксидом вуглецю та перша допомога при отруєнні.
4. Спектральний та хімічні методи виявлення карбоксигемоглобіну в крові.
5. Особливості спектрофотометричного методу визначення карб оксигемоглобіну в крові.

### Заняття 15

#### ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА МЕТОДИ АНАЛІЗУ ОТРУТ, ЯКІ ПОТРЕБУЮТЬ ОСОБЛИВИХ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ (ФТОРИДИ, КРЕМНІЙФТОРИДИ, БРОМІДИ (БРОМ), ЙОДИДИ (ЙОД))

Актуальність теми. При підозрі на отруєння фторидами, кремнійфторидами, бромідами (бромом), йодидами (йодом) виникає необхідність у проведенні судово-токсикологічного аналізу. Виділення цих речовин із об'єктів дослідження є необхідним етапом при проведенні судово-токсикологічного аналізу.

Мета. Студенти повинні навчитися проводити виділення фторидів, кремнійфторидів, бромідів (бром), йодидів (йоду) із біологічного матеріалу і виявляти їх.

Навчальні цілі. Студенти повинні вміти:

1. готувати досліджуваний об'єкт для аналізу;
2. проводити всі технологічні операції під час виділення;
3. проводити дослідження з метою виявлення та кількісного визначення фторидів, кремнійфторидів, бромідів (бром), йодидів (йоду)

Міжпредметна інтеграція. Для вивчення теми студенти повинні знати роль і вміст мікроелементів в організмі (фізіологія), місця нагромадження неорганічних елементів в організмі та шляхи їх виведення з організму (біохімія, фармакологія та фізіологія), хімічні властивості названих сполук (органічна та аналітична хімія).

#### Токсикологічна характеристика фторидів та кремнійфторидів

Фтор у невеликих кількостях знаходиться в людському організмі. Він бере участь в утворенні зубної емалі, кісткової тканини, в обміні речовин, у активації деяких ферментів.

Основні сполуки фтору – це фторидна (плавикова) кислота, фториди, гідрофториди металів, фтор борати та фтор силікати, а також фтор волокна (фторкаучуки, фторопласти), фторвуглеводні.

Медичне значення мають фторид натрію та фторотан. Натрію фторид застосовується у стоматології у вигляді 2 % розчину, а також у вигляді таблеток по 0,0005 г. Фторотан – це засіб для інгаляційного наркозу. Він швидко виводиться з організму і майже не викликає подразнень слизових оболонок.

Фтор та його сполуки високотоксичні. Контакт з фтором викликає подразнення шкіри, слизових оболонок носа і очей, дерматити, кон'юнктивіти, набряк легень. ГДК для фтору становить 0,03 мг/м<sup>3</sup>. деякі фторорганічні сполуки можуть повільно виділяти фтор або леткі



сполуки фтору і призводить до хронічних отруень. Із шлунково-кишкового тракту всмоктуються навіть важко розчинні солі. Кисле середовище шлункового соку допомагає їх переходу у розчинний стан. Сполуки фтору виводяться з організму нирками.

**Натрію фторид** - це білий порошок, який при дії сильних кислот розкладається з виділенням фторидної кислоти – сильного подразнюючого засобу слизових оболонок, який також викликає набряк легень. Технічний натрію фторид застосовується у сільському господарстві як інсектицид і зооцид.

Отруєння натрію фторидом викликає слабкість, головокружіння, нудоту, болі в епігастральній ділянці, пронос, слинотечу, судороги.

**Натрію кремнійфторид** – це білий, іноді жовтуватий або сіруватий порошок без запаху, малорозчинний у холодній воді. Технічний кремнійфторид застосовується у сільському господарстві для боротьби зі шкідниками цукрового буряка, бавовника, зернових культур.

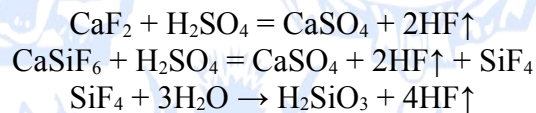
Кремнійфторид має здатність всмоктуватись через шкіру. При отруєнні кремнійфторидами спостерігають ураження нервової системи і порушення обміну речовин. Отруєння супроводжується інтенсивною слинотечею, блювотою, болями у животі, сухістю шкіри, тріщинами, гнійною висипкою, подразненням верхніх дихальних шляхів. При вдихання великої кількості пилу кремнійфториду може наступити смерть. При хронічних отруєннях спостерігаються захворювання зубів та деяких кісток.

**Ізолювання фторидів та кремнійфторидів із технічних препаратів та біологічного матеріалу.** Таке ізолювання проводиться у присутності суспензії оксиду кальцію з метою зменшення втрат досліджуваних сполук.

**Методика ізолювання.** У фарфоровий тигель вносять 25 г подрібненого об'єкта, додають 13-14 мл суспензії оксиду кальцію (5 г оксиду кальцію і 15 мл води очищеної). Суміш добре перемішують, змочують розчином нітрату амонію, висушують і спалюють. Золю промивають водою і висушують. У золі повинен міститись малорозчинний фторид або кремнійфторид кальцію.

**Виявлення фторидів і кремнійфторидів** у отриманій золі проводять за допомогою хімічних реакцій «травлення» скла, утворення гелю ортокремнієвої кислоти та з алізаринцирконієвим лаком.

**Реакція «травлення» скла.** Частину золи вносять у платиновий тигель, додають невелику кількість концентрованої сульфатної кислоти. Тигель накривають годинниковим склом, нижню частину якого попередньо покривають шаром воску або парафіну і за допомогою голки наносять напис. Тигель залишають на добу при кімнатній температурі. Після цього годинникове скло знімають, звільняють від парафіну (воску). Наявність на склі нанесеного напису свідчить про присутність в досліджуваному об'єкті фторидів або кремнійфторидів.



Фтористий водень, що виділяється, взаємодіє з оксидом кремнію, що міститься у склі. Відбувається «роз'їдання» скла:



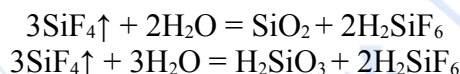
Ця реакція є низько чутливою. Межу виявлення фторидів і швидкість реакції можна підвищити, якщо тигель з золю і сульфатною кислотою підігріти. У цьому випадку на скло наносять шар лаку, висушують і також наносять напис.

**Реакція утворення гелю ортокремнієвої кислоти.** У пробірку вносять частину отриманої золи і декілька крапель концентрованої сульфатної кислоти. До отвору пробірки підносять платинову дротину (або скляну паличку), на кінці якої знаходиться крапля води.

При дії сульфатної кислоти на золу виділяється водню фторид, який реагує зі стінками пробірки, утворюючи газоподібний кремнію тетрафторид:

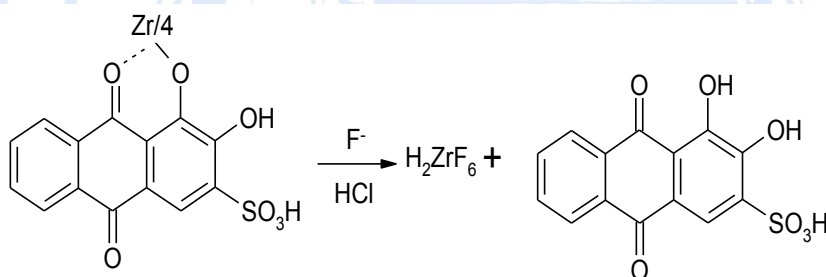


Кремнію тетрафторид гідролізує з утворенням гелю  $\text{SiO}_2$  або  $\text{H}_2\text{SiO}_3$  і кремнійфторидної кислоти:



Помутніння краплі води вказує на присутність фторидів або кремнійфторидів у досліджуваній пробі.

**Реакція з алізаринцирконієвим лаком.** На смужку фільтрувального паперу наносять краплю суміші, що складається з рівних об'ємів 0,25% розчину алізаринового червоного і 0,25% розчину цирконію нітрату. Після підсушування на отриману пляму червоного кольору наносять краплю досліджуваного розчину. Якщо досліджуваний розчин містить фториди або кремнійфториди, то забарвлення плями змінюється на жовте:



**Реакції, що дають можливість відрізнити фториди від кремнійфторидів.** Щоб відрізнити фториди від кремнійфторидів, використовують реакції з розчином аміаку, гідроксидом натрію, солями калію і реакцію утворення гелю ортокремнієвої кислоти.

**Реакція з розчином аміаку.** До водного розчину досліджуваної речовини додають декілька крапель 10 % розчину аміаку. При нагріванні у присутності кремнійфторидів (на відміну від фторидів) випадає драглистий осад (нерозчинна ортокремнієва кислота):



**Реакція з розчином натрію гідроксиду.** До 5 мл водного розчину досліджуваної речовини додають 3 мл 10 % розчину натрію гідроксиду. У присутності кремнійфторидів (на відміну від фторидів) спостерігають утворення білого драглистого осаду.

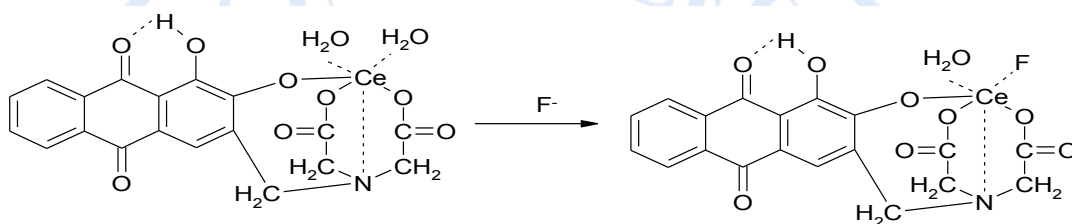
**Реакція з солями калію.** До 3 мл досліджуваного розчину додають 4 мл 5 % розчину калію хлориду і 5 мл етанолу. У присутності кремнійфторидів (на відміну від фторидів) випадає білий осад складу  $\text{K}_2[\text{SiF}_6]$ . Етанол прискорює випадіння осаду.

**Утворення гелю ортокремнієвої кислоти.** На відміну від фторидів реакція проводиться обов'язково у платиновому або залізному тиглі з використанням описаної вище методики. У цих умовах фториди не дають реакцію утворення ортокремнієвої кислоти.

**Кількісне визначення фторидів.** Для кількісного визначення фторидів використовують спектрофотометричний метод, що базується на утворенні потрійного комплексу алізарин-комплексону, церію і фтору.

**Методика визначення.** У мірну колбу місткістю 100 мл вносять 1-10 мл досліджуваного розчину, 10 мл 0,0005 М розчину алізарин-комплексону, 2 мл ацетатного

буферного розчину (рН = 5,0) і додають 10 мл 0,0005 М водного розчину церію нітрату. Об'єм розчину у колбі доводять до позначки водою і через 10 хв вимірюють оптичну густину цього розчину при довжині хвилі 610 нм. Вміст фторидів у досліджуваному розчині розраховують за стандартним розчином натрію фториду.



### Токсикологічна характеристика бромідів (бromу)

Бром – летка димляча рідина темно-червоного кольору і задушливого запаху, легко розчинна у спирті, хлороформі, ефірі, сірковуглеці і чотирьохлористому вуглеці, роз'їдає метали і всі органічні тканини, легко випаровується при кімнатній температурі. Як дуже їдка речовина бром уражає всі тканини і структури, з якими контактує, утворюючи глибокі опіки, що переходять у важкозаживаючі виразки. Поглинутий бром також викликає рух інших галогенів (хлору, йоду), що призводить до нервових порушень.

Дія низьких концентрацій брому викликає кашель, масову виділення слизу, носові кровотечі, важке дихання, головокружіння, головні болі. Вдихання великої концентрації парів брому викликає роз'їдання слизових оболонок носоглотки і верхніх дихальних шляхів. Язик і слизова оболонка рота забарвлюються у коричневий колір, набрякає слизова оболонка гортані, з'являються спазми у горлі, світлобоязнь і спазм повік. При вдиханні великих концентрацій брому розвиваються смертельні опіки легень.

Коли отруєння є результатом вдихання брому, проводиться інтенсивне лікування гострого токсичного отруєння гортані, трахеї і бронхів.

Броміди застосовуються як седативно-сподійні засоби, але зараз в значній мірі витіснені менш токсичними і більш ефективними препаратами, наприклад, бензодіазепінами. Броміди раніше також використовувались як антиепілептичні речовини.

Терапевтична доза бромідів становить від 3 до 5 г. Летальна доза оцінюється від 10 до 20 г бромідів.

У промисловості та медицині можуть застосовуватись натрію, калію і амонію броміди, скополаміну гідробромід, гоматропіну гідробромід, бромований теофілін. Бром також застосовується як антигістамінний препарат і як складова бромфеніраміну.

Вміст брому в організмі людини становить 7 мг. Він локалізується переважно в залозах внутрішньої секреції, в першу чергу в гіпофізі. Роль сполук брому в життєдіяльності організму ще недостатньо вивчена. Сполуки брому пригнічують функцію щитовидної залози, підсилюють активність кори наднирників. При введенні в організм бромід-іонів найчутливішою є нервова система. Бромід-іони рівномірно нагромаджуються в різних відділах мозку і діють заспокійливо при підвищеній збудливості. Вони сприяють відновленню порушеної рівноваги між процесами збудження і гальмування.

Оральна біодоступність є повною. ( в середньому 96 % в одному дослідженні). Броміди розповсюджуються в організмі подібно до хлоридів, як виняток у червоних кров'яних клітинах.

Бромід-іони легко всмоктуються в шлунково-кишковому тракті. Токсичність бромід-іонів невисока. Внаслідок повільного виведення з організму (протягом 30—60 діб) вони можуть кумулюватись, що призводить до розвитку хронічного отруєння, яке називають бромізмом. При появі ознак хронічного отруєння бромом негайно припиняють прийом препаратів брому. Крім того, вводять велику кількість натрію хлориду (до 25 г в добу), щоб збільшити швидкість виведення бромід-іонів.

Броміди виділяються через селективну реадсорбцію в нирковий тубулярний фільтрат подібно до хлоридів. Період піввиведення бромідів є приблизно 12 днів після орального прийому. При хронічному отруєнні броміди мають здатність кумулюватись у організмі

Гостра токсичність є рідко. Велика кількість прийнятого всередину броміду викликає подразнення шлунка і блювоту. Терапевтичний ефект часто співпадає з токсичним.

Хронічні отруєння викликають головний біль, дративність, збудження, марення, провали у пам'яті, зниження апетиту, дизартрію, галюцинації, акне обличчя, ніг, тулуба (у 25-30 % випадків бромідної інтоксикації), ступор і кому. Лікар може збільшувати дозу бромідів до контрольованої втрати свідомості. Можуть також спостерігатись розлад координації рухів і генералізована гіперрефлексія. Неврологічні симптоми і ознаки корелюються з рівнем бромідів у крові.

**Виявлення бромідів (бromу) у сечі.** До 10 мл сечі додають 5 мл хлороформу і декілька крапель розчину нітратної кислоти. Суміш перемішують і залишають на 3 хв.

У присутності бромідів у сечі хлороформ забарвлюється у жовтий колір.

### **Токсикологічна характеристика йодидів (йоду)**

Йод – речовина синьо-чорного кольору, з металевим блиском і характерним запахом. Дуже отруйний. Так, ковтання 2-3 г йоду може призвести до смерті. Органічні та неорганічні сполуки йоду є токсичнішими від аналогічних сполук хлору та брому.

Навіть мала концентрація парів йоду викликає подразнення слизової оболонки дихальних шляхів, кон'юнктивіти, менше – шкіри. Вищі дози можуть викликати подразнення всього дихального апарату з наступним набряком легень. При контакті шкіри з кристалами або концентрованим розчином йоду утворюються ураження, подібні до теплових опіків. Ковтання концентрованого розчину йоду викликає гостре роз'їдаюче запалення стравоходу і шлунка.

Перша допомога – це призначення всередину великої кількості розчину крохмалю. Застосовують багатократне промивання шлунка 250-300 мл 1 % розчину натрію тіосульфату до тих пір, поки розчин крохмалю не перестане забарвлюватись у синій колір.

Йод відноситься до есенціальних елементів і його сполуки відіграють важливу роль в процесах обміну речовин. Йод впливає на синтез деяких білків, жирів, гормонів. У організмі людини міститься близько 25 мг йоду, більше половини якого знаходиться в щитовидній залозі. Майже весь йод, що міститься в цій залозі, знаходиться у зв'язаному стані (у вигляді гормонів) і тільки близько 1% його знаходиться у вигляді йодид-іонів. Щитовидна залоза здатна концентрувати йод в 25 разів швидше порівняно з плазмою. Щитовидна залоза продукує гормони тироксин і трийодтиронін.

Понижена активність щитовидної залози (гіпотиреоз) може бути пов'язана зі зменшенням її здатності нагромаджувати йодид-іони, а також з недостатчею йоду в їжі (ендемичний зоб). При ендемічному зобі призначають препарати йоду: (йодид калію або йодид натрію) в дозах, які відповідають добовій потребі людини в йоді (0,001 г калію йодиду). В районах, де є дефіцит йоду, для профілактики ендемічного зобу додають до кухонної солі натрію або калію йодид (1—2,5 г на 100 кг). При підвищеній активності щитовидної залози (гіпертиреоз) внаслідок надлишкового синтезу тиреоїдних гормонів спостерігається ненормально збільшена швидкість метаболічних процесів.

При неефективності вказаних препаратів для лікування гіпертиреозу застосовують препарати радіоактивного йоду, випромінювання яких руйнує фолікули щитовидної залози і тим самим зменшує надлишковий синтез гормонів.

Йод знаходиться у вигляді йодидів у морській воді (20 — 30 мг на тонну морської води). Присутній у живих організмах, найбільше у водоростях (5 кг на тонну висушеної морської капусти (ламінарії)). Відомий у природі також у вільній формі, як мінерал, але це поодинокі випадки, — в термальних джерелах Везувію і на о. Вулькано (Італія). Запаси природних йодидів оцінюються в 15 млн. тонн, 99 % запасів знаходяться в Чилі і Японії.

5-процентний спиртовий розчин йоду використовується для дезінфекції шкіри навколо пошкоджень (рваної, різаної або іншої рани). Продукти йоду з крохмалем, іншими ВМС (наприклад, так-званий. «Синій йод» — Йодинол, Йокс, Бетадин тощо) є м'якшими антисептиками.

В рентгенологічних і томографічних дослідженнях широко застосовуються йодвмісні контрастні препарати.

У криміналістиці пари йоду використовуються для виявлення відбитків пальців на паперових поверхнях, наприклад, на купюрах.

Йод використовується в джерелах світла, наприклад, в галогенових лампах як компонент газового наповнювача колби, в металогалогенових дугових лампах як газове середовище розряду.

Йод використовується як компонент позитивного електрода (окисника) в літєво-йодних акумуляторах. Останнім часом різко зріс попит на йод з боку виробників рідкокристалічних дисплеїв.

Йод отруйний. Смертельна доза становить 3 г. Викликає ураження нирок та серцево-судинної системи. При вдиханні парів йоду з'являється головний біль, кашель, нежить, може бути набряк легень. При потраплянні на слизову оболонку ока зумовлює сльозотечу, біль в очах і почервоніння. При потраплянні всередину з'являється загальна слабкість, головний біль, підвищення температури, блювота, пронос, бурий наліт на язичку, болі в серці і прискорений пульс. Через день з'являється кров у сечі. Через 2 дні з'являються ниркова недостатність та міокардит. Без лікування настає летальний вихід.

**Виявлення йодидів (йоду) у сечі.** До 10 мл сечі додають 5 мл хлороформу і декілька крапель розчину нітратної кислоти. Суміш перемішують і залишають на 3 хв.

У присутності йодидів у сечі хлороформ забарвлюється у рожево-фіолетовий колір.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Конспекти лекцій.
2. Токсикологічна хімія: підручник / Ніженковська І.В., Вельчинська О.В., Кучер М.М. – К.: ВСВ «Медицина», 2012. – 372 с.
3. Панасенко О.І., Каплаушенко А.Г., Самура Б.А., Кучер М.М. та ін. Загальна характеристика токсичних речовин, діагностика і лікування за гострих отруень. Київ, 2012. – 394 с.
4. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия.- К.: Вища школа, 1989.- 447 с.
5. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія.- К.: Вища школа, 1995.- 423 с.
6. Крамаренко В.Ф. Туркевич Б.М. Анализ ядохимикатов. – М.:Химия, 1978. – 264 с.
7. Кучер М.М., Галькевич І.Й. Газорідинна хроматографія в аналізі ліків та отрут. Том 1. Теоретичні основи методу. – Львів: ЛНМУ, 2011. - 236 с.
8. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. - М.: Медицина. - 1982.
9. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления. - М.: Медицина. - 1989
10. Швайкова М.Д. Токсикологическая химия.- М.: Медицина, 1975.- 416 с.
11. Токсикологічна хімія. Методичні вказівки до лабораторних занять та контрольних завдань. Посібник для студентів заочної форми навчання. / Галькевич І.Й., Кучер М.М., Туркевич О.Д. – Львів – 2005. – 128 с.
12. Парк Д. Биохимия чужеродных соединений. - М.: Медицина, 1973. - 288 с.
13. Могош Г. Острые отравления. - Бухарест: Мед. изд-во, 1984.- 580 с.
14. Методичні рекомендації до лабораторних занять з токсикологічної хімії (модуль 1) для студентів фармацевтичного факультету (спеціальність «Фармація»). - 2013. - 94с.