

ЛЕКЦИЯ № 6

Группа веществ, изолируемых из биологического материала экстракцией и сорбцией.

Общая характеристика соединений. Основы метода изолирования. Способы и методы очистки водных извлечений и экстрактов. Подгруппа «Лекарственные вещества». Токсикологическое значение. Особенности метода изолирования. Методы обнаружения и количественного определения.

Вещества кислотного характера:

1) Органические кислоты: бензойная, салициловая, ацетилсалициловая, пикриновая.

2) Барбитураты: барбитал, фенобарбитал, барбамил, этаминал-На, бутобарбитал, гексенал, бензонал, бензобамил, циклобарбитал и др.

Вещества нейтрального характера:

1) Небарбитуровые снотворные: ноксирон, тетридин.

2) Сердечные гликозиды.

3) Многоатомные фенолы: гидрохинон, пирогаллол.

4) Полинитропроизводные: м-динитробензол, динитротолуолы, тринитротолуол.

5) Производные анилина и п-аминофенола: фенацетин, п-фенилендиамин.

Вещества основного характера:

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

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

Теоретические основы метода изолирования

Уравнения степени ионизации (уравнение Гендерсона)

$$\alpha\% = \frac{100}{1 + \text{anti log}(pH - pK_{\alpha})} \quad \text{для оснований}$$

$$\alpha\% = \frac{100}{1 + \text{anti log}(pK_{\alpha} - pH)} \quad \text{для кислот}$$

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

$$K_p = \frac{C_{орг}}{C_{H_2O}}, \quad \text{где } K_p - \text{коэффициент распределения молекулярной формы,}$$

концентрации вещества в водной и органической фазах.

Чем больше K_p , тем эффективнее идет экстракция.

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

На первой стадии:

1) *Растворимость яда в используемом экстрагенте*

$pH = pK_{\alpha} + 2(3)$ для кислот

$pH = pK_{\alpha} - 2(3)$ для оснований

2) *Экстрагент*

-Способность легко проникать в клетки тканей.

-Высокая растворяющая способность (по отношению к яду).

-Селективность (по отношению к анализируемым соединениям).

3) *Степень измельченности объекта*

На второй стадии:

1) *Растворимость яда*, которая определяется степенью ионизации α и регулируется pH среды.

$pH = pK_{\alpha} - 2(3)$ для кислот

$pH = pK_{\alpha} + 2(3)$ для оснований

2) *Природа экстрагента*, его объем, время и кратность экстракции.

-Не смешиваются с водой и по плотности (ρ) значительно отличаются от нее.

-Имеют низкую температуру кипения.

-Хорошо растворяют изолируемое вещество и обеспечивают высокий коэффициент распределения его между водной и органической фазами

Уравнение степени экстракции (Е)

$$E = \frac{100 * Kp}{Kp + \frac{V_{H_2O}}{V_{орг}}}$$

где Kp - коэффициент распределения
 V_{H_2O} - объем водной фазы
 $V_{орг}$ - объем органической фазы

Изолирование подкисленным этанолом

- Настаивание измельченного объекта с этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой до pH 2-3, в течение суток.
- Упаривание объединенных спиртовых извлечений при температуре 40-50°C до густого остатка, в который по каплям добавляют абсолютный этанол для коагуляции белков.
- Упаривание фильтрата при той же температуре до густого остатка и разбавление горячей водой для удаления смолистых веществ, жиров и пигментов.
- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата хлороформом при pH 2 (трехкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).
- Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя до pH 9-10, экстрагирование веществ сильноосновного характера (трехкратная экстракция) хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

Достоинства метода:

1. Метод универсален, т.к. этанол является хорошим растворителем для многих веществ этой группы (как ионизированных, так и молекулярных форм).
2. Метод предусматривает очистку извлечения от балластных веществ.

Недостатки метода:

1. Длительность (8-10 рабочих дней) и многостадийность.
2. Потери искоемых веществ.
3. Сравнительная дороговизна метода.

Изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой

- Настаивание измельченного объекта с водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2-3, в течение двух часов.
- Экстрагирование веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера из водного фильтрата хлороформом при pH 2 (трехкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием (фракция А, «кислое» извлечение).
- Подщелачивание оставшегося после разделения фаз водного слоя раствором аммиака до pH 9-10, экстрагирование веществ основного характера трехкратной экстракцией хлороформом, отделение органической фазы и концентрирование упариванием (фракция Б, «щелочное» извлечение).

Достоинства метода:

1. Быстрота (анализ можно провести в течение одного рабочего дня).
2. Меньшее количество операций, меньшие потери искомых веществ.
3. Экономичность и дешевизна.

Недостаток метода:

Образование стойких эмульсий при экстрагировании веществ из водной фазы хлороформом.

Изолирование барбитуратов подщелоченной водой

- Настаивание измельченного объекта с водой, подщелоченной 20% раствором гидроксида натрия до pH 10 и более, в течение 30 минут.
- Очистка водного извлечения путем насыщения вольфраматом натрия в кислой среде (H_2SO_4) до pH 2, фильтрация раствора.
- Экстрагирование эфиром, концентрирование эфирного извлечения упариванием.

Достоинство метода:

Метод дает достаточно чистые извлечения, т.к. включает стадию очистки (осаждение белков вольфраматом натрия), что повышает качество последующего анализа.

Недостаток метода:

Соосаждение барбитуратов с белками при обработке вольфраматом натрия.

Частный метод изолирования алкалоидов водой, подкисленной серной кислотой (по В.Ф.Крамаренко)

- Настаивание измельченного объекта с водой, подкисленной 20% раствором серной кислоты до pH 2-3, в течение двух часов.
- Очистка водного извлечения от белковых соединений путем насыщения его сульфатом аммония, настаивания в течение часа и фильтрования образовавшегося осадка.
- Очистка фильтрата от жиров, смол, пигментов путем экстракции эфиром. Эфирное извлечение отбрасывают.
- Подщелачивание водного извлечения 20% раствором гидроксида натрия и экстрагирование веществ основного характера хлороформом при pH 9-10 (трехкратная экстракция), отделение органической фазы и концентрирование полученного извлечения упариванием.

Достоинства метода:

1. Быстрота
2. Хорошая очистка извлечений от соэкстрактивных веществ

Недостаток метода:

Потеря искоемых веществ из-за соэкстракции на стадии очистки

Исследование биологических жидкостей (кровь, моча, плазма, слюна, сыворотка, промывные воды желудка)

1. Жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)

Соответствует 2-ой стадии изолирования

Недостаток:

При прямой ЖЖЭ совместно с ядами из биожидкостей могут экстрагироваться сопутствующие вещества, что заставляет в дальнейшем прибегать к различным методам очистки

2. Сорбция на синтетических смолах, модифицированных силикагелях и активированном угле

Достоинства:

1. Метод позволяет не проводить дополнительную обработку пробы и изолирование.
2. Дает возможность одновременно сконцентрировать вещество и провести очистку.

Недостаток:

При неизвестном яде - опасность его потери из-за недостаточной сорбции и проскакивания через колонку сорбента.

ОЧИСТКА ИЗОЛИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ ОТ СОПУТСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ БИОМАТЕРИАЛА

Созэкстрактивные вещества мешают проведению анализа:

1. Маскируют окраску при проведении реакций окрашивания (обугливание созэкстрактивных веществ под действием концентрированной серной кислоты).
 2. Снижают чувствительность микрокристаллических реакций и приводят к образованию кристаллов неправильной формы, либо к их полиморфизму (многообразие форм).
 3. Искажают спектры веществ при исследовании в УФ - и ИК-областях.
 4. Дают завышенные результаты количественного определения веществ.
- Многие продукты гнилостного разложения биоматериала дают такие же реакции, как и некоторые ядовитые вещества.

ОЧИСТКА ИЗОЛИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ ОТ СОПУТСТВУЮЩИХ КОМПОНЕНТОВ БИОМАТЕРИАЛА

На 1 этапе изолирования:

1. Удаление механических загрязнений (мелких частиц биоматериала) фильтрованием или центрифугированием.
2. Осаждение примесей при добавлении соответствующих реагентов, например, осаждение белков абсолютным спиртом, ацетоном, трихлоруксусной кислотой, вольфрамовой, фосфорно-вольфрамовой, фосфорно-молибденовой кислотами, насыщение электролитами (Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl).
3. Изменение состава фаз, т.е. введения другого органического растворителя.

На 2 этапе изолирования или после него:

- **Реэкстракция**, т.е. перевода веществ из одной жидкой фазы в другую при изменении pH раствора.
1. **Сублимация** - для веществ, способных возгоняться без разложения при нагревании (салициловая кислота, бензойная кислота, барбитураты, жидкие алкалоиды).
 2. **Хроматография** - ионообменная, гель-хроматография, адсорбционная хроматографии на колонках, тонкослойной хроматография.

Аналитический скрининг лекарственных веществ

СКРИНИНГ - это научно обоснованная система поиска неизвестного яда, когда в процессе последовательных операций поэтапно отсеиваются (или определяются) отдельные группы веществ или индивидуальные соединения.

Требования предъявляемые к скрининговым методам:

- - универсальность (возможность подвергнуть исследованию большое количество веществ);
- - достаточная специфичность (чаще групповая);
- - высокая чувствительность (мкг и десятые доли мкг);
- - экспрессность (возможность выполнения серийных анализов);
- - точность ($\pm 10 \%$) и воспроизводимость;
- - простота и доступность;
- - лабильность (возможность оптимизации и модернизации за счет введения новых соединений, материалов, реагентов и оборудования в существующую систему скрининга);
- - возможность сочетания с другими методами анализа.

Аналитический скрининг лекарственных веществ

Физико-химические методы, применяемые в аналитическом скрининге:

- 1. Хроматографические**
- 2. Спектроскопические**
- 3. Иммунохимические**

Общий скрининг - предусматривает химическое исследование веществ, отличающихся по своему строению и принадлежащих к различным фармакологическим группам.

В основном применяется групповая идентификация (например, выделяется группа барбитуратов, производных фенотиазина и др.).

Частный скрининг - направлен на исследование веществ внутри группы и идентификацию отдельных ее представителей.

Примером - хроматографическое исследование на производные барбитуровой кислоты, позволяющее идентифицировать конкретного представителя в группе барбитуратов.