МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ЦЕНТР СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ

Стандартные операционные процедуры

«Методика экспертного исследования по определению аконитина в трупном материале»

СОСТАВИТЕЛЬ: Жуматаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»,

судебно-медицинский эксперт высшей категории

Астана, 2016 год

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

|  |  |
| --- | --- |
| 1. Наименование методики | Методика экспертного исследования по определению аконитина в трупном материале |
| 2.Шифр специальности методики | 27.1 |
| 3. Информация об авторе (ах) (составителе (ях)) методики | Составитель: Жуматаева Г.С. |
| 4, Сущность методики | Сущность метода; Изолирование токсического вещества из объектов биологического происхождения, очистка вытяжек от примесей, для выделения токсических веществ из предварительно очищенных вытяжек. Обнаружения токсических веществ. |
| 4.1 Экспертные задачи, решаемые методикой | Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из различных биологических объектов подкисленной водой. Очистка полученных экстрактов, идентификация и количественное определение. |
| Объекты исследования  Методы исследования | Биологические жидкости и ткани, промывные воды, другие жидкости.  Тонкослойная хроматография. |
| 4.4 Краткое поэтапное описание методики | 1. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из тканей внутренних органов.  2. Пераичнаяочисткаэкстрактов  3. Хроматографическая очистка  4. Предварительное исследование  5. Проведение дополнительных подтверждающий исследований в зависимости от количественного содержания  6. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из крови  7. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из мочи  8. Выделение аконитина и его метаболитов (бензоилаконина и аконина) из настойки |
| 5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСМ МЮ РК | Протокол №1 от 07 «ноября» 2016г. |
| 6. Информация о лице составившим паспорт методики | Составитель: Жуматаева Г.С. РГКГТ «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно­медицинский эксперт высшей категории |

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. Введение 5

2. Область применения 5

3. Термины и обозначения 5

4. Основная часть 6

5. Заключение 12

6. Список использованных источников 12

**1. Введение.**

Аконитин (систематическое наименование аконитина - (1а,3а,6а,14а,15а,16β) – 8- ацетокси-20-этил-3,13,15-тригидрокси-1,6-16-триметокси-4-(метоксиметил) аконитанил-14-бензоат относится к числу очень ядовитых алкалоидов, содержащихся в некоторых видах аконита (борца). Аконитин в указанных растениях находится в смеси с другими алкалоидами. В зависимости от вида аконитов может меняться качественный и количественный состав алкалоидов в растениях, принадлежащих к этим видам. До настоящею времени изучен алкалоидный состав свыше *25* видов аконита. Почти но всех этих видах содержится смесь аконитина, мезаконитина, гипаконитина и ряда аморфных азотистых оснований. Известны виды аконита, содержащие и другие алкалоиды.

Аконитин экстрагируется органическими растворителями из щелочных водных растворов. Максимальные количества этого алкалоида экстрагируются при pH = 8,0... 10,0. Однако в определенной степени аконитин экстрагируется и из кислых растворов при pH = 2 и выше.

Действие на организм. Аконитин н настойка аконитов в некоторых странах применяются в мазях как анальгезирующее средство (при невралгиях тройничного нерва, артритах и т.д.).

Как аконитин, так и части растений, содержащие этот алкалоид, могут быть причиной отравлений. Известны случаи отравлений цветами, семенами, клубнями аконитов. Аконитин возбуждает, а затем парализует окончания чувствительных нервов. Он оказывает рефлекторное влияние на сердце и органы дыхания. Позднее наступает паралич центров головного и спинного мозга. Аконитин является одним из самых сильных и быстро всасывающихся ядов. Он хорошо всасывается через пищевой канал. В зависимости от дозы аконитина смерть может наступить через несколько минут. Аконитин быстро разлагается в организме. Образовавшиеся при этом метаболиты из организма выделяются с мочой.

**2. Область применения.**

Данные процедуры используются при производстве химико-токсикологических экспертиз (исследований) трупного материала с целью установления наличия аконитина и его метаболитов.

**3. Термины и обозначения.**

*Экстракция* - процесс извлечения растворителями соответствующих веществ из различных объектов. Объекты, из которых извлекают соответствующие соединения, могут быть твердыми веществами или жидкостями. Поэтому процессы изолирования подразделяют на экстракцию в системе твердое тело - жидкость (твердожидкостная экстракция) и на экстракцию в системе жидкость- жид кость (жидкостная экстракция).

*Экстрагент* - органический растворитель, в индивидуальном состоянии или содержащий какие-либо реагенты, извлекающий (экстрагирующий) данное вещество из водной фазы.

*Экстракционный реагент* - составная часть экстрагента, взаимодействующая с извлекаемым веществом с образованием экстрагирующегося соединения.

*Экстракт -* отделенная жидкая органическая фаза, содержащая экстрагированное из водной фазы вещество.

*Реэкстракция —* процесс обратного извлечения вещества из экстракта в водную фазу.

*Реэкстракт -* отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

рК - равновесное отношение концентрации элемента в одной фазе к его концентрации в другой фазе, например в системе из двух несмешивающихся жидкостей Р. к. может быть больше или меньше единицы;

hRf - значение Rf умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель Rf. один из основных показателей в ТСХ - параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, гак и от физических параметров. Определение значения Rf проводят как отношение расстояния, прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя Rf = L/L0. Значение Rf — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

**4. Применяемые процедуры.**

4.1 Выделение аконитина из тканей внутренних органов.

100 г тщательно измельченного органа (желудок, кишечник, печень, почка) смешивают в стакане ёмкостью 300 мл со 100 мл этанола, смесь подкисляют насыщенным спиртовым раствором шавелевой кислоты до pH 2,0 по УИБ и настаивают, при частом перемешивании, в течение 2 часов. Спиртовое извлечение отделяют центрифугированием при 5000 об/мин. В течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают в фарфоровую чашку, ткань органа смешивают со 100 мл этанола, проверяют реакцию среды (pH 2,0) и вновь настаивают в течение 2 часов. Извлечение аконитина подкисленным этанолом проводят три раза.

Объединённые спиртовые извлечения упаривают на термостатированной водяной бане (в термостате или с помощью вакуум-испарителя) при 65 до получения густого остатка (при наличии жира-до полного испарения спирта).

4.2 Очистка извлечения.

Остаток тщательно обрабатывают горячей (90-95 ) водой (25 мл x3), выделившийся осадок отделяют центрифугированием. При наличии жира надосадочную жидкость отфильтровывают под вакуумом. Остаток в центрифужном стакане заливают 50 мл воды, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2,0 настаивают, при перемешивании, в течение 15 минут., центрифугируют и надосадочную жидкость присоединяют к ранее полученной. Жидкость насыщают при pH 2,0 безводным натрия сульфатом и через 1 час экстрактивные вещества отделяют центрифугированием. Осадок в центрифужном стакане промывают 25 мл насыщенного раствора натрия сульфата, подкисленного щавелевой кислотой до pH 2,0 и отделяют центрифугированием.

Центрифугат (pH 2,0) извлекают эфиром два раза по 60 мл. Водную фазу подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 8,0 и экстрагируют эфиром (60x2). Эфирные извлечения из щелочного раствора фильтруют через слой безводного сульфата натрия в делительную воронку (натрия сульфат промывают 10 мл эфира) и реэкстрагируют 0,1 Н. раствором соляной кислоты (15мл х 2). Реэкстракг подщелачивают 25 *%* раствором аммиака до pH 9,0 и экстрагируют эфиром (15 мл х 2). Эфирные извлечения фильтруют через небольшой слой безводного натрия сульфата, промывают 5 мл эфира. Эфир выпаривают при комнатной температуре досуха,

4.2 Выделение аконитина из крови.

100 мл трупной крови смешивают с 25 г безводного натрия сульфата и при перемешивании добавляют небольшими порциями насыщенный спиртовой раствор щавелевой кислоты до полного свёртывания крови. Затем прибавляют 100 мл этанола, настаивают, при частом перемешивании, в течение 2-х часов и проводят исследование по методике, описанной ранее.

4.3 Выделение аконитина из мочи и промывных вод.

100 мл мочи или промывных вод подкисляют насыщенным водным раствором щавелевой кислоты до pH 2,0 и прибавляют безводный натрия сульфат до насыщения. Через один чае экстрактивные вещества отделяют центрифугированием, осадок промывают 25 мл насыщенного водного раствора натрия сульфата, подкисленного щавелевой кислотой до pH 2,0, и далее исследуют.

1. Выделение аконитина из настойки аконитина.

1,0 - 2,0 г настойки аконита смешивают с 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и полученный раствор экстрагируют 10 мл эфира. При необходимости исследования больших объемов настойки, ее упаривают при 650 - 700 до 1 - 2 мл, обрабатывают 10 мл соляной кислоты, фильтруют и экстрагируют эфиром. Водную фазу подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,0 и извлекают хлороформом 2 раза по 10 мл. Хлороформные извлечения фильтруют через небольшой слой безводного натрия сульфата, фильтр промывают 5 мл хлороформа и органический растворитель выпаривают при 400 досуха. Остаток подвергают хроматографическому исследованию.

4.4 Хроматографическая очистка и предварительное обнаружение аконитина.

Остаток растворяют в 3 мл хлороформа и переносят 1,0 и 2,0 мл раствора в две фарфоровые чашечки. После концентрирования растворы количественно наносят на стартовую линию тонкого фиксированного слоя силикагеля КСК, забуферённого 0,1н раствором едкого натра, в виде двух полос 1-1,5 см и 2-3 см соответствующих 1/3 и 2/3 извлечения, хроматографируют в системе этанол-хлороформ 1:5. Метчики-хлороформные растворы аконитина основания, бензоилаконина и аконина, по 0,02мл которых наносят в одну точку на стартовую линию. Длина пробега фронта растворителя 10 см, продолжительность хроматографирования 46-60 мин. Хроматограмму высушивают на воздухе. Зоны метчика и первой полосы, соответствующей 1/3 исследуемого извлечения, опрыскивают модифицированным реактивом йодида висмута в йодиде калия. При наличии аконитона наблюдается пятно жёлто оранжевого цвета с Rf 0,68-0,75, параллельного метчику, Открываемый минимум 0,5 мкг аконитина основания в пятне.

При наличии бензоилаконина и аконина проявляются пятна, имеющие Rf соответственно 0,20-0,25 и 0,05-0,10.

При отсутствии на хроматограмме пятна с Rf 0,68-0,75, параллельного пятну аконитина, дают заключение о не обнаружении аконитина.

Описанной методикой обнаруживаются 50 мкг аконитина/ 100 г органа.

Непроявленный участок силикагеля, параллельный проявленным пятнам аконитина и соответствующий 2/3 извлечения, переносят с помощью электроотсасывателя в хроматографическую колонку (20x0,8 см), снабжённую капиллярной насадкой. Элюируют аконитин 10 мл ацетона со скороестью не более 60 капель в мин.

Если при проявлении аконитина было получено слабоокрашенное пятно, то его обрабатывают несколькими каплями 10% спиртового раствора едкого кали и высушивают на воздухе. Обесцвеченный участок силикагеля переносят в хроматографическую колонку и элюируют ацетоном при тех же условиях. Элюаты объединяю г и выпаривают при 40° досуха.

4.5 Количественное определение.

Остаток растворяют в 10 мл ацетатного буфера (рН4,5) порциями по 4, 3, 3 мл. Раствор переносят в делительную воронку, прибавляют 0,5 мл раствора метилового оранжевого, 10 мл хлороформа и энергично встряхивают в течение 2-х мин. После отстаивания хлороформный слой, окрашенный в желтый цвет, сливают в калиброванную пробирку, добавляют хлороформ до 10 мл и перемешивают. Оптическую плотность раствора замеряют на спектрофотометре при 420 нм в 1 см кювете или на фотоэлектрокалориметре, используя светофильтр с максимумом светопропускания при 410-430 нм. Раствор сравнения - хлороформ.

Если оптическая плотность анализируемого раствора превышает оптическую плотность стандартного раствора, содержащего 100 мкг аконитина в пробе, исследуемый раствор разбавляют хлороформом в различных соотношениях (до 1:10). Степень разбавления учитывают при расчёте. Концентрацию аконитина определяют по калибровочному графику.

Для построения графика определённые объёмы (от 0,1 до 1,0 мл) стандартного раствору аконитина основания помещают в делительные воронки, объём доводят до 10 мл ацетатным буферным раствором и далее исследуют, как описано выше.

Количественное содержание аконитина рассчитывают по формуле:

X=3‧С‧V2‧100/2‧н‧ V1‧1000, где

Х - количество аконитина в 100 г объекта в мг;

С - количество аконитина в 10 мл колориметрируемого раствора, найденное по калибровочному графику в мг;

V2/ V - разведение окрашенного раствора;

Н- навеска объекта в граммах.

Примечание: Если для анализа было взято извлечение, то коэффициент 3/2 следует опустить.

Граница определения - 50 мкг аконитина в 100 г печени.

4.6 Дополнительные исследования.

После количественного определения окрашенный хлороформный раствор выпаривают в фарфоровой чашечке до 0,5 мл и переносят в хроматографическую колонку, содержащую 0,5 г окиси алюминия II степени активности. После впитывания раствора слоем сорбента через колонку пропускают 5 мл ацетона со скоростью на более 60 капель в минуту. При этом метиловый оранжевый сорбируется на окиси алюминия, а аконитин элюируется ацетоном. Ацетоновый раствор выпаривают при 40о, остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и снимают спектр абсорбции в области 220 - 280нм - максимум поглощения наблюдается при 233 - 234 нм. Раствор сравнения - 0,1н. раствор соляной кислоты. Открываемый минимум - 2 мкг

аконитина основания б 1 мл раствора,

Граница обнаружения аконитина спектрофотометрическим методом - 250мкг в 100 г объекта.

Исследуемый солянокислый раствор подщелачивают 25% раствором аммиака до pH 9,0 и экстрагируют хлороформом (5 мл х 2). Хлороформные извлечения фильтруют через небольшой слой натрия сульфата в фарфоровую чашечку и выпаривают при 40{) досуха. Остаток растворяют в 2-3 каплях 0,1 н. раствора соляной кислоты и раствор переносят на два предметных стекла с углублениями. К раствору на одном стекле прибавляют каплю 10% раствора аммония (калия) бихромата в 2н. растворе соляной кислоты. Через 5-15 мин. под микроскопом наблюдаются сростки из призматических кристаллов в виде пучков, веток и отдельные призматические кристаллы. Кристаллы анизотропные, угол погасания прямой, знак удлинения отрицательный. Показатели преломления: nq = 1.618.

np =1.609; двупреломлелие: nq - nр =0,009. Открываемый минимум - 0,17 мкг аконитина основания.

Граница обнаружения 100мкг аконитина в 100г печени, при условии деления остатка на две части.

К раствору на втором стекле прибавляют каплю раствора роданидного комплекса никеля. Предметное стекло переносят в чашку Петри, насыщенную парами йода. Через 10-30 минут под микроскопом наблюдают пучки и ветки из призматических кристаллов.

Граница обнаружения — 250 мкг аконитина в 100 г. печени.

Если при количественном определении найдено менее 100 мкг аконитина, то проводят одну реакцию с раствором аммония (калия). Положительный результат данной реакции в сочетании с величиной Rf аконитина на хроматограмме могут служить основанием для заключения об обнаружении аконитина.

При обнаружении на хроматограмме пятна с Rf (бензоилаконин) непроявленный участок силикагеля, соответствующий этому пятну, переносят в колонку и бензилаконин элюируют ацетоном также, как аконитин. После испарения ацетона остаток растворяют в 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и снимают спектр абсорбции в диапазоне 220 - 280 нм (раствор сравнения - 0,1 н. соляная кислота). Обнаружение бензоилаконина по величине Rf па хроматограмме и максимуму абсорбции при 233- 234 нм может служить дополнительным (наряду с обнаружением аконитина) тестом для доказательства обнаружением аконитином.

4.7 Цветовые тесты.

4.7.1 Реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов. Аконитин с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Майера, Шейблера, Зонненшейна дает осадки.

4.7.2 Реакция с перманганатом калия. На предметное стекло наносят несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1—2 капли 1 %-го раствора серной кислоты, а затем каплю 1 %-го свежеприготовленного раствора перманганата калия, 11ри наличии аконитина через 10—20 мин появляются красно-фиолетовые кристаллы (сростки из призм, сфероиды). Предел обнаружения: 0,02 мг аконитина в пробе.

Эти кристаллы по форме отличаются от кристаллов, которые образуются при взаимодействии перманганата калия с кокаином, скополамином, гидрастином и др.

4.7.3 Реакция с роданидом кобальта. В делительную воронку вносят несколько капель раствора исследуемого вещества, прибавляют 3 5 капель 20 %-го раствора гидроксида натрия и 10 мл хлороформа. Содержимое делительной воронки взбалтывают 10 мин. Затем от водной фазы отделяют хлороформную вытяжку, к которой прибавляют 0,2 г винной кислоты, 1 мл раствора роданида кобальта и взбалтывают. При наличии аконитина хлороформный слои приобретает синюю окраску. Такую же окраску дают кокаин, наркотин, папаверин, бруцин и некоторые третичные амины. Эта реакция может быть использована для обнаружения аконитина в его препаратах и в растительном сырье. Приготовление раствора роданида кобальта. Смешивают 1 г нитрата кобальта (II) и 4 г роданида калия. Смесь этих веществ растворяют в 20 мл воды.

4.7.4 Реакция с резорцином и серной кислотой. 5—10 капель исследуемого раствора вносят а фарфоровую чашку и выпаривают досуха. К остатку прибавляют 4 капли 80 %-го раствора серной кислоты и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Затем прибавляют несколько кристалликов резорцина и продолжают нагревание. Появление красной окраски (через 3—20 мин) указывает на наличие аконитина в пробе. Предел обнаружения: 0,1 - 0,5 мг аконитина в пробе. Эта реакция малочувствительная. Она рекомендуется для обнаружения аконитина в растительном материале, настойках и в некоторых других объектах.

4.8. Обнаружение аконитина по УФ- и ИК-спектрам. Раствор аконитина и смеси воды и этилового спирта (1:1) имеет максимумы поглощения при 228 и 270 нм. Этот препарат в 0,1 н. растворе серной кислоты имеет максимумы поглощения при 234 и 275 нм. В ИК-области спектра основание аконитина (диск с бромидом калия) имеет основные пики при 1092, 1273 и 1713 см-1.

**5. Заключение.**

Описанная процедура является сводом методов используемых в химико-­токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации и количественного определения соответствующих веществ в биологических объектах и объектах не биологического происхождения .

**6. Список использованных источников.**

1. «Методические указания. Об определении аконитина при судебно-­химическом исследовании биологического материала» МЗ СССР г. Москва- 1976 г.

2. Крамаренко В.Ф./Токсикологическая химия / Киев, «Выща школа», 1989.