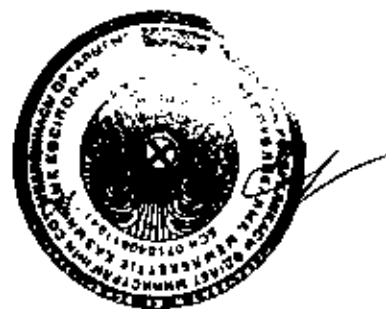


МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ЦЕНТР СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ



Стандартные операционные процедуры
Методика экспертного исследования по определению в биологических
объектах некоторых ядохимикатов методом тонкослойной хроматографии

СОСТАВИТЕЛЬ: Жуматаева Г.С. РККП «Центр судебной медицины МЮ РК»,
судебно-медицинский эксперт высшей категории

Астана, 2016 год

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики

Методика экспертного исследования по определению в биологических объектах некоторых ядохимикатов методом тонкослойной хроматографии.

2. Шифр специальности методики

27.1

3. Информация об авторе (ах) (составителе (ях)) методики

Составитель: Жуматаева Г.С.

4. Сущность методики

Сущность метода: Метод основан на извлечении анализ хлорорганических пестицидов, изолируемых из биоматериала при помощи неполярных или малополярных органических растворителей относятся неионизируемые органические вещества, а также некоторые органические кислоты, основания и элементарорганические соединения различных по химической природе веществ, предназначенных для уничтожения или предотвращения развития организмов, приносящих вред сельскохозяйственным культурам, домашним животным и человеку.

4.1 Экспертные задачи, решаемые методикой

Идентификация ядохимикатов в биологических образцах и других объектах.

4.2 Объекты исследования

Основными объектами судебно-химического исследования при отравлении ядохимикатами являются биологические (биожидкости и органы трупа), технические жидкости, а также пищевые продукты. При острых отравлениях - это моча, кровь, рвотные массы, промывные воды желудка. Высокая липофильность некоторых групп пестицидов (ХОС, ПХБ и др.) обуславливает накопление данных веществ в жировой ткани, а также, что наиболее опасно, в грудном молоке кормящих женщин. Эти объекты могут быть исследованы при хронических отравлениях.

- 4.3 Методы исследования Хроматографические методы.
- 4.4 Краткое поэтапное описание методики
- ТСХ - анализ хлорорганических пестицидов (ХОП);
 - ТСХ анализ синтетических пиретроидов (СП);
 - ТСХ анализ производных карбаминовой кислоты
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. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно-медицинский эксперт высшей категории

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Область применения	5
3. Термины и обозначения	5
4. Основная часть	6
5. Заключение	10
6. Список использованных источников	11

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ядохимикаты широко используются в сельском хозяйстве, в быту, как эффективные средства борьбы с вредителями и болезнями растений, как средства защиты животных. Ядохимикаты также применяются для борьбы с грызунами - переносчиками заразных болезней. Применяемые ядохимикаты принадлежат к различным классам химических соединений. Все они объединяются под общим названием пестициды. Эти вещества могут оказать вредное действие на организм человека. Наличие отдельных случаев отравлений ядохимикатами свидетельствует об их токсичности, вследствие чего они могут быть объектами как химико-токсикологического анализа (ХТА), так и судебно-химического анализа (СХА).

2. Область применения

Методика применяется при направлении биологического материала на ядохимикаты.

Перечень искомым веществ данной группы зависит от поставленных на разрешение химико-токсикологической экспертизы (исследования) вопросов, состояния и перечня представленных образцов и их количества, обстоятельств дела.

Химико-токсикологический анализ может быть расширен на другие вещества в зависимости от клинической, секционной картины, обстоятельства дела, данных, полученных с места происшествия, особенностей течения химических реакций.

При проведении химико-токсикологического анализа эксперт может использовать любые из описанных методик исследования в зависимости от наименований представленных образцов их количества, с учётом фазы распределения искомого вещества.

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–жидкость (жидкостная экстракция).

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

В химико-токсикологическом анализе метод твердофазной экстракции применяется для изолирования исследуемых веществ из органов трупов, растений, почвы и других объектов. При экстракции веществ в системе твердое тело–жидкость в качестве экстрагентов применяют органические растворители. Для данной системы в ряде случаев используют выщелачивание.

Жидкостная экстракция – процесс распределения растворенного вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами, одной из которых в

большинстве случаев является вода, а второй – несмешивающийся с водой органический растворитель.

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.

Реэкстрагент – раствор реагента, используемый для извлечения вещества из экстракта.

Реэкстракт – отделенная водная фаза, содержащая вещество, извлеченное из экстракта.

Разбавитель – относительно инертный органический растворитель, прибавляемый к экстрагенту для улучшения его физических или экстракционных свойств.

Промывка – процесс частичного или полного удаления примесей из экстракта или реэкстракта.

СП- синтетические пиретроиды;

ХОП - хлорорганические пестициды;

ЖКТ –желудочно-кишечный тракт;

ТСХ- тонкослойная хроматография;

ГХ-газовая хроматография;

ГЖХ-газожидкостная хроматография;

ВЭЖХ-высокоэффективная жидкостная хроматография;

МС-масс-спектрометрия

УФ-ультрафиолетовый спектр

hR_f - значение R_f умноженное на 100, для того, чтобы не оперировать десятичными значениями. Показатель R_f один из основных показателей в ТСХ - параметр зависит как от свойств разделяемых веществ, состава подвижной фазы и сорбента, так и от физических параметров. Определение значения R_f проводят как отношение расстояния прошедшего веществом к расстоянию, прошедшего фронтом растворителя $R_f = L/L_0$. Значение R_f — величина безразмерная и имеет значение от 0 до 1.

4. Исследовательская часть.

4.1. ТСХ - анализ хлорорганических пестицидов (ХОП).

К хлорорганическим пестицидам принадлежит большая группа хлорорганических соединений различных углеводородов. По химической структуре их делят на хлорпроизводные: ароматических углеводородов (ДДТ, гексахлоран, гексахлорбензол); пиненовой фракции скипидара (полихлорпинен, полихлоркамфен), диеновой группы (альдрин, дильдрин).

Гексахлоран (ГХЦГ, гаммексан) - кристаллический порошок белого или светло-серого цвета с неприятным запахом. В воде нерастворим, хорошо растворяется в органических растворителях. Обладает средней степенью токсичности.

Гамма-изомер гексахлорциклогексана (линдан, гаммексан) - белый кристаллический порошок почти без запаха. В воде нерастворим, хорошо растворяется в органических растворителях. Кумулятивные свойства менее выражены, чем у технического гексахлорана.

Гептахлор - белый кристаллический порошок со слабо ароматическим запахом. Нерастворим в воде, хорошо растворяется в органических растворителях. Высокотоксичный для животных. ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтан, пентахлорин)-инсектицид средней токсичности. Обладает выраженным кумулятивным действием. В настоящее время не используют, но остатки препарата обнаруживают в почве, кормах.

Полихлорпинен (ПХП, хлортен) - вязкая жидкость коричневого цвета. Препарат нерастворим в воде, хорошо растворяется в органических растворителях. Эффективный инсекто-акарицид, средней токсичности. При поступлении в организм животных ингаляционным путем токсичность его усиливается.

Полихлоркамфен (токсафен) - воскообразная масса темно-коричневого цвета со слабым запахом скипидара. Препарат нерастворим в воде, хорошо растворяется в ацетоне, бензоле, маслах. Разрушается щелочами. Обладает средней токсичностью.

Гексахлорбензол (ГХБ) - белое кристаллическое вещество с неприятным специфическим запахом. Препарат нерастворим в воде, хорошо растворяется в бензоле, спирте и других органических растворителях, малотоксичен.

ХОП хорошо всасываются слизистыми оболочками ЖКТ. Этому способствует их свойство липотропности - ХОС концентрируются в богатых жиром тканях. Обычно наибольшее количество этих соединений обнаруживается во внутреннем жире, печени, головном и спинном мозге, семенниках и железах внутренней секреции (особенно в надпочечниках).

Для ТСХ-анализа используются следующие хроматографические системы:

4.1.1. гексан:ацетон(6:1)-рекомендуется для самодельных пластинок; $R_f = 0,28$ (ГХЦГ); $R_f = 0,5$ (ДДД); $R_f = 0,55$ (α -ГХЦГ); $R_f = 0,63$ (ДДТ); $R_f = 0,7$ (гептахлор); $R_f = 0,74$ (ДДЕ); $R_f = 0,95$ (альдрин).

4.1.2. 1% раствор ацетона в н-гексане - для заводских пластинок. $R_f = 0,15$ (ГХЦГ); $R_f = 0,2$ (ДДД); $R_f = 0,24$ (α -ГХЦГ); $R_f = 0,31$ (ДДТ); $R_f = 0,46$ (гептахлор); $R_f = 0,52$ (ДДЕ); $R_f = 0,62$ (альдрин). Для разделения ДДТ, ДДЕ и ДДД также можно использовать хроматографическую систему: гексан - $R_f = 0,56$ (ДДТ); $R_f = 0,65$ (ДДЕ); $R_f = 0,18$ (ДДД).

4.1.3. Для ТСХ-анализа ХОП также можно использовать системы: гексан - бензол (6:1), толуол - ацетон (95:5), циклогексан - толуол (6:1), гексан - ацетон (4:1).

4.2. Детектирующие реагенты:

4.2.1. Свежеприготовленный аммиачно-ацетоновый раствор нитрата серебра (5г нитрата серебра, 5мл воды очищенной, 7мл 25% раствора гидроксида аммония и ацетон до 100мл), с последующей экспозицией пластинки в УФ-свете в течение 15-40 мин на расстоянии 15 см от источника света. ХОП (за

исключением гексахлорциклогексана) проявляются в виде пятен серо-черного цвета на белом фоне в течение 10-15 мин.

4.2.2. Раствор серебра нитрата с 2-феноксизэтанолом (0,25г серебра нитрата, 2,5мл воды очищенной, 5мл 2-феноксизэтанола и ацетон до 100мл. для увеличения проявляющей способности прибавляют 2-3 капли 30% перекиси водорода), с последующей экспозицией пластинки под УФ-светом в течение 30 мин на расстоянии 15 см от источника света. ХОП проявляются в виде пятен серого цвета на белом фоне.

4.2.3. 0,5% этанольный раствор о-толидина, с последующей экспозицией в УФ-свете. ХОП проявляются в виде коричневых пятен на желтом фоне (м.б. синие пятна на белом фоне).

4.2.4. Дифениламинный реактив. (смесь 1 объема 20% раствора дифениламина в ацетоне с 2 объемами 10% ацетонового раствора цинка хлорида. Готовится перед употреблением), с последующей экспозицией в УФ-свете.

4.2.5. Бензидиновый реактив. (0,5% этанольный раствор, используется для гептахлора, ДДТ и его метаболитов, гексахлора).

4.2.6. 0,1н. калия перманганата.

4.3 ТСХ анализ синтетических пиретроидов (СП).

К синтетическим пиретроидам относятся производные циклопропанкарбоновой кислоты. По химической структуре – это сложные эфиры циклопропанкарбоновой кислоты и производные феноксипензилового спирта.

В список обязательных к химико-токсикологическому исследованию входят следующие СП: амбуш, цимбуш, каратэ.

Перметрин — инсектицид, акарицид. Относится к группе пиретринов (пиретроидов). Химическое название: 3-Феноксипензиловый эфир 3-(2,2-дихлорэтил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты.

4.3.1. Для разделения и идентификации наиболее результативны 2-х и 3-х компонентные системы растворителей, на основе гексана и ацетона, гексана и диэтилового эфира приготовленные при различных соотношениях компонентов.

Для ТСХ-анализа используются следующие хроматографические системы: а) гексан: ацетон (4:1) – $R_f = 0,61$ (амбуш); $R_f = 0,45$ (цимбуш); $R_f = 0,34$ (децис); $R_f = 0,70$ (каратэ). б) гексан: диэтиловый эфир (8:2) – $R_f = 0,62$ (амбуш); $R_f = 0,59$ (цимбуш); $R_f = 0,51$ (децис); $R_f = 0,53$ (каратэ), может использоваться толуол-ацетон (95:5).

Для четкого разделения изомеров перметрина и циперметрина используются хроматографические системы: а) гексан: бензол (3:2) – $R_f = 0,41$ (цис-перметрин), $R_f = 0,31$ (транс-перметрина); $R_f = 0,26$ (цис-циперметрина), $R_f = 0,21$ (транс-циперметрина). б) гексан: ацетон (9:1) – $R_f = 0,75$ (цис-перметрин), $R_f = 0,24$ (транс-перметрина); $R_f = 0,5$ (цис-циперметрина), $R_f = 0,59$ (транс-циперметрина).

4.3.2. Детектирование СП.

4.3.2.1. Универсальным, но не селективным способом детектирования на хроматографических пластинках с флуоресцирующим индикатором являются исследования в УФ-свете. Предел обнаружения 2-3мкг.

4.3.2.2. Растворы фосфорно-молибденовой кислоты(5, 10, 20%), водные и спиртовые. Предел детектирования 3-10мкг.

4.3.2.3. Свежеприготовленный аммиачно-ацетоновый раствор нитрата серебра.(0.5г нитрата серебра, 5мл воды, 7мл 25% раствора гидроксида аммония, ацетон до 100мл)

4.3.2.4. Свежеприготовленный раствор бромфенолового проявителя. (0,05 г бромфенолового синего растворяют в 10 мл ацетона. К 1 мл раствора прибавляют 9 мл 0,5 % раствора нитрата серебра в смеси вода-ацетон (1:3)). Для обесцвечивания фона используют 2% раствор лимонной кислоты.

4.3.2.5. Последовательная обработка пластинки 20% раствором гидроксида натрия, 1% раствором ацетата меди и 1% раствором фосфорно-молибденовой кислоты; через 5 минут раствором о-толидина в 10% уксусной кислоте. Используется для обнаружения СП, содержащих цианогруппу. Предел обнаружения около 1мкг.

4.3.2.6. Реакция с 2,4-дифенилгидразином, после щелочного гидролиза. Используется для обнаружения СП, содержащих цианогруппу.

4.3.2.6. Реактив Драгендорфа в модификации Мунье. Используется для определения каратэ.

4.3.2.7. Родамин В в 10% растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты.

4.4. ТСХ анализ производных 2,4 дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д).

Для ТСХ-анализа используются следующие хроматографические системы: а) метанол: 25% раствор гидроксида аммония (25:1), $R_f=0,38$. б) толуол-ацетон (95:5), $R_f=0,05$. в) гексан: эфир: уксусная кислота (50:50:2); г) бензол: ледяная уксусная кислота (5:1). г) чистый бензол.

4.4.1. Детектирование:

4.4.1.1. Свежеприготовленным аммиачно-ацетоновым раствором нитрата серебра, с последующей экспозицией в УФ-свете – производные 2,4-Д проявляются в виде черных пятен на белом фоне.

4.4.1.2. 0,5% спиртовым раствором дифениламина, с последующей экспозицией в УФ-свете – производные 2,4-Д проявляются в виде фиолетовых пятен на оранжевом фоне.

4.5 ТСХ анализ органических соединений металлов.

Этилмеркурхлорид.

ТСХ-анализ основан на определении извлеченного из биоматериала этилмеркурхлорида с дитизоном. Хроматографирование проводится в системе гептан-хлороформ(2:5). $R_f=0,56-0,60$.

4.5.1. Детектирование:

4.5.1.1. По собственной окраске пятна - желтого цвета.

4.5.1.2. Обесцвечивание желтого пятна параами брома, с последующим нанесением капли суспензии иодида меди – кроваво-красное окрашивание.

4.6 ТСХ анализ производных карбаминовой кислоты.

К группе карбаматов относятся следующие препараты: бутилат, диаллат, триаллат, пропоксур, бакс, карбарил, аминокарб, карбофуран и др.

В обязательный список исследования входит севин.

Для тсх-анализа в качестве хроматографической системы используется хлороформ. $R_f=0,49-0,52$ (севин), $R_f=0,12$ (1-нафтол).

4.6.1. Детектирование:

4.6.1.1. Экспозиция в УФ-свете – флуоресцирующие пятна (севина и его метаболита (1-нафтола).

4.6.1.2. Получение азосоединения с диазотированной сульфаниловой кислотой.

4.7. Подготовка биологического материала для инструментальных методов исследования.

По 10 г мелкоизмельченных навесок помещают в конические колбы и в каждую из них добавляют по 15 мл хлороформа. Содержимое встряхивают в течение 10 мин., после чего его фильтруют через бумажный фильтр. Экстракцию пиретроидов повторяют дважды. Остаток на фильтре (или на вате) промывают 5 - 10 мл хлороформа. Экстракты объединяют и высушивают безводным сульфатом натрия. Объединенные экстракты упаривают при температуре 40 °С на ротационном испарителе до минимального объема 0,5 мл (экстракты можно упаривать при комнатной температуре под током воздуха). Остаток затем растворяют в 30 мл охлажденного раствора ацетона с водой (2:1) и в течение 30 мин. выдерживают на холоде. После этого экстракт фильтруют, остаток промывают холодным раствором ацетона с водой. Из фильтрата выпаривают ацетон на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С. Из водного раствора пиретроиды трижды экстрагируют в делительной воронке н-гексаном порциями по 10 мл. Если экстракт получился окрашенным, к нему добавляют 0,5 г активированного угля и в течение 5 мин. выдерживают при 40 °С, после чего фильтруют и конечный объем фильтрата доводят до 2 мл. Из этих 2 мл и берут аликвотную порцию для количественного определения пестицида (5 мкл).

Надежность идентификации соединений ХОП, обеспечивается хроматографическими методами (ГЖХ, ГЖХ МС, ВЭЖХ, ВЭЖХ МС).

5. Заключение.

Технология химико-токсикологического исследования должна базироваться на использовании комплекса методов, включающего последовательно выполняемые этапы химико-токсикологического анализа от проведения выделения искомым веществ из биологических объектов и предварительного скрининга до идентификации и количественного определения веществ с применением специфичных методов.

Выбор того или иного метода при проведении химико-токсикологического анализа зависит от свойств искомого вещества, состояния и количества представленных объектов, задач исследования, экономических возможностей и оснащённости лаборатории.

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

6.Список использованных источников.

1. Химический энциклопедический словарь (1983) -- [с.6 , с.6]
3. Пестициды химия, технология и применение (1987) -- [с.173]
4. Большой энциклопедический словарь Химия изд.2 (1998) -- [с.686]
5. Пестициды и регуляторы роста растений (1995) -- [с.471]
6. Пестициды (1987) -- [с.173]