

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО
АНАЛІЗУ ІЗОНІАЗИДУ ЯК ОБ'ЄКТА СУДОВО-ВЕТЕРИНАРНОЇ
ЕКСПЕРТИЗИ

Виконала: здобувачка вищої освіти

Групи 226Ф 20Фм(4,6з)дво-01а

спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Наталія ХАМУЛА

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії НФаУ,

д.фарм.н., професор Ліна ПЕРЕХОДА

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри
клінічної фармакології ІПКСФ НФаУ,

д.фарм.н., професор Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ

АНОТАЦІЯ

Враховуючи велику кількість звернень громадян до судових органів стосовно жорстокого поводження з тваринами (отруєння ізоніазидом), існує необхідність вдосконалення, оцінювання придатності та розробки надійних методик виявлення ізоніазиду не тільки у біорідинах чи трупному матеріалі, а й у речових доказах (приманках, що можуть використовуватися догхантерами при отруєнні тварин). В роботі запропонований комплекс методів виявлення ізоніазиду у складі приманок для визначення його в об'єктах судово-хімічного дослідження з використанням ТШХ та якісних хімічних реакцій. Робота загальним об'ємом 40 сторінок, вона включає 3 розділи, висновки, 2 схеми, 32 джерела літератури.

Ключові слова: ізоніазид, якісні хімічні реакції, отруєння, тонкошарова хроматографія, судова експертиза.

ANNOTATION

Given the large number of appeals from citizens to the judicial authorities regarding animal cruelty (isoniazid poisoning), there is a need to improve, evaluate the suitability and develop reliable methods for the identification of isoniazid not only in biofluids or cadaveric material, but also in baits (material evidence) that can be used by doghunters in animal poisoning. The paper proposes a set of methods for the detection of isoniazid in baits to determine it in forensic chemical research objects using thin-layer chromatography and qualitative chemical reactions. The work consists of an introduction, 3 chapters, general conclusions, a list of references. It is set out on 40 pages, includes 2 pictures, 32 references.

Key words: isoniazid, qualitative chemical reactions, poisoning, thin-layer chromatography, forensic analysis.

З М І С Т

ВСТУП	5
Розділ 1. ІЗОНІАЗИД ЯК ОБ'ЄКТ СУДОВО -ВЕТЕРИНАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ (Огляд літератури).	8
Висновки до розділу 1	17
Розділ 2. ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ МЕТОДИК ВИЯВЛЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ	18
2.1. Особливості ізолювання ізоніазиду при судово-хімічному та хіміко-токсикологічному дослідженнях	18
2.2 Ідентифікація ізоніазиду фізико-хімічними методами	20
2.3 Ідентифікація ізоніазиду хімічними реакціями	23
Висновки до розділу 2	25
Розділ 3. РОЗРОБКА МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ В РЕЧОВИХ ДОКАЗАХ (ПРИМАНКАХ)	26
Розробка методики виявлення ізоніазиду в приманках	28
3.1 методом ТШХ.	
Розробка методики виявлення ізоніазиду в приманках	32
3.2 якісними реакціями.	
Експериментальна частина	36
Висновки до розділу 3.	39
Загальні висновки	40
ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	41
Додаток	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

БАР	біологічно активна речовина
ВЕРХ	Високоєфективна рідинна хроматографія
ВООЗ	Всесвітня Організація Охорони здоров'я
ГАМК	γ-аміномасляна кислота
ГХ-МС	Газова хроматографія з мас-селективним детектуванням
ТШХ	Тонкошарова хроматографія
ЦНС	Центральна нервова система
ШКТ	Шлунково кишковий тракт
ASPCA	American Society for the Prevention of Cruelty to Animals – Американське товариство запобігання жорстокості до тварин

ВСТУП

Актуальність теми. В останні роки у всьому світі, зокрема на території України, спостерігається збільшення кількості випадків отруєння домашніх та безпритульних тварин [1,2]. Наприклад, Американське товариство запобігання жорстокості до тварин (ASPCA) за останні роки отримало близько 200 повідомлень про отруєння тварин ізоніазидом з летальним наслідком [3]. Це пов'язано з умисними діями угруповань «догхантерів» – осіб, які з власної ініціативи займаються винищенням безпритульних тварин. З метою реалізації злочинних намірів «догхантерами» на вулицях залишаються різноманітні приманки (харчові продукти), склад яких постійно змінюється. До складу приманок можуть входити лікарські засоби протитуберкульозної, дії, алкалоїди, пестициди, антидепресанти, бензодіазепіни, фосфід цинку, сполуки миш'яку, тощо.

Найчастіше «догхантери» використовують протитуберкульозний фармацевтичний препарат ізоніазид, який є особливо токсичним для собак, враховуючи, що в їх організмі генетично не вистачає ферменту N-ацетилтрансферази, під дією якого відбуваються метаболічні перетворення ізоніазиду.

Враховуючи цей факт, одним із актуальних завдань судово-ветеринарної експертизи є вдосконалення, оцінювання придатності та розробка надійних методик ідентифікації ізоніазиду не тільки у біорідинах чи трупному матеріалі, а й у приманках (речових доказах), що можуть використовуватися догхантерами при отруєнні тварин.

Існує необхідність в створенні на їх основі алгоритму проведення судово-хімічного дослідження речових доказів на присутність ізоніазиду. Під час вирішення питань хіміко-токсикологічного дослідження судово-ветеринарної експертизи визначення та ідентифікація ізоніазиду в біорідинах та трупному матеріалі здійснюються комплексним використанням методу газорідинної хроматографії та хімічних реакцій з амонію ванадатом та з

саліциловим альдегідом. Даний метод є досить швидким, чутливим, практичним та достовірним але високовартісним і не адаптованим для проведення експертизи харчових продуктів, що містять ізоніазид, як речових доказів.

У зв'язку зі збільшенням звернень від громадян та правоохоронних органів з метою встановлення причин смерті домашніх та безпритульних тварин, відсутністю у Реєстрі методик виявлення ізоніазиду в приманках (речових доказах) при проведенні судово-ветеринарної експертизи, актуальною є розробка комплексу методик, які б не потребували дорогого вартісного обладнання і були придатними для використання у вітчизняній практиці судово-токсикологічних досліджень.

Мета дослідження. Розробка комплексу методик виявлення ізоніазиду як об'єкту судово-ветеринарного дослідження у складі речових доказів (приманок).

Завдання дослідження:

- Проаналізувати дані літературних джерел щодо актуальності питання;
- Проаналізувати існуючі методики виявлення об'єкта дослідження – ізоніазиду в біологічних рідинах та трупному матеріалі;
- Розробити методику ізолювання ізоніазиду з харчових продуктів;
- Розробити комплексну методику визначення ізоніазиду методом ТШХ та кольорових реакцій, яка б не потребувала дорогого вартісного обладнання і була придатними для використання в об'єктах судово-ветеринарного аналізу.

Об'єкт дослідження. Об'єкти – приманки для тварин, харчові продукти з внесеним до складу ізоніазидом (речові докази).

Предмет дослідження. Визначення ізоніазиду методом тонкошарової хроматографії та кольорових хімічних реакцій.

Методи дослідження. Комплекс хімічних та фізико-хімічних методів дослідження.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена проста для застосування методика виявлення ізоніазиду як об'єкта судово-ветеринарної експертизи, яка не потребує використання високовартісного обладнання та суттєво розширює можливості встановлення причин смерті тварин, що дає змогу притягувати до відповідальності осіб, винних у порушенні законодавства про захист тварин від жорстокого поводження. Методика може бути запропонована для впровадження судово-експертним установам України.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати роботи висвітлені в тезах: Розробка методики виявлення ізоніазиду як об'єкту судово-ветеринарної експертизи /Ігор Сич, Оксана Бернадська, Ліна Перехода, Віталій Яременко, Наталія Хамула. Modern chemistry of medicines: матеріали Міжнародної Internet- M78 конференції (25 вересня 2024 р., м. Харків) – Електрон. дані. – Х. : НФаУ, 2024. – 142 с.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота включає вступну частину, огляд даних наукової літератури, два експериментальних розділи, загальні висновки, перелік використаних літературних джерел. Робота викладена на 40 сторінках, включає 2 схеми, 32 джерела літератури.

РОЗДІЛ І

ІЗОНІАЗИД ЯК ОБЄКТ СУДОВО - ВЕТЕРИНАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

(Огляд літератури)

За оцінками експертів наразі Україна входить до світових лідерів за кількістю безпритульних собак, яка у великих містах може досягати 30 тисяч осіб. Основною причиною зростання чисельності популяцій тварин є безвідповідальне ставлення людей, що сприяє неконтрольованому розмноженню тварин і потраплянню на вулиці їх потомства. Крім того, на підвищення кількості популяції безпритульних тварин впливає відсутність стерилізації, які не використовуються для розведення і не мають породної цінності та доступність джерел корму (відкриті сміттєві баки і сміттєзвалища, які містять відходи харчових продуктів) [4]. У світовій практиці є три основні способи вирішення проблеми безпритульних тварин: вилов-стерилізація з поверненням в місця перебування, ізоляція в притулках, та ліквідація. Ізоляція в притулках з наступною передачею тварин новим власникам вважається найгуманнішим способом. Тварини отримують харчування, дах, доступ до медичної допомоги, і головне – шанс знайти господаря, а люди не відчують небезпеки стати жертвою нападу голодної або хворої тварини [5]. Вирішення проблеми регуляції чисельності безпритульних собак в Україні загалом здійснюється комунальними підприємствами за рахунок створення притулків і їх обслуговування, однак вони забезпечують лише 20-30 % від реальної потреби, через що часто мешканцям великих міст доводиться стикатись з особливо агресивними тваринами, які населяють і захищають свою територію [1].

Не зважаючи на прийняття Закону України № 2120-VIII від 22.06.2017 «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо запровадження гуманного ставлення до тварин» досить часто, особливо в останні роки, проблему зменшення чисельності безпритульних собак вирішу-

ють так звані «догхантери» (з англ. «мисливці за собаками») [6]. Догхантерами називають групи людей, які займаються «рятуванням» суспільства від собак з власної ініціативи. Одним із найулюбленіших методів винищення тварин у «мисливців на собак» є отруєння. Догхантери готують приманки, тобто вносять подрібнені отруйні речовини до харчових продуктів (зокрема м'ясної продукції, м'ясного фаршу, ковбаси та інших привабливих для собак продуктів) і підкидають в місцях масового скупчення бродячих безпритульних собак. Зустрічаються повідомлення і про непоодинокі випадки навмисного отруєння домашніх тварин у випадках коли приманки розкидалися догхантерами в місцях їх виходу. Винятком розкладання приманок не є навіть дитячі майданчики та парки, у зв'язку з чим досить часто реєструються випадки отруєння дітей, які випадково з'їдали отруєні продукти. Найнебезпечнішими догхантерами вважаються люди з психічними розладами.

Найбільш розповсюджені отруйні речовини, що використовуються догхантерами: щурячі отрути, антифриз, тосол, етиленгліколь (автомобільні охолоджуючі рідини) та ізоніазид. Всі ці речовини є високотоксичними та смертельними для собак.

Після поїдання приманки з щурячою отрутою розвиток клінічних ознак отруєння у тварин може наступити не одразу, а впродовж 3-5 днів. Симптоми отруєння неспецифічні: слабкість, блювання, діарея, носові кровотечі, підшкірні крововиливи, задишка, блідість слизових оболонок, може також спостерігатися кровава сеча.

Для отруєнь антифризом (діюча речовина етиленгліколь) та тосолом характерна сезонна особливість, догхантери розливають ці речовини переважно взимку, і тварини злизують їх зі снігу або льоду, оскільки вони мають привабливий солодкий смак. Тосол та етиленгліколь можуть викликати симптоми отруєння як через 30 хвилин, так і через 12 годин в залежності від індивідуальної переносимості. Симптоми також неспецифічні: блювота, млявість, порушення координації, судом, кома. Якщо тварина

пережила першу стадію отруєння, то через 24 години настає друга і третя стадія отруєння, що характеризується задишкою, блюванням, великим споживанням рідини, частим сечовипусканням, відсутністю утворення сечі, гострим болем у ділянці нирок.

За даними статистики, найбільш розповсюдженою отрутою, що включена «Американським товариством попередження жорстокості до тварин» в список десяти найбільш небезпечних для собак препаратів є ізоніазид [7]. Даний препарат широко використовується в медичній практиці для лікування туберкульозу та доступний для продажу в мережі аптек без рецепта [8].

В зв'язку з тим, що ізоніазид використовується догхантерами з метою отруєння тварин в 2021 році в Україні навіть була зареєстрована петиція №22/113288-еп «Заборона продажу ізоніазиду без рецепту та посилення контролю за його відпуском в аптеках». В петиції було запропоновано прийняття відповідного Закону, яким би встановлювалась кримінальна відповідальність за продаж аптеками ізоніазиду без рецепту. Згідно реєстраційних посвідчень на препарат ізоніазид в різних формах випуску цей лікарський засіб має відпускатись з аптек виключно за рецептом. Відповідно до законодавства реалізація (відпуск) рецептурних лікарських засобів громадянам здійснюється виключно за рецептами лікарів та в порядку, встановленому МОЗ. Така вимога міститься у частині 3 статті 21 Закону «Про лікарські засоби» та пункту 162 Ліцензійних умов провадження господарської діяльності з виробництва лікарських засобів, оптової та роздрібної торгівлі лікарськими засобами, імпорту лікарських засобів.

Адміністративна відповідальність за продаж рецептурних лікарських засобів без рецепта чинним законодавством передбачена в невеликому розмірі, тому в петиції була пропозиція запровадити кримінальну відповідальність за відпуск аптеками ізоніазиду без рецепта та збільшити адміністративні штрафи до розмірів, які б дійсно дисциплінували власників

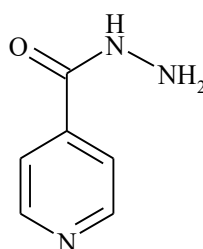
та співробітників аптек [9]. Петиція не набрала потрібну кількість голосів, тому не була розглянута президентом.

Наразі ізоніазид входить до класифікації Міжнародного союзу боротьби з туберкульозом і належить до найбільш ефективних препаратів лікування туберкульозу першого ряду [10].

За хімічною будовою ізоніазид являє собою гідразид ізонікотинової кислоти або піридин-4-карбогідразид ($C_6H_7N_3O$). Фармакологічна група. J04AC01 – Протитуберкульозні препарати. **Виробники:** ТОВ «Юрія-Фарм», ХФЗ Дарниця, публічне акціонерне товариство «Науково-виробничий центр «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод».



Ізоніазид (Isoniazidum)



Гідразид ізонікотинової кислоти

Ізоніазид - білий кристалічний порошок без запаху, гіркою смаку, легко розчинний у воді, помірно розчинний в етанолі. Завдяки наявності залишка гідразину виявляє відновні властивості, утворює хелатні комплекси з катіонами металів.

Ізоніазид вперше синтезовано на початку XX століття. Перший лікарський препарат з цією діючою речовиною був створений у 1926-му році і вийшов на фармацевтичний ринок під назвою «тубазид». Широке застосування препаратів на основі гідразиду ізонікотинової кислоти (ізоніазид, фтивазид, опінізид. Опініазид розчинний, салюзид, салюзид розчинний) для лікування інфекцій, що викликаються певними штамами *Mycobacterium* або *Actinomyces* spp., почалося з 1952 року [11]. Ізоніазид є найефективнішим лікарським засобом, який має виражені бактерицидні властивості, головним чином по відношенню до швидко проліферуючих популяцій мікобактерій туберкульозу і широко використовується для лікування і профілактики активних форм туберкульозу різних форм і локалізації.

Препарат доступний в ін'єкційній, рідкій та таблетованій формах; він також випускається в комбінації з іншими препаратами (найчастіше з рифампіцином). Механізм дії ізоніазиду полягає в тому, що він блокує синтез міколевої кислоти, яка необхідна для функціонування стінки мікобактеріальної клітини.

Ізоніазид швидко всмоктується у ШКТ, легко проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр і виявляється в різних тканинах і рідинах організму. У кількості 50-70% виводиться нирками в незміненому вигляді, решта метаболізується в печінці людини і тварин за декількома напрямками: шляхом гідролізу, цитохром-Р450-залежного окиснення, реакціями ацетилювання і кон'югації з піровиноградною та α -кетоглутаровою кислотами з утворенням гідразонів.

Одним із шляхів метаболізму є перетворення ізоніазиду в ацетилпохідне за участі фермента N-ацетилтрансферази [12]. Цей же фермент відповідає за подальше перетворення ацетилізоніазиду до ацетилгідразину (гідразиду оцтової кислоти) (Схема 1.1).

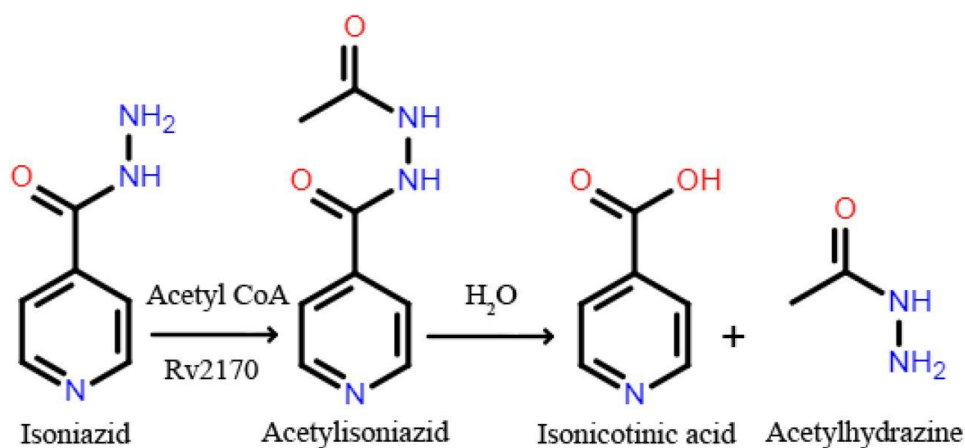


Схема 1.1. Біотрансформація ізоніазиду в ацетилпохідне за участі фермента N-ацетилтрансферази

В залежності від кількості в організмі фермента N-ацетилтрансферази всіх людей і тварин поділяють на «швидких» та «повільних» ацетиляторів. Встановлено, що собакам генетично не вистачає кількості фермента N-ацетилтрансферази, тобто вони є повільними ацетиляторами, і тому знешкодження продуктів розпаду ізоніазиду проходить у них повільно, що сприяє дуже швидкому проникненню їх у кров [13]. Тому важкість і тривалість отруєння у собак, набагато сильніші, ніж у швидких ацетиляторів, таких як люди [14].

Активним метаболітом ізоніазиду є ізонікотиноїламід. Крім того, ізоніазид гідроксильється з утворенням гідразиду 2-гідроксиізонікотинової кислоти [15].

В результаті гідролізу ізоніазиду, утворюються ізонікотинова кислота і нестійкий активний метаболіт – гідразин, що надалі перетворюється на аміак, наявністю якого і обумовлена нейротоксична побічна дія ізоніазиду [16]. (Схема 1.2).

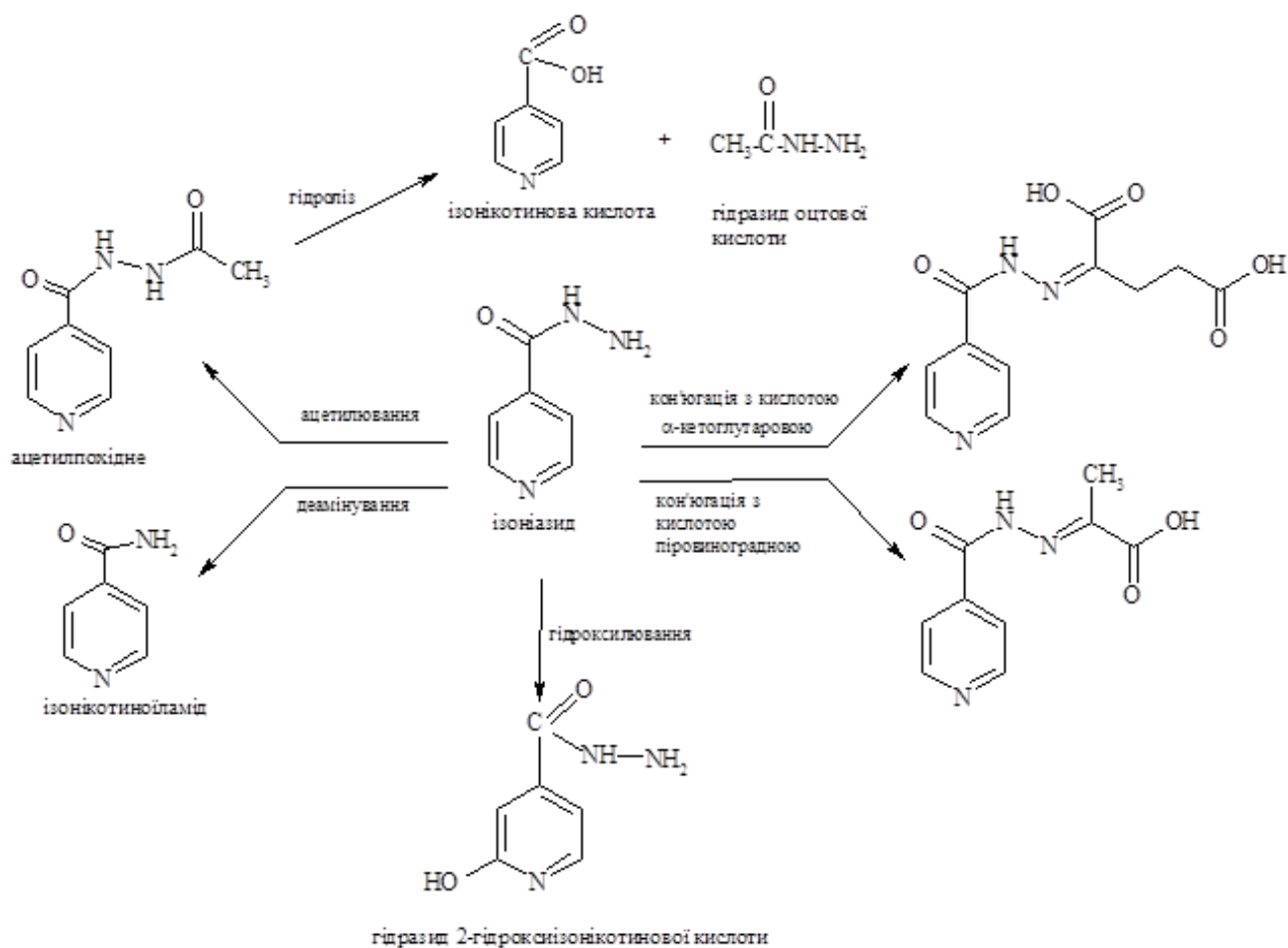


Схема 1.2 . Шляхи метаболічних перетворень ізоніаїду.

Ізоніаїд утворює ковалентні зв'язки з білками печінки, що призводить до швидкого імуноопосередкованого її ураження [17] і тому гепатотоксичність є одним із побічних ефектів терапії ізоніаїдом. Аналогічним чином, у собак при отруєнні ізоніаїдом спостерігається розвиток гострої печінкової недостатності. Вторинна поліорганна печінкова та ниркова недостатність, в результаті швидкої абсорбції ізоніаїду, може ще сильніше погіршити прогноз отруєння ізоніаїдом [18]. У тварин при отруєнні спостерігається сонливість, слабкість, нескоординовані рухи, тремтіння в кінцівках, гіперсолівація, кровава блювота, судоми, в подальшому виникає кома [19]. При відсутності лікування смерть тварини настає впродовж 3-х годин практично в 100 % випадків. Доза, яка може виявитися для собаки летальною, складає 50 мг ізоніаїда на 1 кг ваги, в той час як 1 таблетка містить 300 мг діючої речовини. Враховуючи цей факт,

одна таблетка вагою 300 мг, може привести до смертельного отруєння собаки масою 5 кг [20].

Дослідженнями крові хворих тварин встановлено, що отруєння ізоніазидом у собак супроводжувалося загальними ознаками: гіпоглікемією, підвищенням рівня печінкових ферментів, анемією, тромбоцитопенією [21].

Відомо, що під впливом ізоніазиду в організмі собак відбувається порушення біотрансформації піридоксину та зниження його рівня в плазмі крові і в тканинах. Внаслідок цього сповільнюється утворення ферментів НАД, коферментами яких є фосфорильована форма піридоксину, що, в свою чергу, спричиняє порушення аеробного окиснення глюкози, жирних кислот, розвивається гіпоксія тканин. Тканинна гіпоксія призводить до порушення загального обміну речовин, накопичення продуктів неповного окиснення, що зумовлює важкі незворотні патологічні зміни в органах [22]. Ізоніазид безпосередньо з'єднується з піридоксином, утворюючи неактивні комплекси, які називають ізоніазидпіридоксингідразами. Ці комплекси конкурентно пригнічують активність піридоксинкінази, що призводить до дефіциту концентрації піридоксину в тканинах і сироватці крові [23]. Крім того, вони додатково пригнічують синтез γ -аміномасляної кислоти (ГАМК), гальмівного нейромедіатора в центральній нервовій системі. Зниження концентрації ГАМК, і є основною причиною судом, які розвиваються через 30-60 хвилин після попадання в організм собаки ізоніазиду [24].

Взагалі, структурна подібність ізоніазиду і вітаміну B_6 дозволяє припустити, що токсична дія ізоніазиду обумовлена пригніченням ферментних систем, у яких B_6 є кофактором. Тому піридоксин є ефективним специфічним антидотом ізоніазиду. Його рекомендують при отруєнні ізоніазидом застосовувати для лікування тварин в комбінації з діазепамом, дія якого ґрунтується на посиленні ГАМК-трансмисії в ЦНС, що дозволяє уникнути подальших судом та смерті.

З метою запобігання випадкам отруєнь тварин ізоніазидом догхантерами необхідно вирішити проблему безпритульних тварин,

прийняти та впровадити зміни до законодавства, що будуть передбачати серйозну кримінальну відповідальність за даний злочин.

З цією метою доцільно перейняти досвід економічно розвинених країн Німеччини та США, які використовують комплексний підхід у боротьбі з збільшенням кількості безпритульних тварин. В цих країнах державою прийняті нормативні акти, що обмежують репродукцію тварин; створені системи обліку, реєстрації домашніх тварин, встановлені правила утримання тварин у житловому приміщенні, правила поведінки на прогулянці, існує програма стерилізації тварин, організовані притулки.

Висновки до розділу 1

- Проаналізовані хімічна структура, механізм дії, властивості та токсикологічне значення ізоніазиду як об'єкта судово-ветеринарної експертизи.
- Розробка, вдосконалення, оцінювання придатності надійних методик ідентифікації ізоніазиду не тільки у біорідинах організму чи трупному матеріалі тварин, а й у продуктах (найчастіше м'ясній продукції), що може використовуватися при отруєнні, не втрачає своєї актуальності впродовж багатьох років.

РОЗДІЛ 2

ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ МЕТОДИК ВИЯВЛЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ОТРУСНИХ ТВАРИН ТА ТРУПНОМУ МАТЕРІАЛІ

2.1. Особливості ізолювання ізоніазиду при судово-хімічному та хіміко-токсикологічному дослідженнях.

При направленому хіміко-токсикологічному дослідженні метод ізолювання підбирається з урахуванням фізико-хімічних властивостей сполуки, на яку проводиться аналіз. Ізоніазид належить до групи «лікарських отрут», тому для його ізолювання використовуються загальні для всієї групи ліків універсальні методи ізолювання водою або підкисленим етанолом. В процесі ізолювання «нелетких» сполук з біологічного матеріалу взаємодіють три компоненти: отрута, біологічний матеріал та екстрагент [25].

При судово-хімічному дослідженні тканинного матеріалу (внутрішні органи трупа: печінка, нирки, мозок) ізолювання взоніазиду складається з двох стадій: вилучення отрути з твердої фази (об'єкт дослідження) у етанольну, та вилучення отрути з спиртової фази в органічний розчинник. (аналіз «лікарських» отрут в токсичних і летальних дозах - 10^{-4} - 10^{-6} г в пробі);

При хіміко-токсикологічному дослідженні біорідин (кров, сеча, промивні води шлунку) ізолювання ізоніазиду відбувається водою, а потім вилучення отрути проводиться екстракцією в органічний розчинник (аналіз «лікарських» отрут в терапевтичних і токсичних дозах - 10^{-6} - 10^{-12} г в пробі).

Екстракцію проводять за допомогою ділильної воронки, в яку вміщують досліджуваний розчин, і органічний розчинник, що не повинен змішуватися з водою. Воронку енергійно струшують впродовж 2-5 хвилин. При цьому обидві рідкі фази диспергуються одна в одну, утворюючи краплі різного розміру.

Ефективність ізолювання речовин на I та II стадіях визначається низкою факторів. На першій стадії на ефективність ізолювання речовини

впливатимуть такі чинники, як розчинність отрути у екстрагенті, що використовується, та природа самого екстрагента.

Друга стадія ізолювання «нелетких» отрут полягає у виділенні їх з водного розчину шляхом екстрагування органічним розчинником, при різних значеннях рН середовища. Таким чином досягається концентрування речовини та її часткове очищення від компонентів біоматеріалу (не розчинних у даному розчиннику).

На другій стадії ізолювання важливими чинниками є: 1) розчинність отрути, яка визначається ступенем іонізації та регулюється величиною рН середовища; 2) природа екстрагента, його об'єм, час та кратність екстракції.

Під час ізолювання отруйних речовин із біоматеріалу разом із ними екстрагуються так звані співекстрактивні речовини – домішки білків, продуктів їх гідролізу – пептидів і амінокислот, ліпідів та інших сполук, які є природними компонентами біоматеріалу.

Співекстрактивні речовини надалі заважають проведенню аналізу:

1. Маскують забарвлення розчину під час проведення кольорових реакцій (обвуглювання співекстрактивних речовин під впливом концентрованої сірчаної кислоти).

2. Знижують чутливість мікрокристалоскопічних реакцій і призводять до утворення кристалів неправильної форми, або їх поліморфізму (різноманітність форм).

3. Спотворюють характеристичні смуги поглинання речовин при спектральному дослідженні на УФ- та ІЧ ділянках спектру.

4. Дають похибки в результатах при кількісному визначенні речовин.

5. Деякі продукти гнильного розкладання біоматеріалу дають такі ж реакції, як і отруйні речовини (наприклад, трупні алкалоїди – путресцин, кадаверин – дають реакції із загальноалкалоїдними реактивами).

Для отримання надійних результатів необхідно очищення досліджуваних речовин від співекстрактивних речовин біоматеріалу. Очищення може бути проведено під час підготовки об'єкта, в процесі

ізолювання або після нього [26].

На першому етапі ізолювання ізоніазиду можливе лише грубе очищення, яке проводиться шляхом: 1 – видалення дрібних частинок біоматеріалу фільтруванням або центрифугуванням; 2 – осадження білків абсолютним спиртом, ацетоном, трихлороцтовою кислотою, вольфрамовою, фосфорно-вольфрамовою, фосфорно-молібденовою кислотою, 3 – насичення розчину Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (електролітами).

На другому етапі ізолювання ізоніазиду можливе більш тонке очищення, яке може здійснюватися шляхом: 1 – реекстракції, тобто переведення речовин з однієї рідкої фази в іншу при зміні рН розчину (наприклад, очищення за рахунок різної розчинності у воді та органічних розчинниках); 2 – хроматографії – іонообмінної, гель-хроматографії, адсорбційної хроматографії на колонках, тонкошарової хроматографії. Останній вид хроматографії використовують часто, враховуючи, що поряд з очищенням вона дає можливість розділити самі речовини або їх метаболіти при комбінованих отруєннях і провести їх попередню ідентифікацію за величинами R_f (хроматографічний скринінг «нелетких» отрут).

Існують різні методи виявлення отруйних речовин в екстрактах: хімічні, спектральні (на УФ-, ІЧ-ділянках), хроматографічні (ТШХ, ВЕРХ, ГХ-МС, ГРХ), флюоресцентний, електрофоретичні (на папері, в гелі), імунологічні (імуноферментний, радіоімунний, імунофлюоресцентний), мас-спектрофотометрія та ін.

2.2. Ідентифікація ізоніазиду фізико-хімічними методами.

Для ідентифікації ізоніазиду на попередньому етапі дослідження найбільш часто використовують простий, доступний, ефективний метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту-«скринінг» (анг-відбір, просіювання). Основою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) є вибіркового розподіл компонентів аналізованого екстракту між двома фазами, які не змішуються між собою. Роль рухомої фази виконує суміш

розчинників, а нерухомою фазою є сорбент на пластині. Для подальшої ідентифікації ізоніазиду використовуються хімічні реагенти.

Як рухомі фази на першій стадії ТШХ-«скринінгу» застосовують загальні системи розчинників, які запропоновані міжнародною асоціацією хіміків-токсикологів для ідентифікації лікарських сполук:

- хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5);
- етилацетат – метанол – 25% аміак (85:10:5) ;
- толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5) ;
- етилацетат;
- метанол – 25% аміак (100: 1,5);
- хлороформ – етанол (90:10);
- хлороформ – циклогексан – кислота ацетатна крижана (40:20:20).

Попереднє хроматографічне дослідження ефективне за умови, якщо сеча, кров, секційний матеріал (тканини органів трупа) не піддалися процесу гнилісного розкладу. На другій стадії застосовуються системи розчинників, які дозволяють ефективно розділити сполуки, які входять в одну хроматографічну зону. Підтверджуючий етап включає комплекс хімічних та фізико-хімічних методів.

- хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5);
- толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5).

Поряд з ТШХ-методом для аналізу групи отруйних речовин, які досліджуються, в аналітичних лабораторіях фармацевтичних, санітарно-гігієнічних, криміналістичних та екологічних служб використовуються високоефективні, чутливі та достовірні методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії з мас-селективним детектуванням (ГХ-МС) та атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою. Для ідентифікації та кількісного визначення ізоніазиду у вмістимому шлунку собак як метод діагностики отруєння тварин використовується метод рідинної хроматографії з використанням хроматографа з подвійним мас-спектрометричним детектором. Даний метод

є чутливим і повністю відповідає європейським вимогам. Встановлено, що смертельна концентрація ізоніазиду у вмістимому шлунку собак, яку можна визначити цим методом, становить від 90,5 мкг/кг до 5799,8 мкг/кг маси тіла тварини.

Для виявлення ізоніазиду розроблений метод ГХ-МС [28]. ГХ-МС – сучасний ефективний метод розділення та аналізу рідких та газових сумішей органічних сполук та неорганічних газів.

Ідентифікація сполуки в методі ГХ-МС здійснюється за мас-спектрами та параметрами утримування. В розробленому вченими методі аналізу ізоніазиду як об'єкта судово-ветеринарної медицини на газовому хроматографі Shimadzu GS з мас-спектрометричним детектором GSMS-QP2020 використовуються: капілярна колонка довжиною 30 м, діаметром 0,25 мм – HP-5 ms, фаза – 0,25 мкм, газ-носіє – гелій, постійний потік 1,5 мл/хв, Split 10:1, температура випарника 250° С, температура колонки: Т поч = 60° С, швидкість нагріву 28° С/хв, Т кінц = 280° С, температура інтерфейса Т= 250° С, проба – 1 мкл.

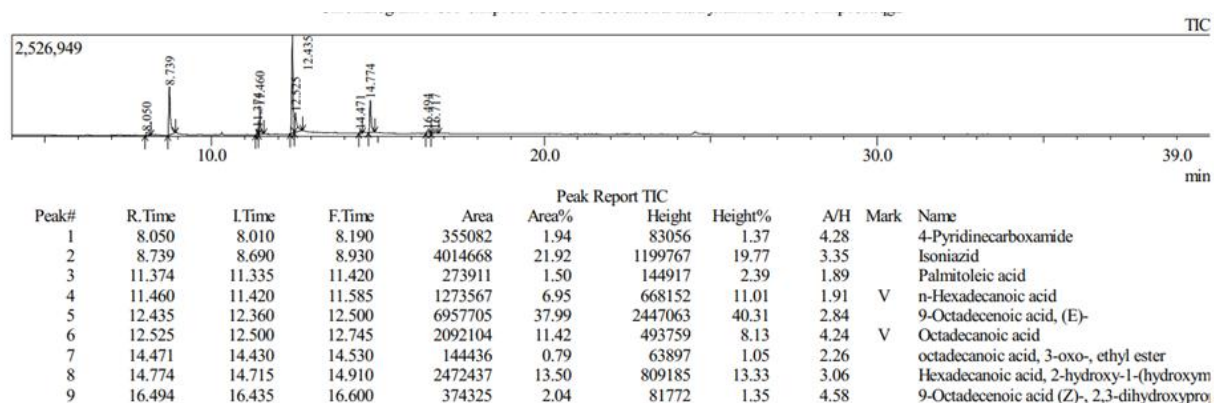


Рисунок 2.1 Хроматограма досліджуваного об'єкта, що містить ізоніазид, параметр утримування 8,7.

Ідентифікація сполуки здійснюється за мас-спектрами та індексами утримання. На хроматограмі досліджуваного об'єкта, в якому є ізоніазид,

спостерігається пік з параметром утримування 8,7, що може використовуватися як стандарт (рис 2.1).

2.3. Ідентифікація ізоніазиду хімічними реакціями.

Результати попереднього хроматографічного дослідження підтверджуються також хімічними методами аналізу.

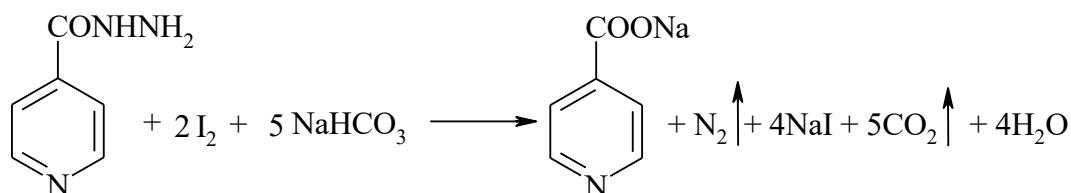
Для виявлення «лікарських» отрут використовуються хімічні реакції - забарвлення, осадження і мікрокристалоскопічні реакції.

Реакції забарвлення при виявленні лікарських отрут виконуються з осадами після видалення залишків хлороформу та охолодження. З цією метою використовують концентровані H_2SO_4 , HNO_3 , HCl , реактив Маркі (H_2SO_4 конц. + формальдегід), реактив Манделіна (H_2SO_4 конц. + амоній ванадат), реактив Ерדмана (H_2SO_4 конц. + HNO_3 конц), реактив Фреде (H_2SO_4 конц. + амоній молібдат).

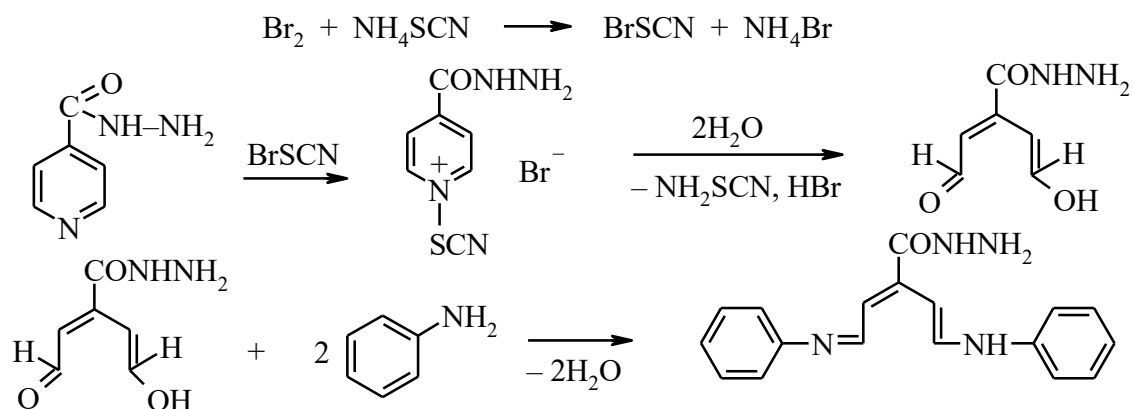
В основі реакцій забарвлення ізоніазиду з реактивом Маркі лежить процес конденсації з альдегідами в присутності речовин, що поглинають воду.

Взаємодія з альдегідами є характерною реакцією на ізоніазид та його метаболіти. З метою їх виявлення та ідентифікації використовуються саліциловий, коричний та анісовий альдегіди.

Однією з реакцій виявлення ізоніазиду є окиснення його йодом (знебарвлення йоду).



При взаємодії з ціанбромідом і аніліном ізоніазид утворює жовте забарвлення. Реакція не специфічна.



Використання комплексу існуючих хімічних і фізико-хімічних методів дає можливість визначити ізоніазид у біорідинах організму та трупному матеріалі тварин як в об'єктах судової експертизи.

В даних літератури не зустрічається інформації стосовно того, як ці методи адаптовані до визначення ізоніазиду в м'ясній продукції, що може використовуватися при отруєнні.

Висновки до розділу 2.

1. Розглянуто методики ізолювання ізоніазиду з біорідин та трупного матеріалу при судово-хімічному дослідженні.
2. Розглянуто комплекс фізико-хімічних методів та хімічних реакцій, які застосовуються при виявленні ізоніазиду в біоматеріалі та його ідентифікації.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОНІАЗИДУ В РЕЧОВИХ ДОКАЗАХ (ПРИМАНКАХ)

Діяльність судово-експертних установ України направлена на забезпечення правосуддя незалежною, кваліфікованою і об'єктивною експертизою, що орієнтована на максимальне використання досягнень науки і техніки. Для цього законодавство України регламентує проведення судовими експертами досліджень матеріальних об'єктів – речових доказів, які містять інформацію про обставини справи, що перебуває у провадженні органів досудового розслідування чи суду.

Висновок експертного дослідження харчових продуктів як речових доказів, що ймовірно могли використовуватись для отруєння домашніх або безпритульних тварин, складає доказову базу у судовому процесі, що надає можливість притягувати до відповідальності осіб, винних у порушенні законодавства про захист тварин від жорстокого поводження. Тому є необхідність вдосконалення, оцінювання придатності та розробки надійних методик ідентифікації ізоніазиду не тільки у біорідинах організму чи трупному матеріалі, а й у продуктах (найчастіше м'ясній продукції), що можуть використовуватися догхантерами [29].

Основними принципами при виборі методів дослідження, які нами використовувались в роботі, є їх відповідність поставленому завданню, відтворюваність, достатня інформативність і невисока вартість.

Залежно від поставленої задачі, хіміко-токсикологічне дослідження може бути не спрямованим (загальним) або спрямованим (окремим), тобто проведений судовим експертом аналіз може бути загальним або окремим.

Нашим завданням було адаптувати існуючі методики ізолювання та виявлення ізоніазиду в біорідинах та трупному матеріалі та розробити методику, яка б могла використовуватися при спрямованому хіміко–

токсикологічному дослідженні на виявлення ізоніазиду в речових доказах (приманках) і могла бути запропонована для використання в судово-хімічних дослідженнях.

Як об'єкти дослідження використовували зразок фаршу м'ясного із завідомо внесеною в його склад гомогенізованою речовиною таблеток ізоніазиду та таблетки ізоніазиду 200 мг (Виробник Борщагівський ХФЗ, Фармакологічна група: АТС-група J04AC01).

Розробка методики вивчення ізоніазиду в приманці включала такі етапи:

1. Пробопідготовка ;
2. екстрагування відібраної проби;
3. дослідження методами:
 - тонкошарової хроматографії;
 - якісних хімічних реакцій.

Пробопідготовка. Для виявлення ізоніазиду у складі приманок (харчовий продукт – м'ясний фарш із завідомо внесеною в його склад гомогенізованою речовиною таблеток ізоніазиду) була проведена пробопідготовка, яка включала гомогенізацію фаршу (ретельне подрібнення) та відбір середньої проби для аналізу (відібрана проба матеріалу масою 10 г). До проби додали етанол в кількості, необхідній для покриття об'єкта до «дзеркала» або в співвідношенні 1:1. Отриману суміш помістили в колбу з пришліфованою кришкою, закрили кришку, перемішали і залишили на 2 години. Операцію повторили тричі, потім профільтрували. Переваги методу ізолювання етанолом полягають у тому, що цей метод є універсальним, враховуючи, що етанол є добрим розчинником для багатьох речовин (як іонізованих, так і молекулярних форм). Крім того, ізолювання етанолом передбачає очищення вилучення від баластних речовин.

До недоліків методу ізолювання етанолом слід віднести його тривалість та багатостадійність. Велика кількість операцій, пов'язаних із осадженням білків та фільтруванням, може призвести до значних втрат речовин, на які проводиться аналіз.

Очищення ізоніазиду, що ізолюється з приманки(речового доказу), від супутніх компонентів

Під час ізолювання ізоніазиду із біоматеріалу або харчового продукту як речового доказу разом із ним екстрагуються так звані співекстрактивні речовини – домішки жирів та інших сполук, які є компонентами біоматеріалу або входять до складу продукту.

Співекстрактивні речовини надалі заважають проведенню аналізу:

1. Маскують забарвлення під час проведення кольорових реакцій
2. Знижують чутливість мікрокристалоскопічних реакцій і призводять до утворення кристалів неправильної форми, або їх поліморфізму (різноманітність форм).
3. Спотворюють спектри речовин при спектральному дослідженні на УФ- та ІЧ ділянках.

4. Дають хибні результати кількісного визначення речовин.

Для отримання надійних результатів необхідно очищення досліджуваних речовин від співекстрактивних речовин. Очищення може бути проведено під час підготовки об'єкта, в процесі ізолювання або після нього.

На першому етапі ізолювання можливе лише грубе очищення, яке ми проводили шляхом видалення механічних забруднень фільтруванням.

Метод екстракції нами розроблявся для цільової екстракції ізоніазиду, відділення та ізолювання речовин, які можуть заважати дослідженню, насамперед жирів. З метою осадження домішки жирів проводили екстракцію ацетоном з подальшим додаванням ацетонітрилу.

3.1 Розробка методики виявлення ізоніазиду в приманках методом ТШХ.

Метод ТШХ має високу селективність та чутливість, дає можливість одночасного розділення декількох зразків, дозволяє проводити повний аналіз невідомої суміші. В ньому використовується недороге обладнання і завдяки своїй економічності метод ТШХ має широку сферу застосування.

Методика проведення тонкошарової хроматографії складається з декількох етапів:

- нанесення аналізованої проби на шар сорбенту;
- подальший поділ компонентів суміші на окремі зони в потоці рухомої фази;
- ідентифікація зон абсорбції в шарі сорбенту;
- визначення величини R_f і кількісне визначення речовини.

Для проведення хроматографічного дослідження застосовувалося обладнання: герметична скляна хроматографічна камера об'ємом 1000 см³, хроматографічні пластинки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ (ТУ 26-11-17-89): сорбент – силікагель СТХ-1ВЕ, пластини розміром 10×10 см., мікрокапіляри для нанесення зразків.

З метою якісної ідентифікації ізоніазиду методом ТШХ використовували по 3-4 мкл отриманих попередньо екстрактів із фаршу м'ясного, та стандартного зразку етанольного розчину таблеток ізоніазиду.

З метою підготовки стандартної проби для дослідження відважували наважку 0.015 г субстанції ізоніазиду, поміщали її в мірну колбу на 50 мл, доводили до мітки етанолом. Проби стандартного етанольного розчину ізоніазиду (300 мкг / мл) об'ємом 5, 10, 15 мкг / мл за допомогою каліброваного скляного капіляра наносили на хроматографічні пластини Sorbfil.

Перед початком хроматографування нами було проведено насичення хроматографічної камери парами рухомої фази. В камеру помістили 50 мл рухомої фази, і пропустили крізь неї смужки фільтрувального паперу, закрили пришліфованою кришкою і залишили на 30 хв для насичення простору парами системи розчинників.

З метою забезпечення точності проведення аналізу нами проведена попередня підготовка хроматографічних пластин. В окрему хроматографічну камеру внесли 50 мл «х.ч.» етанолу, помістили в неї пластинку і накрили її покривним склом. Коли розчинник досяг верхнього краю пластини, її

вийняли і висушили в сушильній шафі (пластинка тепр вважається активованою).

На відстані 1 см від нижнього краю пластини відзначали лінію старту, а на відстані 1 см від верхнього краю і 10 см від лінії старту - лінію фінішу. Довжина шляху пробігу розчинників становила 10 см. Лінія старту знаходилась вище рівня шару розчинників в хроматографічній камері. Досліджувані зразки в необхідній кількості відбирали і наносили на лінію старту мікрокапілярним методом. Паралельно проводили дослідження зі стандартним розчином.

Підготовлені пластинки поділяли на кілька зон, на лінію старту хроматографічної пластинки наносили по черзі 15 мкл (1 мкг) ізоніазиду. Потім пластинку вносили в хроматографічну камеру і елюювали в системах розчинників № 1-2.

При нанесенні зразків капіляром, внутрішній діаметр їх плям не перевищував 0,5 мм. Відстань між нанесеними пробами і від місць нанесення до краю пластинки становила 2 см. Для кожного зразка використовували окремий мікрокапіляр. Перед використанням капіляри промивали етанолом.

Для надійної ідентифікації речовини слід використовувати не менше двох систем розчинників, бажано з різним значенням рН, тому ми проводили хроматографування в двох системах розчинників №1 та № 2:

- 1) метанол – 25 % розчин аміаку (100:1,5);
- 2) хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5).

Рухомі фази готували безпосередньо перед використанням. В колбу вносили необхідні розчинники при постійному перемішуванні до отримання прозорого розчину. Компоненти рухомої фази дозували мірним циліндром, остаточний об'єм склав 50 мл. Використовували розчинники класу чистоти хімічно чистий «х.ч.». Хроматографування проводилося за методикою висхідного елюювання, наведеної в монографії ДФУ [28]. Температура лабораторного приміщення складала 20°C. Хроматографічна камера знаходилася на поверхні стійкій до коливань. Хроматографування проводили

до моменту досягнення фронту розчинників, далі пластинку виймали з камери і висушували для видалення залишків рухомої фази (до повного зникнення запаху розчинника).

З метою проявлення зон адсорбції, пластинки обробляли з використанням як проявника хромогенного реагента, що утворює забарвлені продукти з ізоніазидом – реактива Драгендорфа (калію йодвісмутат). Обробку проводили за допомогою обприскувача.

Для контролю результатів проводилось паралельне дослідження холостої проби за вищевказаною методикою з використанням фаршу м'ясного без додавання ізоніазиду.

Після появи зон адсорбції їх відзначили і розраховували значення R_f . Ця величина є відношенням відстані від точки нанесення плями до середини плями після хроматографування до відстані, яку пройшов елюент від точки нанесення. На хроматографічних пластинах в першій системі «метанол – 25 % розчин аміаку (100:1,5)» утворилися забарвлені зони червоно-коричневого кольору ($R_f = 0,46$). Одержані величини R_f та забарвлення плям речовини у витяжках співставляємо (порівнюємо) з величинами R_f речовини-свідка (ізоніазиду), які ми одержали при хроматографуванні стандартного розчину. Результати визначення для досліджуваного зразка і стандартного розчину збігаються (вони дають одне і те ж забарвлення плям та збігаються за показником R_f стандарту ізоніазиду ($R_f = 0,46$)).

На хроматографічних пластинах в другій системі «хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5)» утворилися забарвлені зони червоно-коричневого забарвлення, що збігаються за показником R_f стандарту ізоніазиду ($R_f = 0,30$).

Результати свідчать, що хроматографування в системі розчинників №1 та №2 забезпечує хроматографічну рухливість ізоніазиду і повністю відповідає сучасним уявленням про прийнятне значення R_f , яке знаходиться в межах 0.2-0.8 [32].

В результаті проведеного дослідження встановлено, що реактив Драгендорфа є чутливим реагентом для виявлення ізоніазиду. Він утворював забарвлення з розчинами ізоніазиду в концентрації 1 мкг в пробі.

3.2 Розробка методики виявлення ізоніазиду в приманках якісними реакціями.

Мета реакцій виявлення – встановити присутність тієї чи іншої сполуки в зразку, що надійшов на аналіз. Це можуть бути будь-які перетворення, що супроводжуються зміною фізичних властивостей речовин, які можна фіксувати або візуально, або за допомогою якогось приладу (спектральний, люмінесцентний аналіз). Кольорові реакції є одними з основних типів реакцій виявлення речовин.

У разі надходження на судову експертизу продуктів м'ясного походження (м'ясо, м'ясний фарш, ковбаса тощо), в якому знаходяться цілі таблетки або їх частини, доцільно провести скринінг методом якісних аналітичних реакцій. З цією метою використовують попереднє дослідження.

Попередні дослідження проводять з отриманим після ізолювання з приманки етанольним розчином або знайденими в приманці залишками таблеток, які перед проведенням дослідження розчиняють в етанолі.

Для виявлення ізоніазиду у складі приманок (харчові продукти) при попередньому дослідженні були проведені наступні дослідження:

Взаємодія з реактивом Неслера

Досліджуваний розчин наносять на фільтрувальний папір, висушують та обприскують реактивом Несслера. Реактив Несслера (рідина блідо-жовтого кольору) являє собою лужний водний розчин дигідрату калію тетраїодомеркурату K_2HgI_4 . Якщо в результаті реакції спостерігається поява чорного забарвлення, це буде свідчити про можливу присутність в досліджуваному об'єкті ізоніазиду. Слід зазначити, що ця реакція не специфічна і може використовуватися лише для попереднього дослідження, деякі інші препарати можуть давати подібне забарвлення.

Крапельна реакція з хлораміном

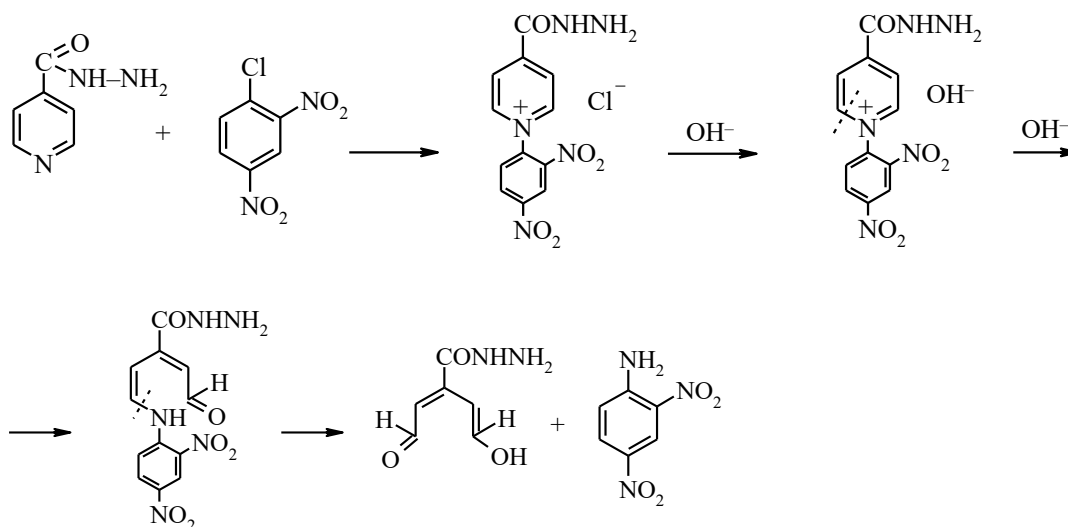
До закритої ємності поміщують ємність з сумішшю хлораміна та кристалічного ціаніду калію. Під витяжною шафою в склянку швидко додають сірчану кислоту та фільтрувальний папір з нанесеним на нього досліджуваного розчину. В разі присутності ізоніазиду через 15-20 хвилин з'являється синє забарвлення.

Взаємодія з м-динітробензолом

До досліджуваного розчину додають спиртовий розчин м-динітробензолу в лужному середовищі при нагріванні. При цьому спостерігається утворення забарвлення суміші у фіолетово-червоний колір, що свідчить про наявність ізоніазиду.

Взаємодія з 2,4-динітрохлорбензолом в лужному середовищі

До досліджуваного розчину додають спиртовий розчин 2,4-динітрохлорбензолу в лужному середовищі при нагріванні. При цьому спостерігається утворення буро-червоне забарвлення, що швидко переходить в червоно-коричнєве, що свідчить про наявність ізоніазиду [31]. Реакція відбувається згідно схеми:



Взаємодія з амонію ванадатом

Поява коричневого забарвлення при взаємодії досліджуваного розчину з амонію ванадатом буде свідчити про наявність в досліджуваному об'єкті ізоніазиду.

*Взаємодія з *n* - диметиламінобензальдегідом*

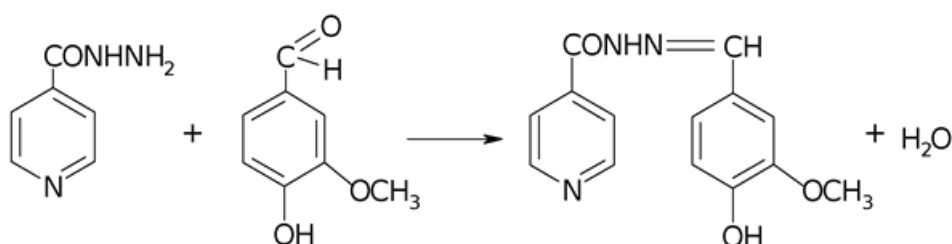
Поява жовтого забарвлення при взаємодії досліджуваного розчину з *n* - диметиламінобензальдегідом буде свідчити про наявність в досліджуваному об'єкті ізоніазиду.

Позитивні результати в попередніх дослідженнях можуть стати передумовою для проведення підтверджуючих реакції. Ці реакції можуть бути не настільки чутливими, але повинні бути достатньо специфічними для того, щоб застосовуватися для ідентифікації та для кількісного визначення виявленої речовини.

Для виявлення ізоніазиду у складі приманок (харчові продукти) при підтверджуючому дослідженні були проведені наступні дослідження:

Взаємодія з ваніліном

Поява жовтого забарвлення при взаємодії досліджуваного розчину з ваніліном буде свідчити про присутність в досліджуваному об'єкті ізоніазиду. Реакція відбувається згідно схеми:



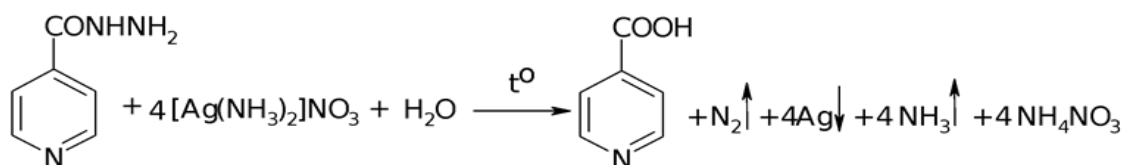
Взаємодія з саліциловим альдегідом

При взаємодії досліджуваного розчину з насиченим лужним розчином саліцилового альдегіду при нагріванні в УФ-світлі з'являється жовте забарвлення.

Взаємодія з аміачним розчином срібла нітрату (реактивом Толенса)

При взаємодії досліджуваного розчину з аміачним розчином азотнокислого срібла, з'являється жовтуватий осад, який під час нагрівання

на водяній бані темніє і на стінках пробірки утворюється срібне дзеркало. Реакція відбувається згідно схеми:

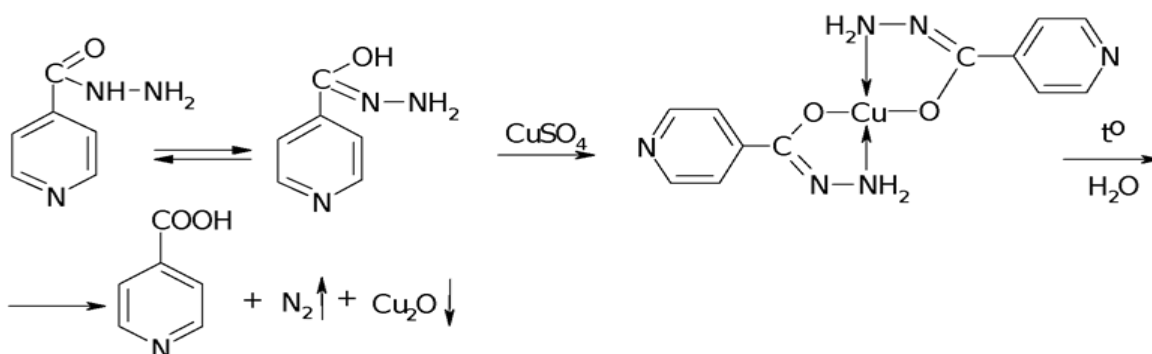


Взаємодія з розчином срібла нітрату

При взаємодії досліджуваного розчину на предметному склі з краплею розчину азотнокислого срібла. Через 3-5 хвилин у полі зору мікроскопа спостерігається утворення призматичних кристалів або їх зростків у вигляді снопів, що свідчить про наявність ізоніазиду.

Взаємодія з розчином сульфата міді

При взаємодії досліджуваного розчину з розчином сульфата міді випадає блакитний осад. При струшуванні розчин також забарвлюється в блакитний колір. При нагріванні розчин та осад набувають світло-зеленого кольору, а потім жовто-зеленого кольору та виділяються бульбашки газу. Реакція відбувається згідно схеми:



Експериментальна частина

Для проведення досліджень використовували пробірки, покривне скло, мірні колби класу А, зважування наважки проводили на аналітичних вагах «AXIS», Всі реактиви відповідають вимогам Державної Фармакопеї України (ДФУ) [30].

Приготування розчинів.

Приготування амонію ванадату:

0,5 г амонію ванадату розчиняють у 200 мл дистильованої води, через добу фільтрують і додають 50 мл 1 М розчину сульфатної кислоти.

Приготування розчину п - диметиламінобензальдегіду:

0,55 г п - диметиламінобензальдегіду розчиняють в 10 мл 96 % етанолу та додають 1мл концентрованої соляної кислоти.

Приготування розчину ваніліну:

0,2 г ваніліну розчиняють в 10 мл концентрованої сірчаної кислоти.

Методики проведення реакцій на виявлення ізоніазиду у складі приманок при попередньому дослідженні:

Взаємодія з реактивом Неслера

На фільтрувальний папір наносять декілька крапель досліджуваного етанольного розчину, висушують та обприскують реактивом Неслера.

Взаємодія ізоніазиду з хлораміном

На фільтрувальний папір, оброблений буферним розчином з рН 5,2, наносять краплю досліджуваного етанольного розчину. Папір кладуть до закритої ємності (об'єм 1-5 л), одночасно туди ж поміщують склянку з сумішшю 5 г хлораміну Т та 2 г кристалічного ціаніду калію (KCN). Під витяжною шафою в склянку швидко додають 2 мл 2 М розчину сірчаної кислоти. В присутності ізоніазиду через 15-20 хвилин з'являється синє забарвлення.

Взаємодія ізоніазиду з м- динітробензолом

До 2 мл етанольного досліджуваного розчину додають по декілька крапель 1 % спиртового розчину м-динітробензолу та декілька крапель 10 % розчину натрію гідроксиду. Отриману суміш нагрівають на водяній бані, спостерігається забарвлення суміші у фіолетово-червоний колір.

Взаємодія ізоніазиду з 2,4- динітрохлорбензолом

До 5 мл досліджуваного етанольного розчину додають 0,05 г 2,4-динітрохлорбензолу і 3 мл 0,5 % етанолу та кип'ятять 1-2 хвилини. Після

охолодження додають 2 краплі розчину натрію гідроксиду, утворюється буро-червоне забарвлення, яке швидко переходить в червоно-коричнєве.

Методики проведення реакцій на виявлення ізоніазиду у складі приманок при підтверджуючому дослідженні:

Взаємодія ізоніазиду з амонію ванадатом.

До 1 мл досліджуваного етанольного розчину додають 2 мл розчину амонію ванадату. Утворюється коричнєве забарвлення.

Взаємодія ізоніазиду з аміачним розчином срібла нітрату (реактивом Толєнса).

До 5 мл досліджуваного етанольного розчину додають 1 мл аміачного розчину азотнокислого срібла, нагрівають на водяній бані. З'являється жовтуватий осад, який поступово темніє і на стінках пробірки поступово утворюється срібне дзеркало (амальгама).

*Взаємодія ізоніазиду з *n* – диметиламінобензальдегідом.*

До 1 мл досліджуваного етанольного розчину додають 2 мл 5 % розчину *n* – диметиламінобензальдегіду, 2 мл 50 % розчину соляної кислоти та нагрівають впродовж 10 хвилин, утворюється жовте забарвлення.

Мікрокристалоскопічна реакція взаємодії ізоніазиду з срібла нітратом.

По одній краплині досліджуваного розчину та реагенту азотнокислого срібла наносять на предметне скло за допомогою піпеток чи скляних паличок. Тоді краплини з'єднують, не перемішуючи, скляною паличкою і через 3-5 хвилин спостерігають під мікроскопом аналітичний ефект (призматичні кристали або їх зростки у вигляді снопів), що свідчить про наявність ізоніазиду.

Взаємодія ізоніазиду з кремніємолібденовою кислотою.

В пробірку вносять 5 мл розчину силікату калію, 4 мл води, 2 мл 0,5 М розчину хлоридної кислоти. Через 3 хвилини до суміші додають 2 мл досліджуваного розчину і перемішують. Після цього вносять 5 мл 6% розчину аміаку. Розчин забарвлюється в синій колір.

Взаємодія ізоніазиду з ваніліном.

До 2 мл досліджуваного розчину додають розчин ваніліну, утворюється жовте забарвлення.

Взаємодія ізоніазиду з розчином міді сульфату.

До 5 мл досліджуваного етанольного розчину додають 4-5 крапель розчину сульфата міді; випадає блакитний осад. При перемішуванні реакційної суміші в пробірці, розчин також забарвлюється в блакитний колір. Розчин нагрівають, при цьому сам розчин та осад набувають світло-зеленого кольору, який в подальшому переходить в жовто-зелений колір та виділяються бульбашки газу.

Висновки до розділу 3

1. Визначені системи розчинників, досліджена хроматографічна рухливість ізоніазиду в двох хроматографічних системах «метанол: 25 % розчин аміаку (100:1,5)», «хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5)».
2. Підібрані умови ідентифікації ізоніазиду – запропоновано реактив Драгендорфа як проявник зон абсорбції на хроматограмі.
3. Запропоновані якісні кольорові реакції, які можуть використовуватися для проведення попереднього та підтверджуючого дослідження при ідентифікації ізоніазиду в складі приманок.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

- Проаналізовані хімічна структура, механізм дії, властивості та токсикологічне значення ізоніазиду як об'єкта судово-ветеринарної експертизи.
- Обгрунтована необхідність вдосконалення, оцінювання придатності та розробки надійних методик ідентифікації ізоніазиду не тільки у біорідинах чи трупному матеріалі, а й у приманках (найчастіше м'ясній продукції), що можуть використовуватися при отруєнні.
- Запропонований комплекс методів виявлення ізоніазиду у складі приманок для визначення його в об'єктах судово-хімічного дослідження з використанням ТШХ та якісних хімічних реакцій.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Шестакова М. О., Шкваря М. М. Отруєння собак ізоніазидом у місті Дніпропетровськ. *Науково–технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2016. Т. 4, № 2. С. 29–34.
2. 3 квітня 2011 року Львівське товариство захисту тварин зафіксувало понад 40 випадків отруєння. 2012. URL: https://galinfo.com.ua/news/z_kvitnya_2011_roku_lvivske_tovarystvo_zahystu_tvaryn_zaf_iksuvalo_ponad_40_vypadkiv_otruiennya_sobak_108804.html (дата звернення: 24.10.2024).
3. Boldrick L. Top 10 Human Medications That Poison Our Pets. ASPCA. 2009. URL: <http://web.archive.org/web/20101206074247/http://www.adoptpethelter.org/Top10HumanMedicationsThatPoisonOurPets.pdf> (Date of access: 30.04.2024).
4. Мульський О. Чому Україна – одна з лідерів за кількістю безпритульних тварин, і як це змінити. *Українська правда*. 2018. URL: <https://life.pravda.com.ua/society/2018/03/7/229362/> (дата звернення: 30.04.2024).
5. Стерилізація тварин, ліцензування розведення та відповідальність за викидання та підкидання потомства. URL: <https://petition.kmu.gov.ua/petitions/6429> (дата звернення: 30.05.2024).
6. Кримінальний кодекс України. *Відомості Верховної Ради України*. 2001. № 25–26. Ст. 131. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2341-14#Text> (дата звернення: 4.10.2024).
7. Коцюмбас Г. І., Данкович Р. С., Врецьона Н. П. Патоморфологія та діагностика отруєння собак ізоніазидом. *Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20, № 83. С. 108–114. DOI: 10.15421/nvlvet8321.
8. Ізоніазид. *Компендиум 2008 – лікарські препарати*. Київ, 2008. С. 536.

9. Кодекс України про адміністративні правопорушення. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/80731-10#Text> (дата звернення: 4.10.2024).
10. Isoniazid. URL: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/isoniazid> (Date of access: 30.04.2024).
11. Pharmacology of Isonicotinic Acid Hydrazide (Nydrazid) / B. Rubin et al. *American Review of Tuberculosis*. 1952. Vol. 65. P. 392–401.
12. Butcher N. J., Boukouvala S., Minchin R. F. Pharmacogenetics of the arylamine n-acetyltransferases. *Pharmacogenomics Journal*. 2002. Vol. 2. P. 30–42.
13. Bhise S. B. Isoniazid Toxicity. *J. Drug. Des. Res.* 2017. Vol. 4 (7). P. 1–8.
14. Noel P. R., Worden A. N., Palmer A. C. Neuropathologic effects and comparative toxicity for dogs of isonicotinic acid hydrazide and its methanesulfonate derivative. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1967. Vol. 10 (2). P. 183–198.
15. Maurer H. H., Pfleger K., Weber A. A. Mass Spectral and GC data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites. 5th, revised and enlarged editions. Homburg, 2017. 1280 p.
16. Arsalan R., Sabzwari S. Isoniazid induced motor–dominant neuropathy. *J. Pak. Med. Assoc.* 2015. Vol. 65 (10). P. 1131–1133.
17. Referatenteil / Heilmeyer L. Zenker et al. *Klin Wochenschr.* 1952. Vol. 30. P. 955–960.
18. Гістологічні та гістохімічні зміни в печінці собак за отруєння ізоніазидом / Г. І. Коцюмбас та ін. *Науковий вісник ЛНУ ВМБ ім. С. З. Гжицького*. 2018. Т. 20 (92). С. 197–202.
19. Convulsions as the etiology of lactic acidosis in acute isoniazid toxicity in dogs / L. Chin et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979. Vol. 49 (2). P. 377–384.
20. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. third ed. London–Chicago, 2004. 1190 p.
21. Ножницька Ю. Лабораторна діагностика отруєнь собак. *Тваринництво України*. 2016. № 3. С. 26–28.

- 22.Щетинський І. М., Ульяницька А. Ю., Захар'єв А. В. Патоморфологічна характеристика отруєння собак ізоніазидом. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. 2015. Т. 31, № 2. С. 278–281.
- 23.Treatment of acute isoniazid overdose in dogs / D. Villar et al. *Vet. Hum. Toxicol.* 1995. Vol. 37 (5). P. 473–477.
- 24.Evaluation of diazepam and pyridoxine as antidotes to isoniazid intoxication in rats and dogs / L. Chin et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1978. Vol. 45 (3). P. 713–722.
- 25.Isoniazid toxicosis in dogs: 137 cases (2004–2014) / D. R. Schmid et al. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2017. Vol. 251 (6). P. 689–695. DOI: 10.2460/javma.251.6.689.
- 26.Спосіб визначення ізоніазиду в організмі собак при отруєнні / О. В. Байєр та ін. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8 (1). P. 498–502.
- 27.**Аналітична** токсикологія : навч. посіб. для студентів вищ. навч. закл. / С. В. Баярка, В. С. Бондар, С. І. Мерзлікін та ін. — Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2017. — 384 с.
- 28.Експертне дослідження ізоніазиду в м'ясній продукції. URL: <https://digest.kndise.gov.ua/%D0%B5%D0%BA%D1%81%D0%BF%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%BD%D0%B5-%D0%B4%D0%BE%D1%81%D0%BB%D1%96%D0%B4%D0%B6%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F-%D1%96%D0%B7%D0%BE%D0%BD%D1%96%D0%B0%D0%B7%D0%B8%D0%B4%D1%83-%D0%B2-%D0%BC/> (дата звернення: 07.10.2024).
- 29.ДСТУ 7670:2014. Сировина і продукти харчові. Готування проб. Мінералізація для визначання вмісту токсичних елементів. Національний стандарт України. Київ : Мінекономрозвитку України, 2015. URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=85544 (дата звернення: 30.04.2024).

30. Мінаєва В. О. Хроматографічний аналіз: Підручник для студентів вищих навчальних закладів. – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 284 с.
31. Медична хімія : навч. посіб. для студ. вищ. фарм. навч. закл. і фарм. ф-тів вищих мед. навч. закл. III-IV рівнів акредитації / І. С. Гриценко, С. Г. Таран, Л. О. Перехода [та ін.] ; за заг. ред. І. С. Гриценко. – Х., 2016. – 584 с.
32. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1121 с.

ДОДАТОК А

Міністерство охорони здоров'я України
Міністерство освіти і науки України
Національний фармацевтичний університет
Кафедра фармацевтичної хімії
Кафедра загальної хімії



СЕРТИФІКАТ

№327

Цим засвідчується, що

Хамула Н.

брав(-ла) участь у Міжнародній internet-конференції

'Modern chemistry of medicines'

25 вересня 2024 р., м. Харків, Україна

Повідомлення Державної наукової установи «Український інститут науково-технічної експертизи та інформації» № 263 від 3.09.2024 з.

В. о. ректора НФаУ, проф.

Проректор з науково-педагогічної роботи, проф.



Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

