

碱性含氮毒物快速分离鉴别法

II. 硅钨酸对生物碱或碱性含氮毒物的沉降作用及其对鉴别毒物的影响

黄鸣驹* 邱崇嵩**

提要 继续证明硅钨酸试剂沉降碱性含氮毒物的作用,比经典的 Stas-Otto 法优越。利用新旧两法分别提取的土的宁及匹拉米董,通过各种颜色反应的对比试验和残渣纯度的对比,更充分地证明硅钨酸分离法,不仅可以缩短提取毒物时间,节约试剂,同时由于最后所得的浸出残渣比之从 Stas-Otto 法所得的残渣较为纯粹,因而能提高若干颜色反应的灵敏度。

应用硅钨酸沉降法,对于生物性材料中提取碱性含氮毒物的回收率比用 Stas-Otto 法提取的回收率要高。例如食物中土的宁的回收率平均为 47.0%, Stas-Otto 法平均为 38.0%,食物中匹拉米董的回收率平均为 87.4%, Stas-Otto 法平均仅为 56.0%。

利用硅钨酸试剂分离土的宁及匹拉米董时,对硅钨酸的用量,酸碱度等条件,都做了一系列试验,并提出最适宜的操作方法。

从复杂的生物性材料中分离生物碱或其他人工合成的碱性含氮毒物,在毒物分析上一向都是采用经典的 Stas-Otto 法。但此法在操作上存在一定缺点,不仅手續繁杂,耗費很多有机溶剂,同时很容易导致被分离的毒物損失。本文作者之一^[1]曾于第一报中提出用硅钨酸作为对碱性含氮毒物的分离试剂(即利用硅钨酸有沉降碱性含氮毒物的性质,沉淀用碱破坏溶解后,再用有机溶剂振搖浸出),避免用酒精和水反复提取的操作,以嗎啡及普魯卡因作为代表性碱性含氮毒物,并試出其分离的适宜条件,达到快速分离目的。本文是以土的宁及匹拉米董分别代表生物碱及人工合成含氮毒物,繼續証明硅钨酸在毒物分析中,特别是从复杂的生物性检体中,对含氮毒物的分离作用,确实有一定的优越性。同时我們认为用 Stas-Otto 法提取毒物,在理論上似乎所有脂肪、树脂、色素、淀粉、无机盐类等杂质都被除去,实验上用有机溶剂振搖,最后所得的毒物残渣,仍然混存有脂肪色素等杂质,这往往影响毒物颜色反应的灵敏度。硅钨酸沉淀法,既然是将含氮毒物从生物性检液中或其酸性水浸液中直接定量地或接近定量地沉淀出来,那末最后所得的毒物纯度应该比从 Stas-Otto 法所得的毒物纯度要高些。因此,利用硅钨酸沉淀法,分离碱性含氮毒物,不仅可以达到快速分离的目的,而且应该还可以提高毒物颜色反应的灵敏度。这种推测,通过实验,也得到证实。此外,根据实验结果,利用硅钨酸法,分离碱性含氮毒物,其回收率一般还比 Stas-Otto 法要高。

本文于 1964 年 9 月 7 日收到。

* 通讯处:北京东四猪市大街中国药学会转。

** 进修生。

实 验 部 分*

酸度对硅钨酸沉降含氮毒物的影响试验

通过酸度试验,发现在不同酸度,特别是对士的宁的回收率有一定的影响(图1)。

从图1中可以看出,在用硅钨酸沉降士的宁时,溶液必须具有一定的酸度。酸度过低,大量士的宁显然不能被沉降。例如:不加盐酸,(pH为6.2)士的宁回收率为42.0%,如加0.1毫升10%盐酸(pH为1.55)时,回收率增加到54.0%。加0.5毫升10%盐酸(pH为1.0)时,回收率显著提高到92.0%,但盐酸加得过多,则沉降率稍有下降。因此,我们认为沉降士的宁时,溶液的酸度,在5毫升溶液中,士的宁含量在5毫克上下的情况下,10%盐酸可加0.5—1.0毫升(即pH 0.75—1.0)为适宜。

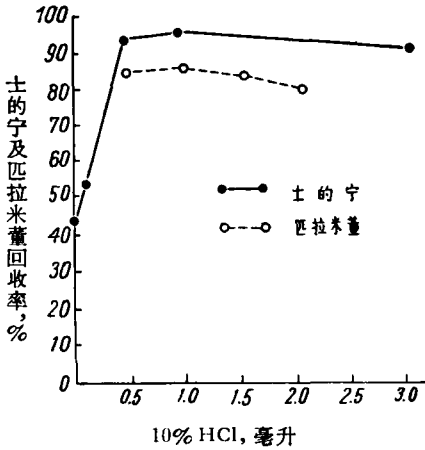


图1 酸量对硅钨酸沉降含氮毒物(5毫克/5毫升)的影响

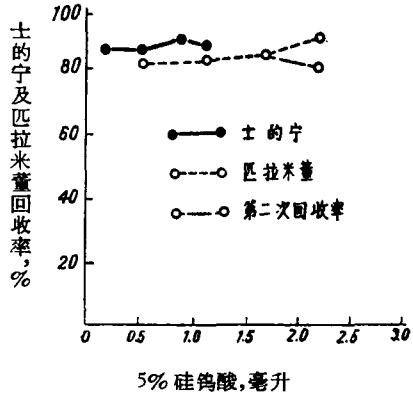


图2 硅钨酸量对含氮毒物(5毫克/5毫升)回收率的影响

酸度对另一碱性含氮毒物匹拉米董的硅钨酸回收率,影响似较小。我们认为5毫升供试验的溶液中,匹拉米董含量在5毫克左右时,用硅钨酸沉降匹拉米董,酸化用10%盐酸0.5—1.5毫升即可(图1)。

硅钨酸量对于碱性含氮毒物回收率影响的试验

通过图2可以看出,加硅钨酸到足够使士的宁或匹拉米董完全沉淀的用量时,再加些,对含氮毒物的回收率影响并不大。我们认为5毫升检液中,士的宁含量在5毫克左右,5%硅钨酸用量可在0.4—1.0毫升之间,对匹拉米董含量在5毫克左右时,5%硅钨酸用量应在1.0—2.0毫升之间(图2)。

碱度对含氮毒物回收率的影响试验

应用硅钨酸使含氮毒物,生成硅钨酸盐沉淀,当用10%氢氧化钠溶液碱化时,沉淀溶解。从图3中可以看出,随着氢氧化钠增加,士的宁回收率虽稍有提高,由88%提高到96%,但我们认为影响并不大,10%NaOH量可保持在0.5—0.75毫升之间(在5毫克/毫升士的宁情况下)(图3)。

* 本文部分实验由蔡文娟同志做。

至于碱化时 10% 氢氧化钠用量多少,影响匹拉米董的回收率似较大,如图 3 所示,碱性愈强,回收率也愈大,我们认为匹拉米董含量在 5 毫克左右,碱化时,10% 氢氧化钠的用量,可保持在 2—3 毫升之间(图 3)。

根据上列各种试验结果,我们提出下列操作方法。

用硅钨酸法提取碱性含氮毒物士的宁或匹拉米董的操作方法

取供试验的固体生物性检体 10 克(如为液体,如尿,可取 10 毫升直接调整酸度后,加硅钨酸沉降),捣切细碎,加水 20 毫升,10% 盐酸 2 毫升,混合均匀,冷浸或温浸(40—50℃) 20 分钟,(浸时须常常摇动)过滤或吸滤,用酸性水(4—5 毫升水中加稀酸 1—2 滴)洗涤滤渣一次,收集全部滤液,用水稀释至 30 毫升,吸取 5—15 毫升,放入具有刻度,内容 15 毫升的离心管中(如检体为肉类浸液,应先加 10% 三氯醋酸 0.7—2.0 毫升沉降蛋白,离心沉淀后,取上清液 5—15 毫升应用)。如为士的宁,加 10% 盐酸 0.5—2.0 毫升,及 5% 硅钨酸 0.4—1.2 毫升(如为匹拉米董,加 10% 盐酸 0.5—2.0 毫升,5% 硅钨酸 1.0—2.0 毫升),搅拌使沉淀完全,放置离心机中,离心旋摇 10—20 分钟(3000 转/分),倾去上清液,沉淀中加 10% 氢氧化钠液 0.5—1.5 毫升(如为匹拉米董加 2—6 毫升),并加水至 5—10 毫升刻度,用玻璃棒搅拌,至完全溶解。将溶液移入小分液漏斗中,用乙醚提取,每次用与试液等量的醚,振摇提取四次。合并醚液,用水 10 毫升振摇洗涤醚液一次,分出水层,用无水硫酸钠干燥醚液后,过滤,再用少量醚洗涤一次干燥用的硫酸钠,合并醚液,在温热水浴上,蒸去醚,残渣即可供鉴别或定量之用。

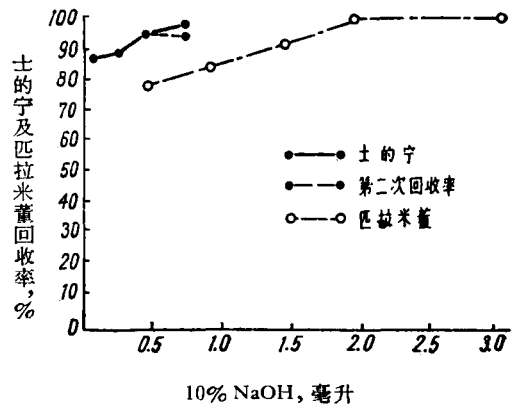


图 3 碱度对硅钨酸沉降含氮毒物(5 毫克/5 毫升)回收率的影响

表 1 硅钨酸沉降碱性含氮毒物回收率试验

含氮毒物	试号	含氮毒物 加入量 毫克/毫升	10%盐酸 加入量 毫升	5%硅钨酸 加入量 毫升	10%氢氧化 钠加入量 毫升	回收量 毫克	回收率 %	备注
士的宁	1	5/5	1	0.8	1	4.6	92	用纯粹硫酸 士的宁溶液 试验
	2	5/5	1	0.4	0.5	4.6	92	
	3	5/5	1	0.4	0.5	4.4	88	
	4	5/5	1	0.4	0.5	4.6	92	
	平均回收量及回收率						4.71	
匹拉米董	1	5/5	1	1	3	4.22	84.4	用纯粹匹拉 米董溶液试 验
	2	5/5	1	1	3	4.44	88.8	
	3	5/5	1	1	3	5.25	105.0	
	4	5/5	1	1	3	4.94	98.8	
	平均回收量及回收率						4.71	

根据上述方法实验结果,从纯粹的硫酸士的宁溶液中,用硅钨酸沉降士的宁,回收率

表 2 固体食物中用硅钨酸法与 Stas-Otto 法分离碱性含氮毒物的回收率对比试验

含氮毒物	试 号	含氮毒物 加入量 毫克/毫升	回收量, 毫克		回收率, %		Stas-Otto 法文献回 收率, %	备 注
			硅钨酸法	Stas-Otto 法	硅钨酸法	Stas-Otto 法		
士 的 宁	1	5/5	2.6	2.6	52	52	Stas-Otto 法 试验时用无 水酒精及水 各提取两次	
	2	5/5	2.4	2.2	48	44		
	3	5/5	2.2	2.0	44	40		
	4	5/5	2.2	0.8	44	16		
	平均回收量及回收率		2.7	1.9	47	38		27.5
匹 拉 米 董	1	5/5	4.2	2.4	84.0	47	同上	
	2	5/5	4.4	3.2	88.4	64		
	3	5/5	4.5	2.6	90.0	52		
	4	5/5	4.4	2.3	87.6	45		
	平均回收量及回收率		4.37	2.6	87.5	52		

平均为 91.0%，从纯粹匹拉米董水溶液中沉降匹拉米董，回收率平均为 94.2% (表 1)，从食物中用硅钨酸沉降士的宁，平均回收率为 47.0%，用 Stas-Otto 法，士的宁平均回收率为 38.0%，文献^[3,10]回收率平均仅为 27.5%。从食物中用硅钨酸沉降匹拉米董，回收率平均为 87.5%，用 Stas-Otto 法，匹拉米董平均回收率仅为 52.0% (表 2)。从尿中用硅钨酸沉降士的宁，平均回收率为 85.0% (表 3)。

表 3 尿中用硅钨酸沉降士的宁的回收率

试 号	检体种类	试液量 毫升	硫酸士的 宁加入量 毫克	10%盐酸 加入量 毫升	5%硅钨 酸加入量 毫升	10%氢氧化 钠加入量 毫升	回收量 毫克	回收率 %
1	尿	10	5	1	1	0.5	4.2	84
2	尿	10	5	1	1	0.5	4.4	88
3	尿	10	5	1	1	0.5	4.0	80
4	尿	10	5	1	1	0.5	4.4	88
平均回收量及回收率							4.25	85

从表 1—3 中可以看出，硅钨酸对士的宁及匹拉米董从纯粹的含氮毒物水溶液中一般回收率都在 90% 以上，从食物或尿中回收率一般也都接近于 90%，都比用 Stas-Otto 法分离的回收率高。

从固体食物中用硅钨酸法分离士的宁，可能由于吸附作用，一般回收率虽较低，但比之用 Stas-Otto 法分离，回收率所得仍然较高。

从表 3 中可以看出，尿中用硅钨酸沉降士的宁回收率较食物中分离的为高 (80—88%)，这说明尿中没有象食物中存在着大量蛋白质、脂肪、及具有吸附作用的固体物质的关系，所以回收率较高。

对于士的宁及匹拉米董定量，都采用 Bandelin^[2] 四硫氰二氨基代铬酸铵 (ammonium reineckate) 比色法，所用仪器是国产 72 型分光光度计。

表 4 硅钨酸法与 Stas-Otto 法提取所得的碱性含氮毒物残渣反应灵敏度比较

种 类	颜色反应	用 量 微克	硅 钨 酸 法	Stas-Otto 法	最小可鉴量, 微克	
					硅钨酸法	Stas-Otto 法
士 的 宁	残渣比较		残渣呈白色结晶粉状	残渣呈无定形状在残渣周围有黄色圈		
	重铬酸钾法	2	++	+	1	2
		1	+	-		
		0.4	-	-		
	高锰酸钾法 ^[6]	2	+	+	1	2
		1	+	-		
		0.4	-	-		
氯酸钾法 ^[6]	20	+	+	10	20	
	10	+	-			
	6	-	-			
Deniges 法 ^[7]	10	++	+	6	10	
	6	+	-			
	4	-	-			
Warthon 法 ^[8]	10	++	+	2	10	
	5	++	-			
	2	+	-			
	1	-	-			
* 匹 拉 米 董	残渣比较		残渣呈白色结晶粉状	残渣为无定形并呈黄色		
	三氯化铁试验法	100	++	+	10	50
		50	+	+		
		10	+	-		
		5	-	-		
	亚硝酸钠试验法	500	++	+	250	500
		250	+	-		
		100	-	-		
	硝酸银试验法	100	++	+	50	100
		50	+	-		
10		-	-			
Mandelin 反应 ^[11]	500	++	+	100	500	
	250	+	-			
	100	+	-			
	50	-	-			

[注] ++表示强阳性, +表示阳性, -表示阴性。

* 匹拉米董各反应,都是用点滴反应,即取蘸浸出残渣,不溶于水,直接用试剂滴入,所以灵敏度比文献的灵敏度高。

总括以上实验结果来看,充分说明硅钨酸沉降法,无论对生物碱或其他碱性含氮毒物,从生物性材料中的分离作用,其优越性,远超过 Stas-Otto 经典方法,不仅操作方法大大简化,而且在一定条件下,使毒物的回收率也相对地提高。

硅钨酸法的另一特点是它还能使提取出来的含氮毒物的纯洁性也有所提高。

如表 4 所示,可以明显地看出,用硅钨酸沉降法与用 Stas-Otto 法提取生物碱或含氮毒物所得的残渣以及颜色反应的对比,不仅两种残渣的纯度有显著的区别,而且颜色反应的灵敏度也明显不同。这说明硅钨酸提取法,比 Stas-Otto 法提取所得的残渣杂质较少,因而反应灵敏度提高。

讨 论

根据我们的试验,由生物性材料中用硅钨酸法或用 Stas-Otto 法,分离提取士的宁回收量都较低。根据文献 Вестфаль^[9] 认为士的宁与生物性检体接触时,产生吸附作用或其它的作用而损失士的宁 55—80%, Roth^[10] 等用胰酶消化生物性检体中蛋白质、脂肪等,使士的宁分离提取率高达平均 98.9%,这也充分证明蛋白质、脂肪等对士的宁分离提取有极大影响。但是,由于采用消化法操作手续烦琐,时间过长,不适宜快速分离,要想达到快速分离,对此问题尚待探讨。

根据 Autenrieth^[4] 实验,匹拉米董内服通过身体,排泄于小便中,虽内服大量也不能试出不变的匹拉米董,这时小便中仅含有它的代谢产物“罗吧啉酸”(rubazonic Acid)及“安替比林脲”(antipryl-urea)。我们也曾用服用 0.2 克匹拉米董后的小便,直接加硅钨酸,虽也生出沉淀,但碱化时,发生随即褪色的蓝黑色,用醚振摇,所得残渣很少,也不显匹拉米董的三氯化铁反应及硝酸银反应,这说明小便中已不含有匹拉米董,因此,也不能再作回收率的试验。至于硅钨酸沉淀,碱化变蓝黑色,究系何种成分,可能是如上面所讲的代谢产物。因超出本题范围之外,故未作深入的研究。

根据其他文献^[12]报导,匹拉米董中毒后,虽不能在小便中发现不变质的匹拉米董,但在其他身体器官中,特别是胃脏、肝脏中,用 Stas-Otto 法,仍可试出匹拉米董的存在。由此可见,硅钨酸沉降法,在匹拉米董检验中,仍然可以代替 Stas-Otto 法,起到快速鉴别的作用。

参 考 文 献

- [1] 黄鸣驹,胡乃钊等:碱性含氮毒物的快速分离鉴别法(第一报),药学报,1959,8(7),287.
- [2] Bandelin, F. J.: *J. Am. Pharm. Ass. (Sci. ed.)*, 1950, 39(9), 493.
- [3] Autenrieth-Bauer: *Die Auffindung der Gifte*, 1943, 6. Aufl., S. 111.
- [4] *Ibid.*, 1943, S. 135.
- [5] Bauer-Moll: *Die organische Analyse*, 1954, S. 525.
- [6] Mathis, C.: *Z. anal. Chem.*, 1957, 155, 318.
- [7] Deniges: *Bull. Soc. Chim.*, 9, 537.
- [8] 黄鸣驹:毒物分析化学,1957,195页,人民卫生出版社。
- [9] Вестфаль, Н. И., *Аптечное дело*, 1958, 3, 31.
- [10] Roth, W., Arrigoni and Fischer, L.: *J. Am. pharm. Ass. (Sci. ed.)*, 1953, 42(5), 309.
- [11] Bamford, F.: *Poisons Their Isolation and Identification*, 1951, 3rd. ed. p. 259.
- [12] Wagner, K.: *Samml. Vergiftungsjaelle*, 1931, 2, 111.

DIE SCHNELLE ISOLIERUNGS- UND IDENTIFIZIERUNGSMETHODE DER BASISCHEN STICKSTOFFHALTIGEN GIFTE IN DER TOXIKOLOGISCHEN CHEMISCHEN ANALYSE

II. DIE PRÄZIPITATIONSWIRKUNG DER KIESELWURFRAMSÄURE ZUR ISOLIERUNG DER BASISCHEN STICKSTOFFHALTIGEN GIFTE UND DIE BEEINFLUSSUNG DERSELBEN AUF DIE EMPFINDLICHKEIT DER BETREFFENDEN FARBREAKTIONEN

HUANG MING-CHUE UND CHOU CHOUN-LUN

Auszug

Es wird durch die vorliegende Arbeit in der Fortsetzung der ersten Mitteilung^[1] weiter bewiesen, dass die Isolierungsmethode der Kieselwurframsäure zur Extraktion der basischen stickstoffhaltigen Gifte in der toxikologischen Analyse sicher dem Stas-Otto's Verfahren überlegen ist.

Die neue Isolierungsmethode zeichnet sich nicht nur durch Einfachheit, Bequemlichkeit und Sparen an Zeit und an Lösungsmittel sondern auch durch die Reinheit des daraus erhaltenen Abdampfungsrückstandes aus, so dass die Empfindlichkeiten einiger Farbreaktionen der betreffenden basischen stickstoffhaltigen Gifte in Vergleichung mit dem Stas-Otto's Verfahren erhöht sind.

Die verschiedenen günstigen Bediengungen, wie pH-Bereich und zugesetzte Reagentmengen, die zur Isolierung von Strychnin und Pyramidon während der Fällungen anwenden sollen, sind durch Kurven und auch tabellarisch angegeben.