

*Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve
Toksikoloji Kürsüsü*

Prof. Dr. M. Şahin Akman

**KLÂSİK STAS-OTTO TOKSİKOLOJİK ANALİZ
METODUNDA RENK REAKSİYONLARINI
MASKELEYEN EKSTRAKTİF RENKLERİN
GİDERİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

A. Nâzım Özkazaç*

Giriş

Toksikolojik analizlerde, zehirlerin buldukları ortamlardan izolasyonları, seperasyonları ve saf halde elde edilmeleri önemli basamakları teşkil ederler. Zehirlenme olaylarında, uçucu olmayan organik zehirlerin izolasyonu ve identifikasyonu analitik toksikoloji yönünden çok güç usulleri gerektirir. Zehirlenmeye sebep olan zehir spesifik bir madde ise, bu maddenin izolasyonu ve tanınması kolayca yapılabilir. Etmeni bilinmeyen zehirlenme ile husule gelen ölüm vak'asında zehirlerin rutin olarak araştırılması, zehirlerin identifikasyonuna müsaade eden yeter miktarda yeter derecede saf halde, keza mümkün olduğu kadar çok maddenin izolasyonunu temin edecek bir metodun kullanılması ile yapılır (18). Organik eritkenlere geçen zehirlerin ekstraksiyonu için kullanılacak metotlar toksikoloğun kişisel tecrübesine ve analize ayıracağı zamanına bağlıdır (11).

Bu bakımdan, geçmişte ve hatta bugün bile klâsik STAS (36, 37) ve OTTO (28) ekstraksiyon metodu ve bu metotların değiştirilmiş şekilleri, ekstraksiyon metodu olarak kullanılmış ve kullanılmaktadır. STAS-OTTO metodu dokulara, kan, idrar ve bu madde karışımlarına tatbik edilebilir ve bu durum bu metodun elverişli pozisyonunu uzun zaman muhafaza etmesini sağlamıştır (16).

* Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Kürsüsü Doçenti, Ankara, Türkiye.

Freimuth (19) uçucu olmiyan organik maddelerin izolasyonunda kullanılan klâsik STAS-OTTO usulünün, ekstrakte edilen zehirlerin tamamıyla yabancı maddelerden kurtarılamaması ve çok sayıda zehirlerin aranması ve tanınmasını sağlayamaması gibi yetersizliği olduğunu ve bu faktörlerden ötürü Stas-Otto analiz metodunda çeşitli modifikasyonların (tadillerin) yapıldığını bildirmektedir. Klâsik Stas-Otto metodunda esaslı bir değişiklik ALHA ve LINDFORS tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar proteinli maddelerin çöktürülmesi için ve organik maddelerin eritilmesinde alkol yerine asetonu kullanmışlardır (19). Fakat, klâsik STAS-OTTO analiz metodu bugün bile geniş bir şekilde kullanılmaktadır (1, 11).

Bilim ve toksikoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, alkaloitler ve benzeri bazik maddelerin nesiçlerden çabuk izolasyonu için ekstraksiyon prosedürleri ve alkaloitlerin pürifikasyonu (saf hale getirilmesi) ve seperasyonları (4, 6, 7, 13, 14, 15, 21, 23, 32, 41, 43) keza tanınmaları (identifikasyonu) ve tayinleri (2, 5, 9, 10, 17, 20, 22, 24, 25, 27, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 44) yeni araştırmaların konusu haline getirilmiştir. Metotların bazıları klâsik toksikoloji kitaplarına girmiştir (1, 3, 42, 45).

Kullanılan yeni tekniklerin başlıcalarını kâğıt ve iyon-mübadelesi kromatografisi, elektrofores, infrared ve ultraviyole spektrometreler teşkil etmektedir (10, 16). Bu yeni teknikler toksikoloğların baş vurdukları usullerdir (10). Fakat, bugün toksikolojide kullanılan modern metotların eski metotların yerine kaim olmaktan ziyade; ekseriya tamamlayıcı büyük değerleri vardır (38). MORGAN (26) idrarda küçük miktarlardaki organik zehirlerin tayininde kâğıt kromatografisi tekniğini uygun bulmaktadır.

Freimuth (18) alkaloitlerin dokulardan izolasyonu için baş vurulan klâsik Stas-Otto tekniğinin uzun, yorucu olduğunu, istisnasız büyük miktarda yabancı maddelerin mevcudiyeti sebebiyle tanıma reaksiyonlarını karıştırdığını bildirmektedir.

Akman (1) Stas-Otto usulü ile yapılan muayenede "Süzülen alkollü sıvı, alkaloitleri erimiş tartaratlar halinde taşır, fakat süzülen sıvı çok renklidir. Çünkü, alkol yağları, çeşitli ekstraktif maddeleri de eritmiştir. Sıvının ihtiva etmiş olduğu bir çok yabancı maddelerden (safiyetini değiştiren maddelerden) kurtarılması lâzımdır". Bundan başka AKMAN (1) kloroformla yapılan ekstraksiyonda organik maddelerden hiçbirisi bulunmadığı halde bile, saat camlarında kloroformlu hulâsa uçurulduktan laktik asidi, şarap asidi ve reçineli maddelerle, renkli maddelerden bir rusup kalabilir demektedir.

Zehirlerin tanınması (identifikasyonu) kendilerine has (spesifik) renk reaksiyonu, kristal teşekkülü ve özel alkaloit miyarları ile precipitasyon deneyleriyle yapılır ve kimyasal usüllerle tanınmanın mümkün olmadığı hallerde biyolojik metotlara ve erime noktası tayini metotlarına baş vurulur. Bu işlemlerin yapılması için zehirlerin pürifiye bir halde elde edilmeleri gereklidir (42).

AKMAN (1) tarafından bildirildiği gibi: STAS-OTTO usulünde organik eritkenlerle ekstraksiyona hazır duruma getirilen asit - sulu eriyiğin kloroformla yapılan ekstraksiyonunda, ekstraktif renkler kloroforma geçmekte ve kloroformlu ekstraktın saat camları veya beyaz porselen kapsülde tamamıyla uçurulmasından sonra da rengin kalışı, zehirlerin tanınması için tatbik edilen renk reaksiyonlarını maskeleymektedir.

Stas-Otto usulünde bir mahsur teşkil eden ve renk reaksiyonlarını maskeleyen bu ekstraktif renklerin giderilerek, renk reaksiyonlarının daha güvenilir bir şekilde tatbiklerini renksiz kalıntılar üzerine tatbik edebilme olanağını sağlamak amacıyla bu çalışmamızı yapmış bulunuyoruz.

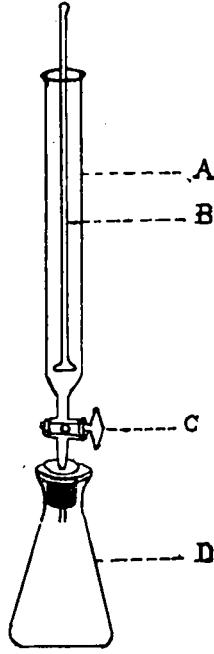
Materyal ve Metot

Klâsik Stas-Otto toksikolojik analiz metodundaki ekstraktif renklerin giderilmesi için yaptığımız bu çalışmamızda analiz materyalimizi, zehirlenme şüphesi ile ölen hayvanlardan alınıp toksikolojik analiz için kürsümüze gönderilen ve toksikolojik analiz sonunda organik ve inorganik bir zehir tespit edilmemiş olan mide-barsak muhteviyatı ile muhtelif iç organlara ait - (karaciğer, dalak, kalp, böbrekler ve akciğerlerden alınmış) - parçalar teşkil etmiştir. Denemelerimizde kullanılan ilâçların başlıcaları Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Strikinin sülfat ve Veratrinden ibaretti.

Organik eritkenlere, özellikle asit-sulu sıvının kloroformla yapılan ekstraksiyonunda kloroforma geçen ekstraktif renklerin giderilmesi bakımından hazırlanan kromatografik kolonlar için Selayt (Celite) No. 545 ile, E. Merck Firmasının hazırlamış olduğu Aluminyum Oksit Aktif, Asit (Oxyde d'Aluminium active, acide pour le chromatographie) kullanılmıştır. Denemelerimizde kullanılan kromatografik seperasyon kolonları aşağıda anlatılan şekilde hazırlandı.

DAVIDOW COLUMN

Şekilde görüldüğü gibi bu alet iki kısımdan müteşekkildir. Şekil 1.



Şekil 1.

- A - Kromatografik tüp
 B - Pekiştirme çubuğu
 C - Musluk
 D - Sıvının biriktirildiği cam balon
 (Erlenmeyer veya Memeli Erlenmeyer balonu)

Kromatografik tüpün içi 28 mm. çapında ve boyu 400 mm. uzunluğundadır (29). Esası DAVIDOW (12) tarafından vazedilen bu kromatografik seperasyon usulü DDT'nin yağlı ve ekstraktif maddelerden seperasyonunda geniş mikyasta kullanılmıştır (12, 29).

Selayt (Celite) No. 545 ile Kolonun Hazırlanması (1 Numaralı Kolon)

- 30 gram Selayt No. 545
 9 cc. Saf Sülfürik asit
 9 cc. Tüten Sülfürik asit % 15 lik
 120 cc. Saf Karbon Tetraklorür

Her bir kolon için yukarıda isim ve miktarları bildirilen maddeler, cam bir havan içerisinde devamlı bir şekilde karıştırılarak, mütecanis bir karışım haline getirildi. Kromatografik tüpün içine mütecanis kalınlıkta bir cam pamuğu tabakası kondu ve pekiştirme çubuğu ile pekiştirildi. Sonra geniş delikli bir huni yardımı ile hazırlanan kolon

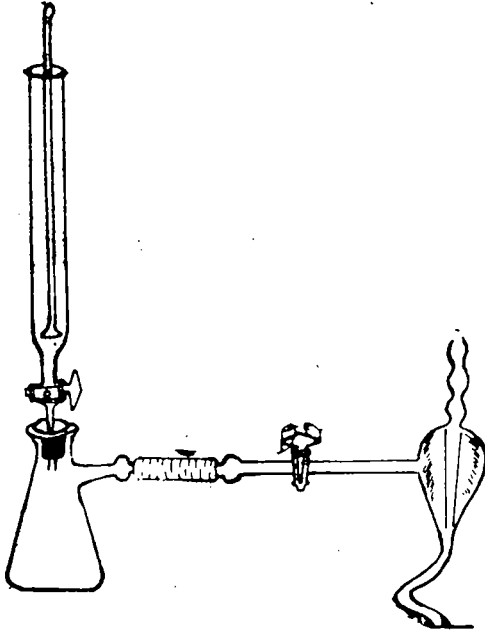
muhteviyatı kitlesi tüp içine parti parti konuldu (her parti 25 mm. kalınlıkta olmalıdır) ve cam pekiştirme çubuğu ile pekiştirildi. Kolonun üst tabakası üzerine mütecanis kalınlıkta yeniden cam pamuğu kondu ve pekiştirildi (pekiştirme ne çok sıkı ve ne de çok gevşek olacaktır). Cam pamuk tabakasının üstünde 2 mm. kalınlıkta karbon tetraklorür kalacak şekilde, fazla olan karbon tetraklorür C musluğu vasıtasıyla ortamdandan alındı. Bu şekilde kolon kullanılmağa hazır bir duruma getirildi.

Aluminyum Oksit Aktif Asit ile Kolonun Hazırlanması (2 Numaralı Kolon)

Yukarıda özellikleri bildirilen cam kolon tüpü kullanıldı. Kromatografik tüp içine kalın ve mütecanis bir tabaka halinde cam pamuğu kondu. Keza tüpün iç kutruna göre daire şeklinde kesilen süzgeç kâğıtlarından 4 adet ve tekrar cam pamuğundan mütecanis bir tabaka tüp içine yerleştirildi. Damıtık su ile ıslatıldı ve cam pekiştirme çubuğu ile pekiştirildi. Bu şekilde hazırlanan tüp içerisine 30 gram Aluminyum Oksit Aktif, asit konuldu ve üzerine 15 cc. damıtık su ilâve edildi. 24 saat beklenildi. İlk konan su musluk vasıtasıyla alındı. Kolon muhteviyatı 3 defa, her defasında 50 cc. damıtık su ile yıkandı. Konan sulu-sıvının kolondan geçişinin hızlandırılması için, kolonun alt ucuna memeli bir Erlenmeyer balonu usulüne göre intibak ettirildi. Şekil 2. Balon su trompuna bağlandı. Geçiş vakum altında yapıldı. Bu şekilde geçiş kısa bir süre içinde temin edilmiş oldu.

Her iki kolon muhteviyatının denen maddeleri, Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrini bünyesinde alı koyup koymadığının araştırılması için bu maddelerle hazırlanan solüsyonlar tek tek ve karışım halinde (hepsi bir arada) iken hazırlanan kolonlardan geçirildi. Her iki kolondan geçtikten sonra elde edilen asit-sulu sıvı, Stas-Otto toksikolojik analiz metodu basamakları gereğince, asit-sulu ortam kloroformla ve kalevi-sulu ortam eterle ekstraksiyona tabi tutuldu ve organik eritkenlerin (kloroformlu ve eterli ekstraktın) bahse konu maddeleri ihtiva ettikleri, maddelere has renk reaksiyonları ile kontrol edildi. Maddelere ait renk reaksiyonları ile mevcudiyetleri tespit olundu.

Yukarıda bildirilen denemelerden sonra, çalışmamızda kullanılan analiz nümüneleri üzerine çeşitli ilâçlar, örneğin Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrin - (her birisinden 500 mg. lık miktarlar) -katıldı ve homojen bir karışım haline getirilen numüneler



Şekil: 2

Stas-Otto metodu ile analize tabi tutuldu. Bu usül yönünden gerekli olan basamaklar (1) takip edilerek elde olunan renkli, berrak asit-sulu sıvı yukarıda isimleri bildirilen maddelerle hazırlanan 1 ve 2 numaralı kolonlardan ayrı ayrı olarak geçirildi. Elde edilen asit-sulu sıvının tamamen renksiz, berrak olduğu görüldü. Fakat, renkli, berrak asit-sulu sıvının Selaytla hazırlanan 1 numaralı kolondan geçirilmesinde: Stas-Otto usulü ile alkolle yapılan ekstraksiyon esnasında husule gelen ekstraktif renklerin Selayt tarafından tutulduğu, elde edilen sıvının renksiz, berrak olduğu, fakat başlangıçta konan miktar kadar asit-sulu sıvının elde edilmediği ve 10 cc. lik miktarın kolon muhteviyatı Selayt tarafından tutulmuş olduğu ve bu miktarın elde edilmesi için kolona damıtık su ilâvesinde, tutulmuş bulunan ekstraktif renklerin, elde edilen renksiz, berrak asit-sulu sıvıya karıştığı ve kolon muhteviyatının bulamaç haline girdiği görüldü. Halbuki 2 nolu kolonda bu mahsurlar görülmedi.

Her iki kolondan elde olunan renksiz, berrak asit-sulu sıvı Stas-Otto toksikolojik analiz metodu basamakları gereğince, asit-sulu ortam ilk önce kloroformla ekstraksiyona tabi tutuldu. Sonra asit-sulu ortam % 10 luk sodyum hidroksit mahlülü ile kalevi yapıldı ve kalevi -sulu ortamın eterle ekstraksiyonu yapıldı. Organik eritken-

lerin bahse konu maddeleri ihtiva ettikleri, maddelere has renk reaksiyonları ile kontrol edildi. Maddelere ait özel renk reaksiyonları ile mevcudiyetleri tespit edildi (34, 42, 45).

Denenen ilâçların sudaki mahlülleri ile, ilâçların katıldığı analiz meteryalinin Stas-Otto usulü ile yapılan analizinde elde edilen renkli, berrak asit-sulu sıvının 1 numaralı kolondan geçirilmesi esnasında, kolon muhteviyatının hazırlanmasında kullanılan karbon tetraklorürün bünyesine müessir maddeleri alıp almadığı araştırıldı. Asit-sulu sıvının kolondan geçerken birlikte sürüklediği karbon tetraklorür biriktirme balonunda toplandı. İki tabaka halindeki renksiz, berrak karışım bir ayırma hunisi içine kondu. İki ortam birbirinden ayrılınca, alt kısımda biriken 30 cc. lik karbon tetraklorür ayırma hubisinin musluğu yardımıyla asit-sulu sıvıdan separe edildi. Separe edilen bu karbon tetraklorür süzülerek cam kapaklı bir şişe içerisine alındı. Porselen kapsüller içerisinde su hamamı üzerinde uçuruldu ve alkaloitler arandı. Tatbik edilen renk reaksiyonları sonunda (Müreksit Reaksiyonu ile) karbon tetraklorürün Kafeyin ihtiva ettiği tespit olundu.

Denemelerimiz esnasında tespit olunan bu hususun teyidi için aşağıdaki deneme yapıldı. 10 cc. şırıngalık kafeyin mahlülü alındı ve damıtık su ile 50 cc. ye ulaştırıldı. Üzerine bir damla sülfürik asit ilâve edildi. Bu karışım bir ayırma hunisi içine kondu ve 30 cc. karbon tetraklorür ile kuvvetlice 2 - 3 defa çalkalandı. İki ortam tamamıyla birbirinden ayrıldıktan sonra, karbon tetraklorür tabakası huninin alt kısmından süzülerek beyaz bir porselen kapsül içine alındı: Ayırma hunisi içinde kalan asit-sulu sıvı bu defa 30 cc. kloroformla ekstraksiyona tabi tutuldu. İki ortam tamamıyla birbirinden ayrılınca, kloroformlu ekstrakt başka bir porselen kapsül içine süzülerek alındı. Her iki kapsül muhteviyatı su hamamı üzerinde uçuruldu. Kalıntılar üzerine Müreksit Reaksiyonu tatbik edildi. Her iki porselen kapsül içindeki kalıntının Kafeyin olduğu görüldü. *SONUÇ: Asit ortamda karbon tetraklorür ile yapılan ekstraksiyonda KAFEYİNİN karbon tetraklorüre geçmekte olduğu bu denememizlede tespit olundu. Bu şekilde literatürde rastlayamadığımız bir sonuca varmış bulunuyoruz.*

Sonuçlar

1 - Materyal ve metot kısmında bildirilen analiz materyali üzerine Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrin katıldıktan sonra homojen bir karışım haline getirilen numüneler Stas-Otto

toksikolojik analiz metodu ile muayene edildi. Bu usul yönünden gerekli olan basamaklar takip edilerek elde olunan renkli, berrak asit-sulu sıvının Selayt No. 545 ile hazırlanan 1 numaralı kolondan geçirilmesinde: ekstraktif renklerin selayt tarafından tutulduğu ve elde edilen sıvının renksiz ve berrak olduğu görüldü. Yalnız kolona konan miktar kadar asit-sulu sıvı elde edilemedi. 10 cc. lik miktarın kolondaki selayt tarafından tutulmuş olduğu ve bu miktarın elde edilmesi için kolona damıtık su ilâvesinde, tutulmuş bulunan ekstraktif renklerin, renksiz, berrak asit-sulu sıvıya karıştığı ve kromatografik tüp içindeki seperasyon kolonunun bulamaç haline girdiği görüldü. Tekrarlanan denemeler sonunda, Selaytla hazırlanan 1 Numaralı kolonun, ekstraktif renklerin giderilmesi yönünden pratik olamayacağı kanısına varıldı.

2 - STAS-OTTO analiz metodu basamakları uygulanarak elde olunan renkli, berrak asit-sulu sıvı ve denenen ilâçların sudaki solüsyonlarının 1 Numaralı kolondan geçirilmesi esnasında, Kafeyinin bir kısmının kolon muhteviyatının hazırlanmasında kullanılan karbon tetraklorüre geçmekte olduğu görüldü. Bu gözlem materyal ve metot kısmında bildirilen deneme ile tarafımızdan teyit edildi.

3 - İçerisinde Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrin bulunan sulu solüsyonlar 2 numaralı kolondan geçirildikte : Alüminyum Oksit Aktif Asidin bu maddeleri bünyesinde alı koymadığı, elde edilen (konan miktar kadar) asit-sulu sıvının Stas-Otto usulü basamakları gereğince organik eritkenlerle yapılan ekstraksiyonları sonunda, kloroformlu ve eterli ekstraktın uçurulmasından sonra tatbik edilen renk reaksiyonları ile bildirilen maddelerin tespiti sonucu anlaşıldı.

4 - Materyal ve metot kısmında bildirilen kıyılmış organ parçalarından ibaret analiz materyali üzerine isimleri bildirilen ilâçların katılması ile elde olunan materyal STAS-OTTO muayene tekniği ile analize tabi tutuldu. Elde olunan renkli, berrak asit-sulu sıvının 2 Numaralı kolondan geçirilmesinde: ekstraktif renklerin kolon muhteviyatı tarafından tamamiyle tutulduğu ve elde olunan sıvının renksiz, berrak olduğu görüldü. Kolona konan ilk miktar kadar asit-sulu sıvı elde edildi. Asit-sulu sıvının kolondan geçirilişi vakum altında kısa bir süre içinde sağlandı. Elde olunan renksiz, berrak sıvı asit reaksiyonlu iken kloroformla ve kalevi reaksiyonlu yapıldıktan sonra eterle ekstraksiyona tabi tutuldu. İsimleri bildirilen maddelere ait renk reaksiyonları ile kloroformlu ekstraktın Antipirin, Asetanilit, Fenasetin ve Kafeyin, eterli ekstraktın ise: Atropin sülfat, Brüsin,

Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrin ihtiva ettiği tespit olundu.

Tartışma

STAS-OTTO usulü ile yapılan analizlerde, uygulanan muhtelif basamaklar esnasında (zehirlerin tecridi ve saflaştırılması) proteinli maddeler, yağ, reçineli cisimler ortamdaki giderilmekte, fakat alkolle ekstraksiyonda, muhtelif doku ve mide muhteviyatı maddelerinden ekstrakte olan ekstraktif renkler nihayi asit-sulu sıvıda kalmaktadır. Bu ekstraktif renkler, asit-sulu sıvının kloroformla yapılan ekstraksiyonunda kloroformlu ekstrakta geçmekte ve kloroformlu ekstraktın uçurulmasından sonra, zehirlerin tanınması bakımından tatbik edilen renk reaksiyonlarını maskeleymektedir.

STAS (36) "Alkaloitler üzerinde yapılacak mediko-legal araştırmalarda hayvani kömürün renkli sıvıların renksizleştirilmesinde kullanılmasına müracaat edilmemesini, zira hayvani kömür renkli ve kokulu maddeleri teksif ederken alkaloitleri de tutacağından, şüpheli sıvıda bulunan alkaloitlerin kaybına sebep olacağını" bildirmektedir.

Klâsik STAS-OTTO analiz metodu geçmişte olduğu gibi, bugün bile organik ve sentetik zehirlerin izolasyonu ve tanınması için baş vurulan ve kullanılan bir metottur (1, 11). Kürsümüzde de bu metod ile yıllarca analizler yapılmış ve yapılmaktadır. Kloroformlu ekstrakt içinde bulunan zehirlerin identifikasyonunda baş vurulacak renk reaksiyonlarını karıştıran ekstraktif renklerin giderilmesi bakımından elde olunan asit-sulu sıvı, Selayt ve Aluminyum Oksit Aktif asit ile hazırlanan kolonlardan geçirildi.

Selayt kromatografik çalışmalarda, kromatografik separasyonlarda kullanılan önemli bir kolon dayanak maddesidir (8). Fakat selayt ve diğer tesirsiz dayanak maddeleri toksikolojik çalışmalardan ziyade bitki ekstraktları ve ilaç preparatları içinde bulunan maddelerin bölümsel kromatografik ayrılması çalışmalarında faydalıdır (16). KLOHS, DRAPPER, KELLER ve PETRACEK (23) asit selayt kolonunu *Rauwolfia canescens*'den Reserpinin separasyonunda kullanmışlardır. Bundan başka HEUERMAN ve LEVINE (21) tampona edilmiş selayt kolonunu Kodein, Kafeyin ve Antihistaminik ilaçları ayırmada kullanmışlar ve elde ettikleri kısımlarda spektrofotometre ile bu ilaçların mevcudiyetini tespit etmişlerdir. SCHILL ve AGREN (32) kısımlara ayırma kromatografiyi belladon preparatlarının tayininde kullanmışlardır.

Biz bu çalışmamız ile, Selayt (Celite) No. 545 ile hazırladığımız 1 Numaralı kolonu: ekstraktif renklerin tutulması ve neticede kolona konan renkli, berrak asit-sulu sıvı miktarı kadar renksiz, berrak bir asit-sulu sıvı elde edilmesi bakımından maksada uygun bulamadık.

Renkli, berrak asit-sulu sıvının 1 Numaralı kolondan geçirilmesi esnasında ortamda bulunan Kafeyinin bir kısmının kolon muhtevi yatının hazırlanmasında kullanılan karbon tetraklorüre geçmekte olduğunu gördük.

Halbuki elde olunan renkli, berrak asit-sulu sıvının Alüminyum Oksit Aktif asit ile hazırlanan kolondan geçirilmesinde: ekstraktif renklerin tutulması ile tamamiyle pürifiye edilmiş ve kolondan geçirilen miktarda renksiz, berrak asit-sulu sıvı elde ettik. Bu elde edilen asit-sulu sıvı kloroformla ekstraksiyona tabi tutuldu ve kloroformlu ekstraktın uçurulmasından sonra, renksiz kalıntılar üzerinde renk reaksiyonlarının tatbik edilebilme olanağı sağlandı.

Özet

Klâsik STAS-OTTO toksikolojik metodunun icabı olan gerekli basamaklar takip edilerek, organik eritkenlerle ekstraksiyona hazır duruma getirilen asit-sulu sıvının kloroformla yapılan ekstraksiyonunda kloroforma geçerek, tatbik edilen renk reaksiyonlarını maskeleyen ekstraktif renklerin giderilmesi için yaptığımız bu çalışma sonunda:

1 - Selayt (Celite) No. 545 ile hazırlanan 1 Numaralı kromatografik separasyon kolonunun, ekstraktif renklerin separasyonu bakımından maksada uygun olmadığını

2 - Çalışmalarımız esnasında yaptığımız ek deneme sonunda: Kafeyin ihtiva eden asit-sulu sıvının karbon tetraklorür ile yapılan ekstraksiyonunda, ortamda bulunan Kafeyinin bir kısmının karbon tetraklorür geçmekte olduğunu

3 - Alüminyum Oksit Aktif asit ile hazırlanan 2 Numaralı Kolonun, ekstraktif renklerin separasyonu bakımından maksada uygun olduğunu

4 - Renkli, berrak asit-sulu sıvının 2 Numaralı kolondan geçirilmesi esnasında, denenen maddelerin Antipirin, Asetanilit, Atropin sülfat, Brüsin, Fenasetin, Kafeyin, Kokain hidroklorat, Striknin sülfat ve Veratrinin Alüminyum Oksit Aktif asit tarafından tutulmadığının elde olunan renksiz, berrak asit-sulu sıvının kloroform ve eterle yapılan ekstraksiyonunda elde olunan kloroformlu ve eterli ekstraktın uçurulması sonunda tatbik edilen renk reaksiyonları ile tespit edildiğini

5 - Renk reaksiyonlarını maskeleyen ekstraktif renklerin ortamdaki separasyonu bakımından, elde olunan nihai asit-sulu sıvının kloroformla ekstraksiyonu yapılmadan önce Alüminyum Oksit Aktif asit ile hazırlanan 2 Numaralı kolondan geçirilmesinin zehirlerin identifikasyonu bakımından gerekli olan renk reaksiyonlarının güvenilir bir tarzda renksiz kalıntılar üzerine tatbik olanağını sağlamış olduğunu tespit etmiş bulunuyoruz.

Summary

Investigations of the Separation of the Extractive Colors which Interfere with the Color Reactions in the Identification of Poisons by the Classical STAS-OTTO Toxicological Analytical Method:

For the identification of a poison, it should be obtained in a relative state of purity which gives its specific color, crystal, or precipitation reactions with the test chemicals.

One of the disadvantages of the Classical STAS-OTTO analytical procedure is the difficulty of obtaining clear-cut purification and separation of poisons (18, 19). However, the STAS-OTTO method is still used in the separation of alkaloids and related bases (1, 11).

The following drugs, such as Antipyrine, Acetanilid, Atropine sulfate, Brucine, Caffeine, Cocaine hydrochloride, Phenacetin (Acetophenetidin), Strychnine sulfate and Veratrine were used in our experiments. 500 mg. of each of these drugs were added to the minced specimens such as organs and stomach contents, and placed in a flask of suitable size. A sufficient amount of alcohol was added, and the mixture was acidified with 5 per cent tartaric acid solution and analyzed by the Classical STAS-OTTO method.

Although the final aqueous acid solution was freed from its fats, resins and proteins, it still contained extractive colors which interfere with subsequent identification procedure by color reactions with the test chemicals. In order to separate the extractive colors from the aqueous acid solution two different chromatographic columns were used in our experiments.

Celite No. 545 was used for preparing Column Number 1, and Aluminium Oxide active, acidic for chromatography for Column Number 2. Column Number 1 was prepared with the chemicals as shown in the following formula.

- 30 gram Celite No. 545
- 9 ml. Sulfuric acid C.P.
- 9 ml. Fuming Sulfuric acid 15 per cent
- 120 ml. Carbon tetrachloride C. P.

The other Column, Column Number 2 was prepared with Aluminium Oxide active, acidic for chromatography. 30 gram Aluminium Oxide active, acidic and 15 ml. distilled water was used for each column.

Packing of the column tubes requires a special procedure, since satisfactory results are not usually obtained if the chromatogram tubes are simply filled slurry.

After the separation of extractive colors from the aqueous acid solution the solvent-extraction steps were efficiently accomplished by using liquid-liquid extractors with a capacity of 50 ml. of aqueous solution. In each group 90 ml. solvent was used. However, a simple shaking procedure was also used by employing three 30 ml. portions of solvent. The aqueous acid solution was extracted three times with chloroform. The remaining aqueous acid solution after the chloroform extraction was made alkaline with 10 per cent sodium hydroxide solution and re-extracted with ether. Practically all the free alkaloids were extracted with ether in this step.

The identification of the drugs present in the eluates were accomplished by color reactions with the chemical tests. Caffeine, Acetanilid, Antipyrine and Phenacetine extracted from the aqueous acid solution with chloroform, and Veratrine, Brucine, Atropine sulfate, Cocaine hydrochloride and Strychnine sulfate extracted from the aqueous alkaline solution with ether were identified with color reactions by chemical tests.

This procedure for the separation of the extractive colors from the final aqueous acid solution that obtained in the Classical STAS-OTTO analytical method was first employed by us.

The results reported in this paper indicate that Column Number 2 was found very convenient for the separation of extractive colors from the final aqueous acid solution, but Column Number 1 was not.

LİTERATÜR

- 1 - **Akman, M. Ş.** (1967): *Genel Toksikoloji*. Ank. Üniv. Vet. Fakültesi Yayınları: 217, Ders Kitabı: 119, Ank. Üniversitesi Basımevi, Ankara, S. 1-159

- 2 - **Antonides, H. J., and Jefferis, F. C.** (1955): *Toxicology in the Far East Command*. U.S. Armed Forces Med. J. 6, 1564-1575
- 3 - **Bamford, F.** (1951): "*Poisons, Their Isolation and Identification*". 3 rd. ed. pp. 151-167, Churchill, London.
- 4 - **Beroza, M.** (1950): *Chromatographic Separation Employing Ultraviolet Absorbency Rations*. Anal. Chem. 22, 1507-1510
- 5 - **Bürgin, A.** (1952): *De Quelques Modifications Pratiques Appor-tees au Procede d'Analyse de STAS-OTTO*. J. Pharm. Belg. 7, 3-9
- 6 - **Carless, J. E.** (1953): *The Separation of Alkaloids by Paper Partition Chromatography. Part III. The Assay of Ergot*. J. Pharm. and Pharmacol. 5, 883-897
- 7 - **Chilton, J., and Partridge, M. W.** (1950): *The Partition Chromatography of Alkaloids. Part III. The Alkaloids of PUNICA GRANATUM*. J. Pharm. and Pharmacol. 2, 784-795
- 8 - **Consden, R.** (1960): *Chromatographic Methods*. In "*Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods*". (STEWART, C.P, and STOLMAN, A. eds) Vol. 1, pp. 303-352, Academic Press. New York and London. P. 1-774
- 9 - **Cox, D. H.** (1957): *Isolation and Identification of Strychnine and other Alkaloids in Veterinary Toxicology*. Am. J. Vet. Research 18, No. 69, 929-931
- 10 - **Curry, A. S.** (1955): *Toxicological Analysis*. J. Pharm. and Pharmacol. 7, 969-989
- 11 - **Curry, A. S.** (1960): *Outline of a Systematic Search for an Unknown Poison in Viscera*. In "*Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods*". (STEWART, C. P. ,and STOLMAN, A. eds) Vol. 1, pp. 257-284. Academic Press, New York and London. P. 1-774
- 12 - **Davidow, B.** (1950): *Isolation of DDT from Fats*. Jour. Assoc. Off. Agric. Chem. 33, 130
- 13 - **Evans, W. C., and Partridge, M. W.** (1948): *The Partition Chromatography of Alkaloids. Part I. Solanaceous Alkaloids*. Quart J. Pharm. and Pharmacol. 21, 126-140.
- 14 - **Evans, W. C. and Partridge, M. W.** (1949): *The Partition Chromatography of Alkaloids. Part II. The Alkaloids of Australian Datura Ferox and of Indiane Henbane*. J. Pharm. and Pharmacol. 1, 593-598.
- 15 - **Evans, W. C. and Partridge, M.W.** (1952): *The Partition Chromatography of Alkaloids. Part IV. The Assay of Solanaceous Drugs*. J. Pharm. and Pharmacol. 4, 769-780.

- 16 - **Farmilo, C. G., and Genest, K.** (1961): *Alkaloids and Related Bases: Identification*. In "Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods". (Stewart, C. P., and Stolman, A. eds) Vol. 2, pp. 209-596. Academic Press, New York and London, 1961. P. 1-921.
- 17 - **Feldstein, M., and Klendshoj, N. C.** (1953): *The Analysis of "General Unknowns" in Toxicology*. Analyst 78, 43-47.
- 18 - **Freimuth, H. C.** (1960): *Isolation and Separation of Poisons from Biological Material*. In "Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods". (Stewart, C. P., and Stolman, A. eds) Vol. 1, pp. 293-302. Academic Press, New York and London, 1960, P. 1-774.
- 19 - **Freimuth, H. C.** (1963): *Isolation and Separation Techniques for Identification of Poisons*. In "Progress in Chemical Toxicology". (Stolman, A. ed.) Vol. 1, pp. 1-9. Academic Press, Newyork London, P. 1-436
- 20 - **Goldbaum, L. R., and Williams, M. A.** (1959): *Procedure for the Rapid Isolation of Basic Drugs from Tissue and Their Subsequent Purification and Identification*. J. Forensic Sci. 4, 144-152.
- 21 - **Heuermann, R. F., and Levine, J.** (1958): *The Analysis of Combinations of Acetylsalicylic Acid, Acetophenetidin, and Caffeine with Other Drugs*. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 47, 276-280.
- 22 - **Kirk, P. L.** (1955): *Toxicology (Isolation, Identification and Determination of Poisons)*. Ann. Rev. Med. 6, 285-304.
- 23 - **Klohs, M. W., Drapper, M. P., Keller, F. and Petracek, F. J.** (1954): *The Isolation of Reserpine from Rauwolfia canescens Linn.* J. Am. Chem. Soc. 76, 1381.
- 24 - **Leopold, I. H.** (1950): *Pharmacology and Toxicology. Review of the Literature*. A. M. A. Arch. Ophthalmol. 44, 300-348.
- 25 - **Leopold, I. H.** (1952): *Pharmacology and Toxicology*. A. M. A. Arch. Ophthalmol. 48, 163-261.
- 26 - **Morgan, P. J.** (1959): *A Method for the Rapid Detection of Small Concentrations of Organic Bases in Urine*. Analyst 84, 418-422.
- 27 - **Nicholls, J. R.** (1954): *Some Applications of the Newer Techniques in Analytical Chemistry*. Analyst 79, 251.
- 28 - **Otto, F. J.** (1856): *Zur Ausmittelung der Gifte*. Liebigs Annalen 100, 39-52.

- 29 - **Özkazanç, A. N.** (1962): *Per os akut Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane (DDT) Zehirlenmesinde Mide-barsak Muhteviyatı ile İç Organlardan DDT'nin Kimyasal Yolla Tayini Üzerinde Araştırma.* Ank. Üniv. Vet. Fakültesi Yayınları: 142, Çalışmalar: 82, Rüzgârlı Matbaa, Ankara, S. 1-58.
- 30 - **Preuss, F. R.** (1955): *Über die Elektrodialytische Bestimmung Kleinster Alkaloid mengen aus Blut.* Arch. Pharm. 288, 195-203.
- 31 - **Roche, G. W., Wright, H. N.** (1953): *Systematic Toxicological Analysis by Spectrophotometric Methods. I. Nonalkaloidal Organic Compounds.* Arch. Ind. Hyg. Occupational Med. 8, 507-515.
- 32 - **Schill, G., and Agren, A.** (1951): *Morotspulver som Pillerkonstituens.* Svenks Farm. Tidskr. 55, 479-483.
- 33 - **Schwartz, H., and Posnick, P.** (1959): *Extraction of Alkaloids from Tissue.* J. Forensic. Sci. 4, 153-155.
- 34 - **Smith, C. S., and Carson, G. B.** (1957): *A Laboratory Manuel of Analytical Toxicology.* Depart. of Physiological Chemistry and Pharmacology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A. P. 1-74.
- 35 - **Smyth, H. F.** (1953): *Toxicology.* Ann. Rev. Med. 4, 349-362.
- 36 - **Stas, J.** (1851): *Considérations sur une Méthode Générale Propre a déceler les alcalis Organiques dans les Cas d'empoisonnement.* J. Bull. Acad. Royale Med. Belgique, Bruxelles (1), 11, 304-315.
- 37 - **Stas, J.** (1852): *Ueber die Auffindung und Erkennung Organischer Basen in Vergiftungsfallen.* Liebigs Annalen 84, 379-385.
- 38 - **Stewart, C. P., and Stolman, A.** (1960): *The Toxicologist and His Work.* In "Toxicology, Mechanisms and Analytical Method" (Stewart, C. P., and Stolman, A. eds) Vol. 1, pp. 1-25. Academic Press, New York and London, 1960, P. 1-774.
- 39 - **Stolyarov, K. P.** (1952): *Use of Ultraviolet rays in Analytical Chemistry.* Zhurnal analiticheskvi khimii 7, 221, In Chem. Abstr. 48, 4355.
- 40 - **Stolyarov, K. P.** (1953): *Use of Ultraviolet rays in analytical Chemistry. II. Qualitative micro-chemical analysis with ultraviolet rays.* Chem. Tech. (Berlin) 5, 433-436. In Chem. Abstr. 48, 5712 g.
- 41 - **Street, H. V.** (1962): *The Simultaneous Detection of Alkaloid, Neutral and Acidic Poisons in Human Tissues by High Temperature Reversed Phase Paper Chromatography.* J. Forensic Sci. 7, 222-230.

- 42 - **Thienes, C. L., and Haley, T. J.** (1964): *Clinical Toxicology*. Fourth Edition. Lea and Febiger. Philadelphia, P. 1-661
- 43 - **Tompsett, S. L.** (1961): *The Separation of Alkaloids from Extracts of Animal Tissues, the Use of Cation Exchange Resins*. Acta Pharmacol. Toxicol. 18, 414-418.
- 44 - **Turfitt, G. F.** (1951): *Recent Advances in Toxicological Analysis*. J. Pharm and Pharmacol. 3, 321-337.
- 45 - **Yeğül, F. F.** (1945): *Toksikoloji*. 2 ci Baskı T.C. Tarım Bakanlığı Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü Ders Kitabı: 28, Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü Basımevi, S. 1-160.

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna,, 8.10. 1968 günü gelmiştir.