

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Брянский государственный аграрный университет»**

**Кафедра химии, биотехнологии
и физиологии растений**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К
ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

Брянск 2015

УДК 577 (075.8)
ББК 28.077 73

Талызина Т.Л., Талызин В.В. Методические указания к лабораторным занятиям по токсикологической химии (издание 2-е перераб. и доп.). - Брянск: Изд-во Брянской ГСХА, 2015.- 67 с.

Методические указания содержат экспериментальные работы по основным разделам дисциплины «Токсикологическая химия».

Пособие составлено в соответствии со стандартами ФГОС 3+ и предназначено для студентов, осваивающих образовательные программы специалитета 36.05.01. «Ветеринария» и бакалавриата направление подготовки 19.03.03 «Продукты питания животного происхождения».

Рецензент:

Крапивина Е.В. – д.б.н., профессор, заведующая кафедрой эпизоотологии, микробиологии, паразитологии и ветсанэкспертизы БГАУ

Рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии от 31 августа 2015г, протокол № 1.

© Брянский ГАУ, 2015
© Талызина Т.Л., 2015
© Талызин В.В., 2015

Правила безопасной работы в лаборатории

Основные меры предосторожности

1. Работа в лаборатории только в отведенное для этого время, под контролем преподавателя
2. Работать только в рабочем халате. При необходимости (работа с летучими и агрессивными веществами) надевать защитные очки.
3. Не принимать пищу, не пить и не курить в лаборатории.

Общие меры предосторожности

1. Не нагревайте, не смешивайте, не лейте и не взбалтывайте реактивы вблизи лица. Всегда направляйте отверстие химического сосуда в сторону, противоположную от лица и тела.

2. Никогда не засасывайте жидкость в пипетку ртом, всегда пользуйтесь грушей или специальным приспособлением для наполнения пипеток.

3. Будьте осторожны при работе с сильными кислотами или щелочами, особенно при нагревании. Никогда не добавляйте воду к концентрированным кислотам или щелочам.

4. С материалами, выделяющими вредные пары, следует работать только в вытяжном шкафу, надевая защитные перчатки. К таким материалам относятся галогениды фосфора, бром, все хлорангидриды кислот, уксусный ангидрид, дымящая азотная кислота, концентрированный раствор аммиака, жидкий аммиак, диоксид серы и другие.

5. Не сливайте органические растворители или другие органические вещества в раковину. Отработанные растворители следует выливать в специальные приемники; другие остатки удаляют согласно инструкции.

6. Большинство органических растворителей и многие другие органические жидкости летучи и легко воспламеняются. Некоторые из них при контакте с воздухом образуют взрывчатые пероксиды. В связи с этим:

- не нагревайте органические жидкости, даже в малых количествах, на открытом огне или рядом с ним. Для этого пользуйтесь водяной или масляной баней, а также электронагревателем. Особая осторожность необходима при работе с эфиром, петролейным эфиром и сероуглеродом, которые очень летучи и имеют низкие температуры вспышки.

- не нагревайте органические жидкости в открытом сосуде. Обязательно установите холодильник - либо обратный, либо прямой для отгонки. Для выпаривания используйте либо роторный испаритель, либо отгонку.

- никогда не нагревайте закрытую систему любого типа.

- перед использованием эфира (или любого другого летучего легковоспламеняющегося растворителя), удостоверьтесь, что поблизости нет открытого огня или других источников возгорания (ваших или вашего соседа). Безопаснее проводить работу под вытяжным шкафом, чем за лабораторным столом.

7. Приступайте к выполнению лабораторной работы после предварительной теоретической подготовки, внимательно прочитав методику анализа лекарственного средства.

Лабораторная работа № 1

Предварительные испытания объектов химико-токсикологического анализа

Цель занятия: Освоение основных методов и подходов, используемых при проведении предварительных испытаний химико-токсикологического анализа. Первичное исследование биоматериала.

Теоретическое введение

Химико-токсикологический анализ (ХТА) – это совокупность научно обоснованных методов, применяемых на практике для обнаружения и количественного определения ядовитых и сильнодействующих веществ, их метаболитов в биопробах живых лиц, в трупном материале и в вещественных доказательствах отравления.

ХТА характеризуется разнообразием объектов исследования, содержащих незначительные количества токсических веществ. Эти вещества являются микрокомпонентами в большом количестве биоматериала.

ХТА начинается, как правило, с ознакомления с материалами дела и составления плана исследования. Особенно велико значение заранее продуманного плана исследования при судебно-химических анализах различных вещественных доказательств.

План ХТА определяется:

- Поставленными вопросами;
- Данными препроводительных документов;
- Наружным осмотром объектов исследования.

Для составления плана химико–токсикологического анализа большое значение имеют результаты предварительных испытаний.

Положительный результат предварительных испытаний указывает на то, что в исследуемом объекте может быть предполагаемое вещество или группа веществ. Но на основании только предварительных проб судебный эксперт не в праве делать заключение о наличии предполагаемого токсического вещества в исследуемом объекте. При положительном результате предварительных испытаний на токсические вещества они включаются в план химико–токсикологического анализа. При отрицательном результате предварительных проб на соответствующие вещества дальнейшее исследование не проводят.

Объектами (биопробами) ХТА являются кровь, спинномозговая жидкость, моча, рвотные массы, промывные воды желудка, а также связанные с отравлением вещественные доказательства: лекарственные

препараты, растительные объекты, органические растворители, средства бытовой химии, остатки пищи, неизвестные жидкости и др.

Проведение предварительных испытаний позволяет более рационально расходовать исследуемый биологический материал или биожидкости, сократить время анализа. На основании результатов предварительных проб судебный химик может исключить ряд веществ из плана химико-токсикологического анализа и предположить, какие вещества могут быть в биологическом материале или биожидкостях.

Перед проведением предварительных испытаний ХТА необходимо изолировать исследуемое вещество из биологического материала. Изолирование, независимо от природы яда, производится экстракцией органическими растворителями при различных рН, реэкстракцией, дистилляцией или сорбцией.

Вторым этапом после изолирования является качественное определение токсиканта химическими реакциями или физико-химическими методами. При ХТА предварительным испытаниям могут быть подвергнуты жидкости и порошки неизвестного состава, таблетки неизвестных лекарственных средств, объекты растительного происхождения, ткани и жидкости человека.

Задание 1. Определение рН среды.

Для определения рН среды небольшое количество объекта измельчают, вносят в чашку с дистиллированной с водой, хорошо перемешивают. Затем часть водной вытяжки *стеклянной палочкой* наносят на универсальную индикаторную бумагу или красную и синюю лакмусовые бумажки. Параллельно ставят контрольный опыт с дистиллированной водой.

Покраснение синего лакмуса свидетельствует о кислой реакции среды. При кислой реакции среды необходимо провести исследование с красной бумагой Конго. Посинение красной бумаги Конго свидетельствует о наличии минеральных или органических кислот, введенных извне. Для уточнения характера кислоты водную вытяжку разбавляют в 5-10 раз и вновь исследуют с помощью красной бумаги Конго. При отравлении минеральными кислотами бумага Конго синеет, а в случае органических кислот – не меняет своей окраски. Следует помнить, что слабокислую реакцию среды могут иметь объекты, подвергшиеся кислотному брожению, а также объекты, содержащие малые количества органических кислот.

Посинение красного лакмуса свидетельствует о щелочной реакции среды. Для решения вопроса о наличии едкой или карбонатной щелочи в объекте проводят дополнительное исследование: при добавлении к 1 мл водного извлечения капли спиртового раствора фенолфталеина наблюдается

розовое или красное окрашивание. К окрашенной жидкости при взбалтывании добавляют 3-5 капель 10% раствора бария хлорида. При наличии в водном извлечении едкой щелочи окраска фенолфталеина не исчезает, в случае наличия карбонатной щелочи – окраска исчезает, появляется белый осадок кальция карбоната.

Для определения аммиака часть водной вытяжки после обработки её избытком раствора хлорида бария наносят на красную лакмусовую бумажку. Если посиневшая бумажка через некоторое время (20-30 минут) на воздухе принимает первоначальную окраску (розовеет), делают заключение о наличии аммиака. *Испытание на аммиак проводят только при отсутствии едкой или карбонатной щелочи.*

Задание 2. Определение свежести биоматериала

Часть объекта помещают в коническую колбу на 50 мл, отверстие колбы закрывают пробкой, под которую прикрепляют три бумажки: красную лакмусовую бумажку, смоченную водой; бумажку, смоченную щелочным раствором свинца ацетата; бумажку, смоченную раствором меди сульфата. Колбу оставляют на определенное время (2-3 часа) и по реакции индикаторов судят о наличии аммиака или сероводорода. Если в исследуемом объекте содержится аммиак, то лакмусовая бумажка и бумажка, смоченная меди сульфатом, синеют, последняя – за счет образования меди аммиаката. Если в исследуемом объекте присутствуют сероводород, то бумажка, смоченная щелочным раствором свинца ацетата, чернеет.

Наличие в исследуемом объекте аммиака и сероводорода свидетельствует о процессах гниения, поэтому делать заключение об экзогенном поступлении аммиака нельзя!

Задание 3. Предварительные пробы для обнаружения метилового и этилового спиртов в моче.

✓ К 1 мл пробы (мочи) прибавляют 1 мл 10 % раствора бихромата калия в 50% растворе серной кислоты. Появление зеленого окрашивания указывает на наличие спирта в моче (проба не специфична).

✓ К 2 мл мочи прибавляют 1—2 капли 10% раствора натрия гидроксида, а затем несколько капель раствора йода в калия йодиде до появления стойкой желтой окраски. Затем смесь нагревают на водяной бане. Образование желтых кристаллов или появление специфического запаха йодоформа свидетельствует о том, что в моче содержится этиловый спирт. Этой реакции не мешает наличие метилового спирта. Ацетон дает такую же реакцию, как и этиловый спирт;

✓ В пробирку вносят 2 мл объекта и по каплям прибавляют 5%-й раствор калия перманганата до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться. Затем в пробирку по каплям прибавляют 10% раствор щавелевой кислоты до обесцвечивания раствора. После этого прибавляют еще одну каплю раствора щавелевой кислоты. К этой жидкости прибавляют 0,1 г хромотроповой кислоты и осторожно по стенкам пробирки (!) приливают 1,5 мл концентрированной серной кислоты с таким расчетом, чтобы кислота попала под мочу и не смешалась с ней. Появление красной или фиолетовой окраски на границе раздела двух жидкостей указывает на наличие метилового спирта в объекте.

Задание 4. Обнаружение ацетона.

В химико-токсикологическом анализе для обнаружения ацетона применяют реакции с растворами йода, натрия нитропруссид, фурфурола, о-нитробензальдегида и метод микродиффузии.

✓ При взаимодействии ацетона с раствором йода в щелочной среде образуется йодоформ (см. задание 3). Предел обнаружения: 0,1 мг ацетона в пробе.

✓ К 1 мл мочи прибавляют 1 мл 10% раствора натрия гидроксида и 5 капель свежеприготовленного 1% раствора натрия нитропруссид. При наличии ацетона в пробе появляется красная или оранжево-красная окраска. При добавлении 10% раствора уксусной кислоты до кислой реакции через несколько минут окраска переходит в красно-фиолетовую или вишнево-красную.

Задание 5. Анализ жидкости неизвестного состава.

✓ **Проба Бельштейна.** На конце медной проволоки сделать петлю и прокалить ее в пламени горелки до красного каления. Остывшую проволоку смочить исследуемой жидкостью и вновь внести в пламя горелки.

✓ **Проба Легалья.** 0,5 г сухого реактива (смесь порошков: натрия нитропруссид, натрия карбоната, аммония сульфата) смачивают 1 – 2 каплями воды и нанести на него 1 – 2 капли исследуемой жидкости. Наличие в пробе ацетона порошок окрашивается в розово-сиреневый цвет. При добавлении 1 капли 2 моль/л гидроксида натрия появляется красное окрашивание, усиливающееся (принимает вишнево-красный оттенок) при добавлении 1 капли 2 моль/л уксусной кислоты.

✓ **Проба с ванилин-серной кислотой.** На несколько капель жидкости в пробирке наслаивают 0,5 мл реактива, затем по стенке приливают 1 мл воды.

✓ **Проба с пикриновой кислотой.** 1 мл анализируемой пробы встряхивают с несколькими кристаллами пикриновой кислоты. Наблюдают эффект реакции.

✓ **Проба с 5% раствором меди сульфата.** В пробирку вносят 10 капель 5% раствора сульфата меди, 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и 10 капель исследуемой жидкости, предварительно разбавленной водой с соотношении 1:3.

Вопросы для самоподготовки

1. Какое значение имеют предварительные пробы при составлении плана ХТА?
2. Какое заключение делает эксперт-химик, если при исследовании биологического материала реакция среды была кислой? Как определить характер кислоты, введенной извне (минеральная или органическая)?
3. Как определить характер щелочи (едкая или карбонатная) при щелочной реакции среды?
4. Как проводится исследование на наличие аммиака в объекте?
5. Как определить свежесть биоматериала, поступившего на исследование?
6. Можно ли сделать заключение об отравлении аммиаком в случае одновременного обнаружения в биоматериале аммиака и сероводорода?
7. Как проводится предварительное исследование на этиловый и метиловый спирты в моче? Отметить специфичность проб.
8. Как проводится предварительное исследование на галогенопроизводные алифатического ряда? Зачем проводится контрольный опыт при проведении этих реакций?
9. Описать порядок предварительного исследования на наличие ацетона, всегда ли его можно использовать?

Лабораторная работа № 2

Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды»

Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром.

Алкилгалогениды

Задание 1. Провести выделение токсических веществ из биологического объекта.

Навеску измельченного биологического материала (20 г) смешивают с дистиллированной водой, подкисленной 10% раствором щавелевой кислоты до $\text{pH}=2$ по универсальному индикатору, до кашицеобразной консистенции, помещают в колбу на 300-500 мл. Колбу закрепляют на штативе, помещают в нагретую водяную баню и закрывают пробкой так, чтобы конец пароотводящей трубки доходил почти до дна колбы. Пароотводящую трубку присоединяют к холодильнику. Воду в парообразователе предварительно нагревают до кипения, присоединяют его к колбе, продолжают нагревание.

Дистилляцию проводят медленно. Дистиллят собирают в 2 приемника: 1 – с 3 мл 1% раствора натрия гидроксида (до 5 мл); 2 – в чистую сухую колбу – в объеме 30 мл.

После завершения процесса дистилляции, колбу для перегонки отсоединяют от парообразователя и только после этого прекращают нагрев парообразователя и колбы для перегонки.

Задание 2. Провести качественные реакции, указывающие на наличие алкилгалогенидов в дистилляте.

2.1. Реакция отщепления органически связанного галогена.

К 1-2 мл дистиллята прибавляют 1 мл 10 % спиртового раствора едкого натра и осторожно нагревают в пламени горелки в течение 2 – 3 минут. После охлаждения раствор подкисляют по лакмусу 10 % раствором азотной кислоты и смешивают с 0,5 мл 10 % раствора нитрата серебра.

2.2. Реакция образования изонитрила (выполнять только в вытяжном шкафу!)

К 1 мл дистиллята прибавляют 10 капель 10 % спиртового раствора натрия гидроксида, проверенного на отсутствие иона хлора и 1 каплю водного раствора анилина. Пробирку с раствором осторожно нагревают в течение 1- 2 минут. Об образовании изонитрила узнают по появлению характерного запаха.

Для разложения изонитрила содержимое пробирки немедленно кипятят с 10% раствором серной кислоты до уничтожения неприятного запаха.

2.3. Реакция с резорцином в щелочной среде.

К 1 мл дистиллята добавляют 1 мл 1 % свежеприготовленного раствора резорцина в 10 % водном растворе едкого натра. Параллельно в другой пробирке смешивают 1 мл дистиллированной воды и 1 мл реактива. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 – 10 минут. При наличии хлороформа возникает розовое или малиново-красное окрашивание. В параллельном опыте розового окрашивания наблюдаться не должно.

2.4. Реакция с реактивом Фелинга.

2 мл дистиллята смешивают с 2 мл 10 % раствора гидроксида натрия и 5 каплями реактива Фелинга. Смесь в пробирке осторожно нагревают на водяной бане. Появляется желтый осадок гидроксида меди (I), переходящий в осадок оксида меди (I) красного цвета.

Альтернативная реакция.

К 2 мл дистиллята добавляют 4 мл 10% раствора гидроксида натрия и 2 – 3 капли раствора сульфата меди (II) и осторожно нагревают на водяной бане. Появляется желтый осадок, переходящий в осадок красного цвета.

2.5. Реакция Фудживара.

К 2 — 3 мл дистиллята прибавляют 2 мл свежеперегнанного пиридина и 2 мл 10% раствора натрия гидроксида. Смесь нагревают на водяной бане в течение 2-3 минут. При наличии алкилгалогенидов в исследуемом растворе появляется желтая окраска.

2.6. Экстракция дистиллята эфиром для отличия хлоралгидрата от хлороформа

10 мл дистиллята экстрагируют равным объемом диэтилового эфира. Эфирное извлечение отделяют, фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и выпаривают извлечение при комнатной температуре досуха. Остаток в чашке растворяют в 2 мл воды и проводят реакции с резорцином, с реактивом Фелинга, с реактивом Несслера.

2.7. Реакция с реактивом Несслера.

К 1 мл дистиллята прибавляют 2 – 3 капли реактива Несслера и перемешивают. Образуется осадок кирпично-красного цвета, постепенно переходящий в грязно-зеленый.

2.8. Отщепление органически связанного хлора у 1,2-дихлорэтана.

В ампулу вместимостью 1 мл помещают 0,5 мл исследуемого раствора (дистиллята) и 0,5 мл 10% раствора карбоната натрия. Ампулу запаивают,

заворачивают в хлопчатобумажную ткань и погружают в водяную баню на 1 - 2 ч. По истечении времени ампулу извлекают, охлаждают при комнатной температуре и вскрывают. Содержимое ампулы делят на две части.

К первой части раствора прибавляют по каплям 10% раствор азотной кислоты до кислой реакции среды (по лакмусу) и 3 – 5 капель 1% раствора нитрита серебра. Появление белого творожистого осадка или мути, растворимой в избытке аммиака свидетельствует о наличии 1,2-дихлорэтана.

2.9. Образование этиленгликоля с дальнейшим окислением до формальдегида.

К оставшейся части содержимого ампулы (см. предыдущую реакцию) прибавляют по каплям 10% раствор серной кислоты до кислой реакции среды (по лакмусу) и 2 капли 5% раствора калия перйодата в 1 М растворе серной кислоты. Через 5 минут образующийся формальдегид обнаруживают по реакции с фуксинсернистой кислотой при $\text{pH} \leq 7$.

2.10. Реакция образования ацетиленида меди.

0,5 мл дистиллята вносят в ампулу с 0,5 мл 30% раствора натрия гидроксида, ампулу запаивают, нагревают в кипящей водяной бане в течение 1 часа, охлаждают, вскрывают, содержимое переносят в пробирку, добавляют 30% раствор уксусной кислоты до кислой реакции на лакмус. К полученной смеси добавляют 2 капли свежеприготовленного аммиачного раствора соли меди (I). Наблюдают эффект реакции.

2.11. Реакция с хинолином.

В пробирку вносят 0,2—0,3 мл свежеперегнанного хинолина, прибавляют каплю исследуемой жидкости или каплю этой жидкости в толуоле. Смесь нагревают на глицериновой бане (около 200°C) в течение 3—4 мин. Наблюдают эффект реакции.

2.12. Реакция с гидроксиаренами.

К 1 мл дистиллята (исследуемого раствора) добавляют 1 мл 10% раствора 1,3-дигидроксибензола, 1 мл 20% раствора гидроксида натрия и смесь нагревают на водяной бане при 80°C. В присутствии четыреххлористого углерода раствор приобретает красное окрашивание.

При применении 2,7-диоксинафталина появляется светло-бурая окраска, переходящая в зелено-желтую. При этой реакции хлороформ дает темно-красную окраску.

Задание 3. Провести количественное определение алкилгалогенидов методом аргентометрического титрования.

Отбирают 5 мл дистиллята, переносят его в коническую колбу 100 мл, прибавляют 10 мл 10 % спиртового раствора NaOH и осторожно нагревают на водяной бане в течение одного часа с обратным холодильником. После охлаждения раствор подкисляют по лакмусу 10 % раствором азотной кислоты до кислой реакции. Затем титруют образовавшийся хлорид натрия 0,1 М раствором нитрата серебра, используя в качестве индикатора 5% раствор хромата калия, до розового цвета.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание алкилгалогенида в % вычисляют по формуле:

$$C = \frac{T \cdot (V_{оп} - V_{кон}) \cdot K \cdot 100\%}{V_{дист}}$$

где: $V_{оп}$ – объем 0,1 М раствора нитрата серебра, израсходованного при титровании дистиллята, мл;

$V_{кон}$ – объем 0,1 М раствора нитрата серебра, израсходованного при контрольном опыте, мл,

K – поправочный коэффициент 0,1 М нитрата серебра,

T – титр 0,1 М раствора нитрата серебра по определяемому веществу, г/мл,

$V_{дист}$ – объем аликвотной части дистиллята, взятого для титрования, мл.

Лабораторная работа № 3

Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды»

Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром.

Кислородсодержащие соединения

Задание 1. Провести качественный анализ дистиллята на наличие кислородсодержащих соединений.

Формальдегид.

1. Реакция с резорцином в щелочной среде.

1 мл дистиллята смешивают с 1 мл 1 % раствора резорцина в 10 % растворе едкого натра. В другой пробирке (контрольный опыт) смешивают 1 мл воды с теми же реактивами. Обе пробирки в течение 3-5 минут нагревают

на водяной бане. Появление розового или малиново-красного окрашивания в дистилляте указывает на наличие формальдегида.

2. Реакция с фуксинсернистой кислотой (реактив Шиффа).

1 мл дистиллята смешивают с 2 – 3 каплями концентрированной серной или хлористоводородной кислоты и после охлаждения добавляют 0,5 мл раствора фуксинсернистой кислоты. Ожидают до 15 минут. При наличии формальдегида появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание.

3. Реакция с кодеином (морфином).

1 мл дистиллята смешивают в фарфоровой чашке с 5 мл концентрированной серной кислоты. После охлаждения в смесь вносят 0,02 – 0,03 г кодеина (морфина). При наличии формальдегида тотчас или через 5-15 минут происходит переход окраски раствора от красно-фиолетового до сине-фиолетового.

4. Реакция с хромотроповой кислотой (1,8-диоксинафталин-3,6-дисульфокислота).

К 1 мл дистиллята добавляют 0,2 мл 1% раствора хромотроповой кислоты в концентрированной серной кислоте, а затем прибавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и взбалтывают. Появление фиолетовой или красно-фиолетовой окраски указывает на наличие формальдегида.

5. Реакция с салициловой кислотой.

К 1 мл дистиллята прибавляют около 50 мг салициловой кислоты или салицилата натрия и 2 - 3 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку встряхивают и нагревают на водяной бане 2-3 мин. При наличии формальдегида появляется красное окрашивание.

6. Реакция с реактивом Фелинга. К 1 мл дистиллята добавляют 1 – 2 капли раствора едкого натра до щелочной реакции и 2 – 3 капли реактива Фелинга. Пробирку энергично встряхивают, а затем нагревают на пламени горелки. Образование желтого или красного осадка указывает на наличие формальдегида.

7. Реакция восстановления ионов серебра.

В пробирку, очищенную от жира, вносят 10 -15 капель 1 % раствора нитрата серебра и по каплям 10 % раствор аммиака с таким расчетом, чтобы образовавшийся вначале черный или бурый осадок оксида серебра едва растворился в избытке аммиака (4 -5 капель). К полученной жидкости добавляют 1 мл дистиллята, и смесь очень осторожно нагревают на водяной бане. При наличии формальдегида образуется «серебряное зеркало» или черный осадок (черная муть) металлического серебра.

Удаление формальдегида из дистиллята.

К дистилляту добавляют 4 мл 10% раствора нитрата серебра и 3% раствор гидроксида натрия до щелочной реакции среды. Смесь нагревают с обратным холодильником в течение 3 – 4 минут и перегоняют. Часть дистиллята, полученную после перегонки, проверяют на присутствие формальдегида с фуксинсернистой кислотой (выполнение реакции см. выше).

Ацетон.

1. Реакция образования йодоформа.

К 1 мл дистиллята приливают 1 мл 10 % раствора аммиака (или натрия гидроксида) и несколько капель раствора йода в йодиде калия до слабо-желтого окрашивания. При наличии ацетона даже без нагревания выделяется желтый осадок йодоформа с характерным запахом и характерной формой кристаллов при рассматривании под микроскопом.

2. Реакция с нитропруссидом натрия.

К 1 мл дистиллята добавляют 1 мл 10 % раствора едкого натра и 5 капель 1 % свежеприготовленного раствора нитропрусида натрия. При наличии ацетона сразу же появляется оранжево-красное окрашивание, которое при добавлении 10 % раствора уксусной кислоты до кислой реакции через некоторое время переходит в красно-фиолетовое и вишнево-красное.

3. Реакция с фурфуролом.

К 1 мл дистиллята добавляют 5 капель 1 % раствора фурфурола в 96 % этиловом спирте и 3 капли 10 % раствора натрия гидроксида. Через 3 – 5 минут к реакционной смеси добавляют 10 – 12 капель концентрированной соляной кислоты. При наличии ацетона появляется интенсивное красное окрашивание.

4. Реакция с о-нитробензальдегида

В пробирку вносят 3-5 капель дистиллята и каплю насыщенного раствора о-нитробензальдегида в 2 М растворе натрия гидроксида. Смесь слегка нагревают на водяной бане, а затем охлаждают при комнатной температуре. После этого в пробирку прибавляют 1 мл хлороформа и взбалтывают: при наличии ацетона хлороформный слой приобретает синюю окраску.

Уксусная кислота.

1. Реакция с хлоридом железа (III).

2 - 3 мл дистиллята вносят в пробирку и прибавляют 1 каплю 5% свежеприготовленного раствора железа (III) хлорида. Появление красной

окраски указывает на наличие ацетат-ионов в дистилляте. При нагревании окрашенного раствора происходит гидролиз, в результате которого выпадает бурый осадок.

2. Реакция образования индиго.

Около половины дистиллята вносят в выпарительную чашку и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют смесь равных количеств кальция оксида и кальция карбоната. Отверстие пробирки накрывают фильтровальной бумагой, смоченной свежеприготовленным 2% раствором о-нитробензальдегида в 5% растворе натрия гидроксида. Затем пробирку нагревают на пламени спиртовки до прокаливании ее содержимого. При наличии ацетат-ионов в исследуемом растворе на бумаге, пропитанной раствором о-нитробензальдегида, появляется синее пятно (окраска индиго).

3. Образование этилацетата.

В пробирку вносят 3 – 5 мл дистиллята и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 1 мл этилового спирта и 2 мл кислоты серной концентрированной, а затем смесь осторожно нагревают в пламени горелки. О наличии ацетатов свидетельствует запах этилацетата.

Фенол и крезолы.

Для обнаружения фенола используется часть второго дистиллята, который подвергается пробоподготовке. Дистиллят подщелачивают раствором гидрокарбоната натрия до щелочной реакции, вносят в делительную воронку и извлекают двумя порциями эфира по 5 мл. Эфирные вытяжки объединяют и выпаривают при комнатной температуре досуха. Сухой остаток растворяют в 2-3 мл воды и проводят качественные реакции на фенол:

1. Реакция с бромной водой (образование трибромфенола).

К 0,5-1,0 мл исследуемого раствора прибавляют 3-5 капель бромной воды. Образуется желтовато-белый осадок трибромфенола, растворимый в избытке реактива.

2. Реакция с хлоридом окисного железа.

К 1 мл исследуемого раствора прибавляют 1 – 2 капли раствора хлорида окисного железа. Появляется сине-фиолетовое окрашивание, исчезающее от добавления воды, спирта, кислоты уксусной. о-крезол и п-крезол образуют синее окрашивание, м-крезол – красно-фиолетовое

3. Реакция образования индофенола.

К части раствора добавляют 1 мл 1% раствора анилина и 2 мл раствора хлорной извести. Наблюдают появление грязно-фиолетового окрашивания, которое при добавлении 10% раствора аммиака переходит в синее.

4. *Реакция Либермана.* 1 – 2 капли раствора вносят в тигель и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют каплю 1% раствора нитрита натрия в концентрированной серной кислоте. Через несколько минут смесь подщелачивают – появляется синее окрашивание, переходящее в красное, а затем в зеленое.

5. *Реакция с бензальдегидом.* К исследуемому раствору добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и 1 – 2 капли бензальдегида. При нагревании смеси появляется темно-красное окрашивание, которое при добавлении щелочи переходит в сине-фиолетовое.

Задание 2. Провести количественное определение в дистилляте кислородсодержащих соединений.

Формальдегид.

К 10 мл дистиллята в колбе с притертой пробкой прибавляют 20 мл 0,1 М раствора йода и 10 мл 1 М раствора гидроксида натрия, взбалтывают и оставляют в темном месте на 10 минут. Затем прибавляют 11 мл 1 М раствора серной кислоты, и выделившийся йод титруют 0,1 М раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания (индикатор - крахмал).

Ацетон.

К 10 мл дистиллята в колбе с притертой пробкой прибавляют 20 мл 0,1 М раствора йода и 10 мл 1 М раствора гидроксида натрия, взбалтывают и оставляют в темном месте на 30 минут. Затем прибавляют 25 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, и выделившийся йод титруют 0,1 М раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания (индикатор - крахмал).

Уксусная кислота.

К 25 мл дистиллята добавляют 1 каплю 1% спиртового раствора фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до розовой окраски раствора.

Концентрация уксусной кислоты рассчитывается по формуле:

$$C = \frac{T \cdot (V_1 - V_2) \cdot V_{\text{общ. дист}} \cdot 100}{m \cdot V_{\text{иссл. дист}}}$$

C – концентрация уксусной кислоты, %,

V_1 – объем щелочи, добавленной к дистилляту, мл,
 V_2 – объем кислоты в пересчете на общий объем дистиллята, мл,
 $V_{общ. дист}$ – общий объем дистиллята, мл,
 $V_{иссл. дист}$ – объем дистиллята, взятый для титрования, мл,
 m – навеска объекта, г.

Фенол.

25 мл дистиллята, переносят в коническую колбу 300-500 мл с притертой пробкой, прибавляют 25 мл бромид-броматной смеси и 10 мл серной кислоты, закрывают колбу пробкой и оставляют на 30 мин. Затем прибавляют 1 г сухого йодида калия, снова закрывают колбу и через 5 мин титруют выделившийся йод 0,05 М раствором тиосульфата натрия, прибавляя к концу титрования раствор крахмала.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание летучих с паром фенолов в пересчете на фенол C_6H_5OH в мг/л вычисляют по формуле:

$$C = \frac{T \cdot (V_{контр} - V_{он}) \cdot K \cdot V \cdot 500 \cdot 1000}{V_{иссл. дист}}, \text{ где}$$

$V_{контр}$ – объем раствора тиосульфата натрия, в контрольном опыте, мл,

$V_{он}$ – объем раствора тиосульфата натрия, на титрование пробы, мл,

V – объем дистиллята, взятого для анализа, мл

$V_{иссл. дист}$ – объем аликвотной части фильтрата или дистиллята, взятого для анализа, мл.

Лабораторная работа № 4

Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды»

Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром. Спирты

Задание 1. Провести качественный анализ дистиллята на наличие спиртов.

Метиловый спирт

Образование метилсалицилата

К 1 мл дистиллята прибавляют 0,03 – 0,05 г кислоты салициловой и 2 мл кислоты серной концентрированной, затем смесь осторожно нагревают в пламени горелки. При наличии метилового спирта в исследуемом растворе ощущается характерный запах метилсалицилата.

Реакция окисления метанола до формальдегида и обнаружение последнего реакциями окрашивания.

К 2 мл дистиллята прибавляют 1 мл раствора калия перманганата и несколько капель 10% раствора кислоты серной, жидкость охлаждают и перемешивают, затем для удаления избытка калия перманганата прибавляют 1 мл 5% раствора кислоты щавелевой в кислоте серной разбавленной (1:1).

Образующийся формальдегид открывают реакцией с кислотой фуксинсернистой.

Несоблюдение условий проведения реакции может привести к переоткрытию метанола за счет того, что формальдегид будет образовываться из этилового спирта, который может находиться в дистилляте.

Этиловый спирт

Реакция образования йодоформа.

К 1 мл дистиллята добавляют 2 мл 5% раствора гидроксида натрия, а затем по каплям 1% раствор йода в 2% растворе йодида калия до сохранения слабо-желтого окрашивания. Смесь нагревают 5 - 10 минут на водяном бане, при этом ощущается запах йодоформа. При охлаждении раствора образуются кристаллы йодоформа.

Реакция образования ацетальдегида.

К 1 мл дистиллята прибавляют 10% раствор серной кислоты до кислой реакции. К этой смеси по каплям прибавляют 10% раствор дихромата калия до оранжево-красной окраски, нагревают на кипящей водяной бане 3 – 5 минут. Наблюдается переход окраски из оранжевой в зеленую и ощущается характерный запах ацетальдегида (запах резаных яблок). Эффект реакции также наблюдается, если смесь оставить на несколько минут при комнатной температуре или при слабом нагревании.

Реакция образования этилацетата.

К 1 мл дистиллята прибавляют 0,1 г высушенного ацетата натрия, затем осторожно по каплям 2 мл концентрированной серной кислоты. Смесь нагревают на кипящей водяной бане до выделения пузырьков газа. После охлаждения ощущается запах этилацетата, который появляется более отчетливо, если к содержимому пробирки добавить 20-25 кратный объем воды.

Изоамиловый спирт

Все реакции на изоамиловый спирт дают положительный эффект только при отсутствии воды, поэтому перед выполнением реакций изоамиловый спирт экстрагируют из дистиллята эфиром (5 мл), эфирную вытяжку делят на

4 части и эфир испаряют при комнатной температуре. С полученным остатком проделывают реакции:

Реакция образование изоамилацетата.

К остатку в фарфоровой чашке прибавляют 2 капли кислоты серной концентрированной и 0,03 г высушенного порошка натрия ацетата. Нагревают на водяной бане. Ощущается характерный запах амилацетата (запах грушевой эссенции). Запах ощущается более отчетливо, если к реакционной смеси добавить 20-25 кратный объем воды.

Реакция образование изовалерианового альдегида.

К остатку в фарфоровой чашке прибавляют 3-5 капель 10 % раствора калия перманганата и 5-10 капель кислоты серной концентрированной. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане в течение 1-2 мин. Появляется едва уловимый приятный запах изовалерианового альдегида, затем неприятный запах гнилого сыра, характерный для изовалериановой кислоты, который вновь переходит в приятный запах изоамилового эфира изовалериановой кислоты.

Реакция Комаровского с салициловым альдегидом (на высшие спирты, содержащие более 3 атомов углерода).

К сухому остатку в фарфоровой чашке прибавляют 1 мл 1% спиртового раствора альдегида салицилового и 3 мл кислоты серной концентрированной. Чашку помещают на водяную баню на 3 мин. Появление розово-красной окраски указывает на наличие спирта изоамилового в пробе. При больших количествах спирта изоамилового окраска жидкости появляется без нагревания.

Этиленгликоль

Реакция окисления калия периодатом и последующим обнаружением формальдегида

К 3 - 5 мл дистиллята прибавляют 5 капель 12 % раствора кислоты серной, 5 капель 5 % раствора калия периодата в 5 % растворе кислоты серной и взбалтывают. Через 5 мин. прибавляют 3 - 5 капель раствора кислоты серной, а затем 4 капли раствора кислоты фуксинсернистой. При наличии этиленгликоля через 3 - 20 мин появляется красно-фиолетовое или розовое окрашивание.

Реакция окисление этиленгликоля кислотой азотной до кислоты щавелевой с последующим ее обнаружением

Часть дистиллята окисляют кислотой азотной при выпаривании в фарфоровой чашке на водяной бане досуха. Остаток растворяют в воде, нейтрализуют водным раствором аммония гидроксида и прибавляют раствор кальция хлорида. Выпадение кристаллического осадка (возможно через 2 - 3 суток), нерастворимого в кислоте уксусной и растворимого в кислоте хлористоводородной и имеющего характерную форму кристаллов указывает на наличие этиленгликоля в дистилляте.

Реакция образования гликолята меди.

К 2 – 3 мл дистиллята прибавляют 1 – 2 мл 10% раствора натрия гидроксида и несколько капель 10% раствора сульфата меди. Появляется голубое окрашивание.

Результаты качественных реакций диализата занести в таблицу:

Таблица 1.

Реакция	Аналитический эффект			
	Метанол	Этанол	Изоамиловый спирт	Этиленгликоль

Задание 2. Провести количественное определение спиртов.

Количественное определение одноатомных спиртов в дистилляте проводят методом ГЖХ и ИК-спектроскопии после пробоподготовки.

Газохроматографическое определение этилового спирта в жидких биосредах.

Выполнение работы

I. Обнаружение этилового спирта в биологической пробе.

Предварительно готовят растворы нитрита натрия, трихлоруксусной кислоты и пропанола.

Во флаконы из-под пенициллина, содержащие 0,5 мл раствора трихлоруксусной кислоты, вносят 0,5 мл эталонного раствора этилового спирта (концентрация 3 - 4,0 ‰) и 0,5 мл исследуемой пробы. Флаконы закрывают стандартными резиновыми пробками и фиксируют алюминиевыми колпачками с помощью ПОК (прибор для обжима пенициллиновых флаконов). После энергичного перемешивания во флаконы шприцем вводят по 0,35 мл 30% раствора нитрита натрия. Содержимое флаконов энергично встряхивают (30 маятникообразных движений) и оставляют на 1 минуту. Затем из флаконов шприцем путем прокола пробки

отбирают 0,5 мл парогазовой фазы, которую тотчас же вводят в прибор. С помощью секундомера измеряют время удерживания от начала выхода пика несорбирующегося компонента (воздуха) до максимума измеряемого пика. Это исправленное время удерживания вещества в колонке. При наличии в исследуемой биологической жидкости алифатических спиртов на хроматограмме появляются пики соответствующих алкилнитритов.

По формулам 1, 2, 3 рассчитывают параметры удерживания:

$V_{r,i}^0 = v \cdot t_{r,i}^0 \quad (1)$	$V_q = \frac{V_{r,i}^0}{V_{r,st}} \quad (2)$	$t_q = \frac{t_{r,i}^0}{t_{st}} \quad (3)$
---	--	--

где $V_{r,i}^0$ – исправленный удерживаемый объем вещества i , мл;
 $V_{r,st}$ – исправленный удерживаемый объем вещества – стандарта, мл;
 V_q – относительный удерживаемый объем, мл;
 v – скорость потока газа - носителя, мл/с;
 $t_{r,i}^0$ – исправленное время удерживания вещества, с;
 t_{st} – исправленное время удерживания вещества – стандарта, с;
 t_q – относительное время удерживания, с.

Для идентификации алкилнитритов часто достаточно вычислить относительное время удерживания.

Если на хроматограмме исследуемой пробы отсутствуют пики, то делают заключение о необнаружении алифатических спиртов C_1 - C_5 .

Приготовление растворов.

Нитрит натрия. 30 г $NaNO_2$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в склянке из темного стекла в холодильнике.

Трихлоруксусная кислота. 50 г CCl_3COOH растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в склянке из темного стекла при комнатной температуре.

Пропанол. 0,4 мл спирта в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 100 мл. Хранят в склянке с притертой пробкой в холодильнике до 5 суток.

Количественное определение этилового спирта газожидкостной хроматографией.

Количественный анализ проводят с помощью калибровки по методу внутреннего стандарта, используя для расчета отношение высот пика этанола к пику пропанола. Градуировочный график для количественных исследований строят ежедневно, так как при повторном включении прибора

условия хроматографирования могут изменяться. При построении графика используются стандартные растворы этанола с концентрацией 0,4-2,0-4,0‰, которые подвергаются газохроматографическому исследованию в тех же условиях, что и исследуемые пробы. Для приготовления эталонных растворов используют 95-96%-ный этиловый спирт. Предварительно спиртомером измеряют процент (объемный) исходного алкоголя. Для получения 100 мл 10%-ного раствора из исходного спирта, содержащего 95,9 % (объемных), следует:

– перевести по алкоголеметрической таблице объемные проценты в массовые, что будет соответствовать 93,7 % с плотностью 0,8129 г/см³;

– вычислить массу этилового спирта, необходимого для приготовления раствора требуемой концентрации

$$93,7 \% - 100 \text{ г}$$

$$10,0\% - x \text{ г}$$

$$x = \frac{100 \cdot 10}{93,7} = 10,6723 \text{ г}$$

– определить объем исходного раствора этилового спирта, соответствующий вычисленной массе

$$V = \frac{10,6723}{0,8129} = 13,1286 \text{ мл}$$

13,1 мл этилового спирта переносят количественно в мерную колбу емкостью 100 мл. Объем доводится дистиллированной водой до метки. Полученный раствор используется для приготовления эталонных растворов.

Для приготовления **стандартного раствора с концентрацией 0,4‰** пипеткой отмеривают 2 мл раствора спирта, количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 мл и разбавляют дистиллированной водой до метки.

Для приготовления **2 ‰** раствора берут 10 мл 10 % раствора спирта, а для приготовления **4‰** эталонного раствора – 20 мл 10%-ного раствора спирта, дальнейшее разведение осуществляется как указано выше.

Эталонные растворы хранятся в склянках из темного стекла с хорошо пришлифованными пробками при температуре +4 - +6⁰С. При пользовании эталонными растворами следует как можно меньше оставлять их открытыми. Перед открыванием склянки с эталоном ее необходимо тщательно встряхнуть. При соблюдении этих условий стандартные растворы могут использоваться в течение 5-10 дней, практически не теряя своей концентрации. По истечении указанного срока готовятся новые эталонные растворы.

Ход определения

Во флаконы из-под пенициллина вносят 0,5 мл трихлоруксусной кислоты, 0,5 мл раствора пропанола, 0,5 мл раствора этилового спирта различной концентрации (0,4; 2,0; 4,0‰) и 0,5 мл исследуемой пробы. Флаконы закрывают стандартными пробками, пробки фиксируют. Содержимое флаконов перемешивают и шприцем вводят по 0,35 мл раствора нитрита натрия. Флаконы энергично встряхивают (30 маятникообразных движений) и оставляют на 1 минуту. После чего из каждого флакона шприцем путем прокола пробки отбирают 0,5 мл парогазовой фазы, которую тотчас же вводят в дозатор прибора и хроматографируют. Для получения достоверных результатов проводят три параллельных исследования.

На полученных хроматограммах должны быть проставлены ФИО освидетельствуемого, номер акта медицинского освидетельствования или номер медицинской карты стационарного или амбулаторного больного, дата и время исследования. На градуировочном графике по оси абсцисс откладываются значения отношения высот пиков этилнитрита к пропилнитриту. Во избежание дробных чисел среднее значение соотношения высот пиков для каждой концентрации этанола умножают на 100 (масштаб: 1 см = 0,1). По оси ординат откладывают соответствующие им значения концентрации эталонных растворов (масштаб: 1 см = 0,4 ‰).

Для расчета концентрации этилового спирта удобнее пользоваться величиной f_R – фактор чувствительности, который рассчитывается по формуле:

$$f_R = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{c \cdot h_{st}}{h_x}}{n} \quad (4)$$

где C – концентрация исследуемого вещества, г/л;

h_{st} – высота пика внутреннего стандарта, см;

h_x – высота пика исследуемого вещества, см;

n – число текущих измерений;

f_R – постоянная величина для данной пары веществ на каждой колонке, зависящая от летучести определяемых соединений при условиях опыта.

Концентрацию этилового спирта соответственно определяют по формуле:

$$c = f_R \frac{h_x}{h_{st}} \quad (5)$$

Для вычисления концентрации этанола в исследуемых пробах необходимо полученную концентрацию умножить на коэффициенты пересчета: для крови – 0,95, для мочи – 1,05.

Определение этилового алкоголя в крови и моче фотометрическим методом

Сущность фотометрического метода заключается в восстановлении калия бихромата в кислой среде этанолом, ускоренно диффундирующим из объекта под действием калия карбоната. В зависимости от концентрации этанола раствор калия бихромата изменяет окраску от светло-оранжевой до темно-синей. По градации переходных оттенков фотометрированием по отношению к эталонным растворам этилового спирта и к контрольной пробе определяется концентрация этанола в исследуемых объектах.

Использование трех растворов: калия бихромата в серной кислоте, калия перманганата, мета-нитробензальдегида в серной кислоте позволяет установить наличие или отсутствие этилового спирта. Каждый из указанных растворов приобретает различную окраску.

При наличии этанола раствор калия бихромата изменяет окраску от светло-оранжевой до темно-синей; калия перманганата – от красно-фиолетовой до буроватой; раствор мета-нитробензальдегида не изменяет окраску.

При наличии метанола раствор калия бихромата восстанавливается значительно интенсивнее, примерно в 4 раза, чем в присутствии этанола, окраска растворов калия перманганата и мета-нитробензальдегида не изменяется.

При наличии пропиловых, бутиловых, амиловых спиртов окраска калия бихромата и калия перманганата изменяется примерно как и от этанола, но раствор мета-нитробензальдегида резко изменяет окраску до красной или коричневой (при концентрации менее 0,2‰).

Этиловый эфир, анилин, ментол, ацетон, ацетальдегид, формальдегид вызывают другие окрашивания указанных реактивов.

Пиридин, аммиак, четыреххлористый углерод, нитробензол, дихлорэтан, этиленгликоль не влияют на цвет растворов реактивов.

Объекты исследования

Объектами исследования являются кровь и моча.

Для анализа используется по 2 мл крови и мочи (по 1 мл для идентификации и количественного определения).

Методика проведения исследования

Для каждого исследуемого объекта, контрольного и эталонных проб берется по 2 стеклянных бюкса с крышками, 4 керамических тигля.

Составляются 2 набора бюкс:

один набор – серия № 1 (с одним тиглем на дне бюкса) – для количественного определения этанола; 235

второй набор – серия № 2 (с тремя тиглями на дне бюкса) – для идентификации этанола и исключения других восстанавливающих веществ.

На дно первых бюкс первой и второй серии наливают по 1 мл воды (контрольная проба), вторых – по 1 мл эталонного раствора этилового спирта с концентрацией 0,4‰, третьих - по 1 мл эталонного раствора этилового спирта с концентрацией 2‰, четвертых - по 1 мл эталонного раствора этилового спирта с концентрацией 4‰, пятых и шестых – по 1 мл крови и мочи соответственно.

Заполнение всех бюкс и тиглей следует проводить в определенной последовательности: объект, контроль, эталонные растворы в возрастающей концентрации, реактивы и калия карбонат.

В тигли серии № 1 вносится по 2 мл раствора калия бихромата в серной кислоте. Этим же раствором и в том же объеме заполняется один тигель серии № 2. Во второй тигель серии № 2 вносится 1 мл раствора метанитробензальдегида в серной кислоте, в третий тигель этой же серии вводится 0,5 мл раствора калия перманганата.

После заполнения всех тиглей растворами на дно всех бюкс (к объектам исследования, эталонным растворам, контрольным пробам добавляется по 1 мл раствора калия карбоната.

Заполнение всех бюкс производится с затратой возможно меньшего количества времени. После каждой операции бюксы должны закрываться крышками.

Вращательным движением бюкс на плоскости проводится перемешивание раствора калия карбоната с ранее внесенными растворами (объектами исследования). Все бюксы одновременно помещаются на 30 минут в термостат при температуре 48-50°C.

Визуальная оценка результатов реакции

Сравнение окрасок растворов в контрольных и эталонных пробах с окраской растворов в объектах исследования проводится при закрытых крышках бюкс.

По цветовым изменениям раствора калия бихромата в первой серии бюкс и трех растворов реактивов во второй серии бюкс визуально устанавливается наличие или отсутствие этилового спирта и других веществ.

При этом сравниваются окраски реактивов в объектах исследования с окрасками реактивов в контрольной и эталонных пробах. Описание изменения цвета фиксируется в таблице.

В случае отсутствия видимых изменений в окрасках реактивов, указывающих на отсутствие этилового спирта, фотометрическое исследование этих проб не проводится.

При получении нехарактерных для этилового спирта изменений цвета реактивов изъятые кровь и моча подвергаются дополнительному исследованию

Фотометрическое определение

Для фотометрирования используются стеклянные кюветы с толщиной слоя 5 мм. Наиболее чувствительная область для определения этилового спирта расположена в области длин волн 436-465 нм. Вначале строится градуировочный график из эталонных растворов этилового спирта с концентрацией 0,4 – 2,0 – 4,0‰ – зависимость оптической плотности растворов от концентрации этанола (по возрастающей концентрации), раствор сравнения – раствор калия бихромата (контрольная проба). Далее в кювету вносится раствор калия бихромата из тигля серии № 1, определяется оптическая плотность раствора, по ранее построенному градуировочному графику вычисляется концентрация этанола в пробе.

Приготовление эталонных растворов этилового спирта

1. Спиртомером измерить плотность этилового спирта.
2. Вычислить количество этанола, необходимое для приготовления 1000 мл 1% раствора.
3. В мерную колбу на 1 л количественно перенести рассчитанный объем этанола, довести объем до метки водой, перемешать – исходный раствор.
4. Для приготовления 0,4‰ раствора этанола 2 мл исходного раствора внести в мерную колбу на 50 мл, объем довести до метки водой.
5. Для приготовления 2‰ раствора этанола 10 мл исходного раствора внести в мерную колбу на 50 мл, объем довести до метки водой.
6. Для приготовления 4‰ раствора этанола 20 мл исходного раствора внести в мерную колбу на 50 мл, объем довести до метки водой.

Визуальная оценка исследований

Объекты исследования	Визуальная оценка		
	<i>Раствор калия бихромата</i>	<i>Раствор калия перманганата</i>	<i>Раствор м-нитробензальдегида</i>
Вода	Светло-оранжевый	Красно-фиолетовый	Бесцветный или светло-розовый
Эталон 0,4‰	Светло-оранжевый с буроватым кольцом	Красно-фиолетовый со слабым желтоватым оттенком	Бесцветный или светло-розовый
Эталон 2‰	Оранжевый с буро-зеленым кольцом	Красно-фиолетовый с желтым оттенком	Бесцветный или светло-розовый

Эталон 4‰	Бурый с сине-зеленым кольцом	Красно-желтый с буроватым оттенком	Бесцветный или светло-розовый
Исследуемый объект №1			
Исследуемый объект №2			

Лабораторная работа № 5

Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией (лекарственные средства, некоторые алкалоиды)

1. Введение

При описанной ниже обработке исследуемого объекта органический растворитель извлекает из кислого раствора ряд токсикологически важных веществ кислого, нейтрального и слабоосновного характера, таких как салициловая кислота, фенацетин, кофеин, теобромин, некоторые производные барбитуровой кислоты – барбитал, фенобарбитал, барбамил, этаминал-натрия, бутобарбитал и бензонал.

Органический растворитель из щелочного раствора экстрагирует вещества основного характера. Из них наиболее важным в токсикологическом отношении являются алкалоиды, некоторые синтетические лекарственные вещества, имеющие токсикологическое значение – антипирин, амидопирин, промедол.

В качестве биологического материала берется содержимое желудка, печень, почки, моча.

2. Изолирование

Изолирование подкисленной водой (рис.1).

Измельченный объект помещают в колбу с притертой пробкой (на 500 мл) и заливают дистиллированной водой: при биологическом материале животного происхождения в соотношении 1:2, в случае объекта растительного происхождения – 1:12 (исходя из массы объекта). Объект подкисляют 5 – 10% водным раствором щавелевой кислоты до рН 2,5 и оставляют на 2 часа, а при объекте растительного происхождения – на 1 час, при частом взбалтывании, проверяя через 5 – 10 минут реакцию водной жидкости.

По истечении указанного времени водное извлечение процеживают через марлевый мешочек или небольшой ватный тампон, объект промывают 15 – 20 мл воды, промывные воды присоединяют к основному извлечению и мутную жидкость повторно экстрагируют 3 порциями хлороформа (15, 10 и 10 мл).

Хлороформные извлечения соединяют вместе, фильтруют через маленький (5-6 см в диаметре) фильтр с безводным сульфатом натрия,

предварительно смоченный хлороформом, и собирают в сухую колбу («Извлечение из кислого раствора»).

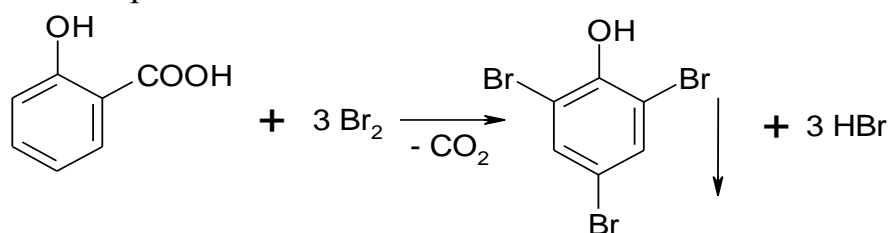
Водный остаток в делительной воронке подщелачивают по каплям 25 % раствором аммиака до pH 8,5 – 9 и последовательно извлекают 3 порциями хлороформа (15, 10 и 10 мл). Хлороформные вытяжки соединяют вместе, фильтруют, как указывалось выше, и собирают в сухую колбу («Извлечение из щелочного раствора»).

3. Качественный анализ

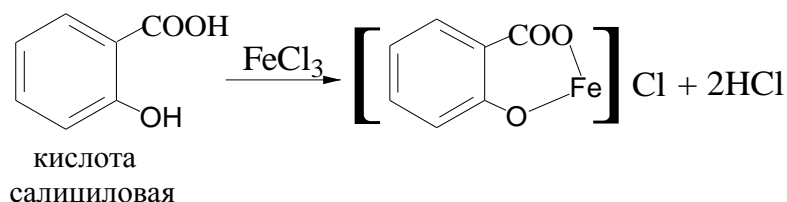
Описанные ниже качественные реакции изучаются сначала на водных или хлороформных растворах (или сухом остатке) известных веществ. При выполнении контрольной задачи описанные реакции применяют к исследованию экстракта после удаления органического растворителя.

3.1. Салициловая кислота

3.1.1. Реакция образования трибромфенола. К остатку после удаления хлороформа в пробирке добавляют несколько капель дистиллированной воды и каплю этилового спирта, жидкость перемешивают и добавляют 2-3 капли насыщенного раствора бромной воды. При наличии салициловой кислоты должен образоваться белый осадок.



3.1.2. Реакция с раствором хлорида окисного железа. К остатку после удаления хлороформа в фарфоровой чашке добавляют 1 каплю свежеприготовленного раствора хлорида окисного железа. При наличии салициловой кислоты появляется сине-фиолетовое окрашивание, не исчезающее от добавления 2-3 капель этилового спирта.

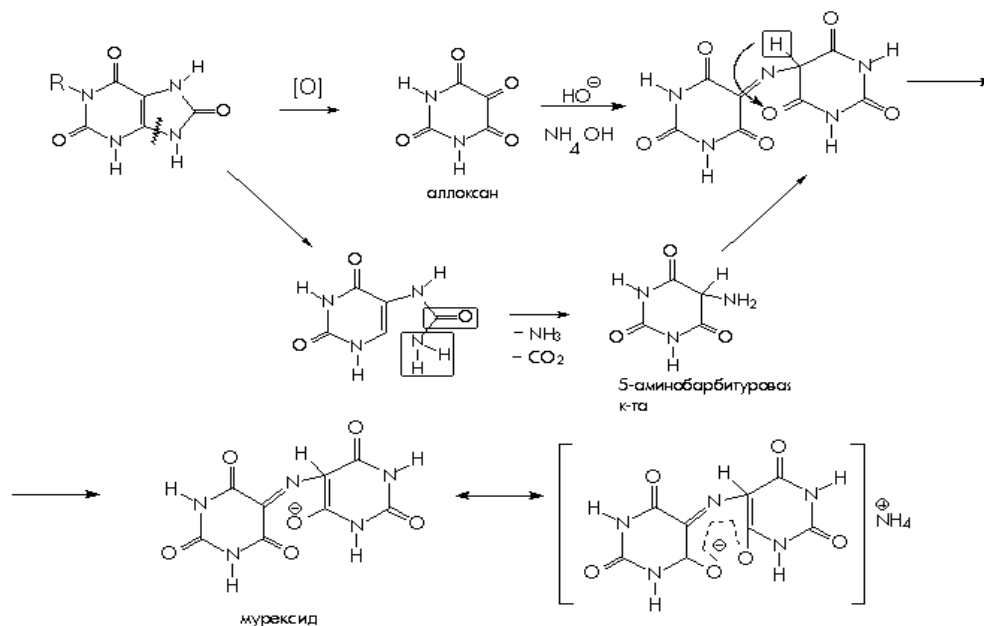


На фильтровальную бумагу помещают 1 каплю свежеприготовленного раствора хлорида окисного железа и подсушивают. Затем на то же место наносят 1-2 капли исследуемого хлороформного извлечения – тотчас появляется сине-фиолетовое окрашивание.

3.2. Кофеин

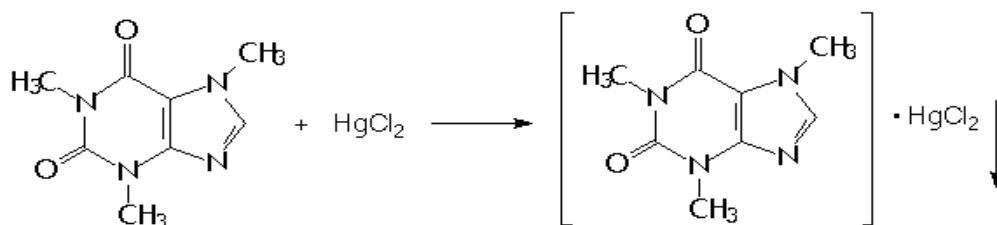
3.2.1. *Реакция образования мурексида.* 5-6 капель хлороформного раствора исследуемого вещества помещают в фарфоровую чашку, и растворитель испаряют без нагревания. К сухому остатку прибавляют 0,5 – 1 мл насыщенного раствора бромной воды и выпаривают на водяной бане досуха. К окрашенному в буроватый цвет остатку подносят на стеклянной палочке одну каплю 25 % раствора аммиака. Остаток в чашке при наличии кофеина приобретает пурпурно-фиолетовое окрашивание.

Общегрупповая реакция образования мурексида:



Аммонийная соль пурпуровой кислоты (красно-фиолетовое окрашивание)

3.2.2. *Реакция с хлоридом окисной ртути.* На предметное стекло наслаивают 2 – 3 капли исследуемого хлороформного раствора. На сухой остаток после удаления хлороформа наносят каплю 0,1 н раствора соляной кислоты и каплю 5 % раствора хлорида окиси ртути, через 10 – 15 минут образуются крупные, шелковистые, бесцветные иглообразные кристаллы.



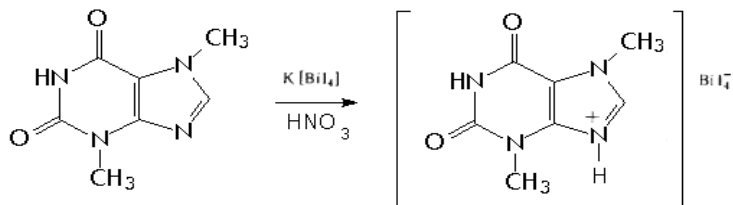
Открываемый минимум 9,4 мкг, предельная концентрация 1:532.

3.3. Теобромин

3.3.1. *Реакция образования мурексида.* Реакция проводится аналогично реакции на кофеин.

3.3.2. *Реакция с раствором йодвисмутата калия.* К остатку исследуемого

вещества на предметном стекле добавляют 1 каплю 10 % раствора соляной кислоты и 1 каплю раствора йодвисмутата калия (реактив Драгендорфа). Через 10 – 15 минут образуются характерные игольчатые кристаллы темно-красного цвета, собранные в пучки. Рост кристаллов сначала наблюдается у края капли, затем распространяется к центру.



Открываемый минимум 19 мкг; предельная концентрация 1:263.

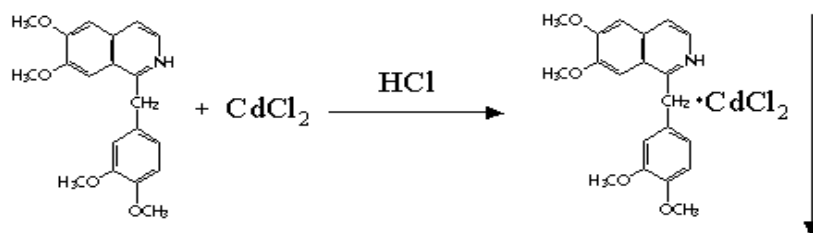
3.4. Папаверин

3.4.1. *Реакция с раствором формальдегида в концентрированной серной кислоте (реактив Марки).* Несколько капель исследуемого хлороформного раствора помещают в фарфоровую чашку или на фарфоровую пластинку, растворитель испаряют без нагревания. К сухому остатку добавляют одну каплю смеси формалина и концентрированной серной кислоты. При наличии папаверина наблюдается появление сине-фиолетового окрашивания.

3.4.2. *Реакция с раствором молибдата аммония в концентрированной серной кислоте (реактив Фреде).* Реакция проводится аналогично реакции с реактивом Марки. При наличии папаверина наблюдается фиолетовое окрашивание, переходящее в бледно-розовое.

3.4.3. *Реакция с хлоридом окисного железа.* В фарфоровую чашку помещают несколько капель хлороформного раствора исследуемого вещества. Органический растворитель выпаривают без нагревания. К сухому остатку добавляют 1 – 2 капли свежеприготовленного раствора хлорида окисного железа. При наличии папаверина наблюдают появление синего окрашивания.

3.4.4. *Реакция с раствором хлорида кадмия.* Остаток на предметном стекле растворяют в капле 0,1 н раствора соляной кислоты, и раствор соединяют с каплей 10 % раствора хлорида кадмия. Образуются характерные сростки из тонких пластинок кубической формы.

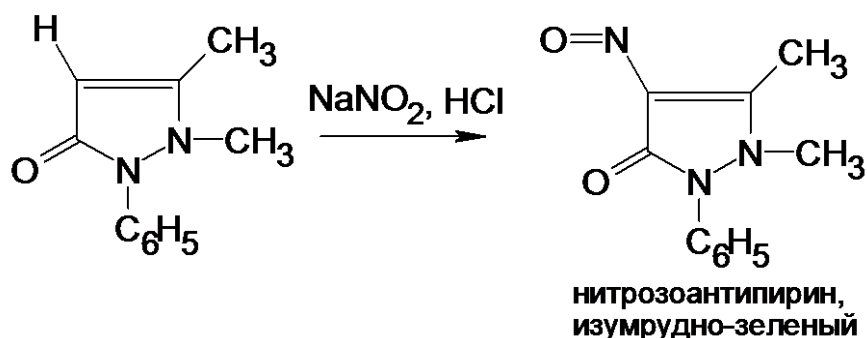


Открываемый минимум 10 мкг, предельная концентрация 1:2000.

3.5. Антипирин

3.5.1. *Реакция с хлоридом окисного железа.* К остатку в фарфоровой чашке после удаления хлороформа добавляют одну каплю хлорида окисного железа. При наличии антипирина появляется кроваво-красное окрашивание.

3.5.2. *Реакция получения нитроантипирина.* Остаток после удаления хлороформа растворяют в дистиллированной воде, подкисляют 10% раствором серной кислоты и добавляют несколько капель насыщенного раствора нитрита натрия. При наличии антипирина наблюдают зеленое окрашивание; при больших количествах вещества может выпасть зеленый осадок.



3.6. Амидопирин

3.6.1. *Реакция с хлоридом окисного железа.* К остатку в фарфоровой чашке после удаления хлороформа добавляют одну каплю хлорида окисного железа. При наличии амидопирина появляется фиолетовое окрашивание, исчезающее от избытка реактива.

3.6.2. *Реакция с азотистой кислотой.* Остаток после удаления хлороформа растворяют в дистиллированной воде, подкисляют 10% раствором серной кислоты и добавляют несколько капель насыщенного раствора нитрита натрия. При наличии амидопирина наблюдают фиолетовое быстро исчезающее окрашивание.

3.6.3. *Реакция с нитратом серебра.* Часть водного раствора исследуемого вещества помещают в пробирку, добавляют 3-5 капель раствора нитрата серебра и нагревают в течение 3-5 минут. При наличии амидопирина наблюдают образование фиолетового окрашивания.

При больших количествах амидопирин может наблюдаться образование темного осадка металлического серебра.

3.6.4. *Реакция с раствором йода в соляной кислоте.* К остатку амидопирин на предметном стекле прибавляют 1-2 капли раствора йода в концентрированной соляной кислоте – выделяются через некоторое время призматические кристаллы. Открываемый минимум 0,3 мкг при предельной концентрации 1:666666.

Результаты наблюдения качественных реакций занести в таблицу:

Таблица 1. Реакции обнаружения веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией.

Вещество		Аналитический эффект										
		с Br ₂	с FeCl ₃	обр-ние	с HgCl ₂	с K[BiI ₄]	с р-вом Марки	с р-вом Фреде	с CdCl ₂	с HNO ₂	с AgNO ₃	с I ₂
Извлечение из	Салициловая кислота											
	Кофеин											
	Теобромин											
Извлечение	Папаверин											
	Антипирин											
	Амидопирин											

Вопросы для контроля

1. Токсикологическое значение салициловой кислоты, кофеина, теобромина, папаверина, антипирина, амидопирина.
2. Фармакологическое действие данных веществ.
3. Процессы метаболизма данных веществ в организме человека, биомишени.
4. Симптомы отравления данными ЛВ.
5. Написать структурные формулы данных соединений.
6. К каким группам ЛВ относятся изучаемые вещества по фармацевтической классификации.
7. Метод изолирования данных веществ из биологического материала.
8. Что такое экстракция? Область применения экстракции. Законы, на которых основан процесс экстракции.
9. Что такое сорбция?
10. Написать уравнения реакций данных веществ при качественном анализе.
11. Количественное определение данных веществ.

Лабораторная работа № 6

Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией органическими растворителями (фосфорсодержащие пестициды)

1. Введение

Химико-токсикологический анализ на фосфорсодержащие пестициды различных объектов, главным образом растительного происхождения, основан на экстракции ФОС органическим растворителем, разрушении молекулы ФОС, качественном обнаружении и количественном определении продуктов разложения.

В качестве биологического материала берется желудок с содержимым, печень, почки или растительный материал (в основном, зерно).

2. Изолирование

Биологический материал в количестве 15 г измельчают, помещают в колбу емкостью 250—300 мл с притертой пробкой, заливают трехкратным количеством (40 мл) смеси ацетона, этанола, воды (в соотношении 2:2:1), перемешивают, подкисляют кристаллической щавелевой кислотой до pH 4,5 по универсальному индикатору (~ 0,5 г щавелевой кислоты) и однократно настаивают при комнатной температуре 4 часа при периодическом взбалтывании через 15—20 мин или 2 часа при непрерывном перемешивании.

После настаивания надосадочную жидкость отфильтровывают через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают на водяной бане вдвое. Остаток переносят в делительную воронку, добавляют 15 мл хлороформа, 30 мл 25 % раствора хлорида натрия, содержимое воронки встряхивают 5 мин. После отстаивания хлороформный слой сливают в колбу емкостью 100—150 мл, а оставшуюся в делительной воронке жидкость еще дважды экстрагируют, добавляя по 10 мл хлороформа. Объединенные хлороформные извлечения обесцвечивают активированным углем и фильтруют через бумажный фильтр с безводным сульфатом натрия в сухую фарфоровую чашку, упаривают до объема 2 мл и исследуют.

3. Качественный анализ

Описанные ниже качественные реакции изучаются сначала на водных или хлороформных растворах известных веществ. При выполнении контрольной задачи описанные реакции применяют к исследованию экстракта после удаления органического растворителя.

Обнаружение фосфора

Чтобы определить наличие фосфора в соединениях, их подвергают минерализации, т. е. переводят органически связанный фосфор в фосфат-ион. Для этой цели используют различные окислители: бром, персульфат аммония, перекись водорода, смесь хлорной и хлористоводородной кислот, смесь серной и азотной кислот и др. Затем в минерализате фосфат-ион обнаруживают с помощью соответствующих реакций.

Обнаружение фосфат-иона. В пробирку вносят 3—5 капель минерализата и прибавляют 5 капель раствора молибдата аммония. Смесь подкисляют 10 % раствором азотной кислоты. Появляется желтое окрашивание. К полученному раствору прибавляют 3—5 капель насыщенного водного раствора гидрохлорида бензидина, затем прибавляют 10 % раствор гидроксида аммония до щелочной реакции (по лакмусу). Появляется синее окрашивание.

3.1. Карбофос

Реакция с диазотированной сульфаниловой кислотой. Несколько миллилитров хлороформного извлечения вносят в пробирку и выпаривают досуха. К сухому остатку прибавляют 2 мл воды, 1 мл раствора диазотированной сульфаниловой кислоты и 0,5 мл 5% раствора гидроксида натрия. Появляется вишнево-красное окрашивание. Можно проделать эту реакцию следующим образом: к сухому остатку после удаления хлороформа добавляют 2 мл воды, а затем последовательно 0,5 мл раствора сульфаниловой кислоты в HCl, 1,0 мл раствора нитрита натрия, 1 мл 5% раствора гидроксида натрия.

Реакция с реактивом Марки. К сухому остатку прибавляют 5-10 капель реактива Марки. Появляется оранжевое окрашивание, переходящее в темно-коричневое.

Реакция с сульфатом меди. К сухому остатку прибавляют 1 мл 10 % спиртового раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 10 минут. После охлаждения вносят 25% раствор серной кислоты до pH 4-5. Затем прибавляют 1 мл хлороформа и 2 капли 10% раствора сульфата меди. Хлороформный слой приобретает зеленовато-желтую окраску.

3.2. Хлорофос, дихлофос

Реакция с пиридином и щелочью (реакция Фудживара). Сухой остаток после испарения хлороформного извлечения растворяют в 1 мл воды. К полученному раствору прибавляют 1 мл пиридина и 1 мл 30 % раствора

гидроксида натрия. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 5 мин. Появляется красное или розовое окрашивание.

Реакция с резорцином. Сухой остаток после испарения хлороформа растворяют в 1 мл воды. К полученному раствору прибавляют 2 капли 1 % раствора резорцина в 20 % растворе карбоната натрия или 1 % растворе гидроксида натрия. Через 10 мин появляется розовое окрашивание, а через 15 – 30 мин наблюдается желто-зеленая флюоресценция раствора. Реакция протекает при рН 9,0–11,0. Окраска и флюоресценция достигают максимума через 1–2 часа после прибавления реактивов. Через 4–6 часов розовое окрашивание переходит в оранжевое, а затем в желтое. Флюоресценция раствора сохраняется в течение нескольких суток.

Реакция образования изонитрила. К сухому остатку прибавляют 1 мл этилового спирта. Смесь взбалтывают, затем прибавляют 2 мл 10 % спиртового раствора гидроксида натрия и 1 каплю анилина, нагревают. Ощущается характерный запах изонитрила.

Реакция с о-толидином. Сухой остаток растворяют в 0,2—0,5 мл воды или спирта, прибавляют 1 мл 0,5 % раствора о-толидина в ацетоне и 1 мл смеси растворов пероксида водорода и гидроксида натрия. Появляется желтое или оранжевое окрашивание.

Реакция с 2,4-динитрофенилгидразином. Сухой остаток растворяют в 2-10 каплях воды, прибавляют 2 капли 1 моль/л раствора гидроксида натрия. Через 20 мин прибавляют 1 каплю 0,1 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 4М растворе хлористоводородной кислоты. Пробирку нагревают 30 мин на кипящей водяной бане. Смесь охлаждают и прибавляют 1 каплю 4 моль/л раствора гидроксида натрия и 0,5 мл этилового спирта. Появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание.

Реакция с ацетоном. Сухой остаток растворяют в 0,1–0,5 мл этилового спирта, прибавляют 1 мл ацетона и 0,5 мл 0,5 моль/л спиртового раствора гидроксида натрия. Через 5-15 мин появляется розовое окрашивание, переходящее в оранжевое.

3.3. Метафос

Реакция с о-дианизидином и перборатом натрия. Сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона, прибавляют 0,5 мл 3% свежеприготовленного ацетонового раствора о-дианизидина и 2 мл 1,25 % свежеприготовленного раствора пербората натрия. Через 5–30 мин раствор приобретает желтое или красноватое окрашивание. Чувствительность реакции повышается при рН 10–11.

Реакция с сульфатом меди. К сухому остатку прибавляют 1 мл 10 % спиртового раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 10 минут. После охлаждения вносят 25 % раствор серной кислоты до pH 4-5. Затем прибавляют 1 мл хлороформа и 2 капли 10% раствора сульфата меди. Хлороформный слой приобретает лимонно-желтое окрашивание.

Результаты наблюдения качественных реакций занести в таблицу:

Таблица 1. Реакции обнаружения фосфорсодержащих пестицидов.

Пестицид	Аналитический эффект							

Обнаружение и разделение фосфорсодержащих пестицидов с помощью тонкослойной хроматографии

Обнаружение ФОС методом ТСХ в частных системах растворителей

На стартовую линию хроматографической пластинки наносят в виде точек исследуемое хлороформное извлечение и растворы метчиков в хлороформе (ДДВФ, хлорофоса, метафоса, карбофоса). Пластинку хроматографируют в системе растворителей гексан: ацетон (2:1). Условия хроматографирования и значения R_f указаны в табл. 2. После подъема растворителя на 10 см пластинку вынимают из камеры, высушивают при комнатной температуре до полного испарения растворителей и ФОС проявляют соответствующими реактивами.

Проявление серосодержащих ФОС (карбофос, метафос).

I способ. Пластинку опрыскивают 0,5% раствором хлорида палладия в 1% растворе хлористоводородной кислоты. Карбофос проявляется без нагревания в виде пятен желтого цвета. При нагревании пластинки в течение 10 мин в сушильном шкафу при 90—100°C появляется коричневатое-желтое пятно метафоса.

II способ. Пластинку обрабатывают раствором бромфенолового синего, содержащим нитрат серебра. Появляются лиловые (сиреневые) пятна на синем фоне. Затем пластинку нагревают 20 мин в термостате при 60°C и

после охлаждения для обесцвечивания фона опрыскивают 10% раствором уксусной кислоты. Карбофос и метафос проявляются в виде пятен лилового цвета.

Проявление метафоса. Пластинку обрабатывают 5% спиртовым раствором гидроксида натрия, нагревают 5–10 мин в термостате при 100–110°C. Появляются пятна лимонно-желтого цвета.

Проявление дихлофоса и хлорофоса.

I способ. Пластинку обрабатывают 1% раствором резорцина в 5% растворе гидроксида натрия. Через 1-2 мин проявляется ДДВФ в виде пятна красно-розового цвета (оранжевого). Затем пластинку нагревают 5 мин в сушильном шкафу при 100°C. При этом проявляется хлорофос в виде пятна красно-розового цвета (оранжевого).

II способ. Пластинку опрыскивают 1% раствором о-толидина в ацетоне и облучают УФ-светом. Через 2–5 мин дихлофос и хлорофос проявляются в виде пятен голубовато-синего цвета.

Таблица 2. Условия хроматографического исследования ФОС и значения их R_f

Наименование ФОС	Сорбент	Система растворителей и значения R_f		
		хлороформ	бензол	гексан:ацетон 2:1
хлорофос	Силуфол- UV-254	0,05	0,10	0,26
дихлофос		0,20	0,32	0,12
карбофос		0,50	0,36	0,60
метафос		0,60	0,58	0,70
хлорофос	Сорбфил	0,05	0,14	0,09
дихлофос		0,02	0,10	0,20
карбофос		0,40	0,23	0,13
метафос		0,50	0,50	0,58

4. Вопросы для контроля

1. Понятие пестицидов (определение).
2. Токсикологическое значение пестицидов.
3. Требования по токсичности при регистрации пестицида.
4. Классификация пестицидов.
5. Источники попадания пестицидов в организм человека.
6. Антихолинэстеразные препараты, воздействие на организм.
7. Фосфорорганические пестициды, токсичность, примеры.
8. Процессы метаболизма фосфорорганических пестицидов в организме человека, биомишени.
9. Симптомы отравления пестицидами.

10. Метод изолирования фосфорорганических пестицидов из биологического материала.
11. Написать реакции на определение хлорофоса, дихлофоса, карбофоса, метафоса.
12. Условия хроматографического разделения и обнаружения фосфорорганических пестицидов.

Лабораторная работа № 7

Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых экстракцией водой в сочетании с диализом

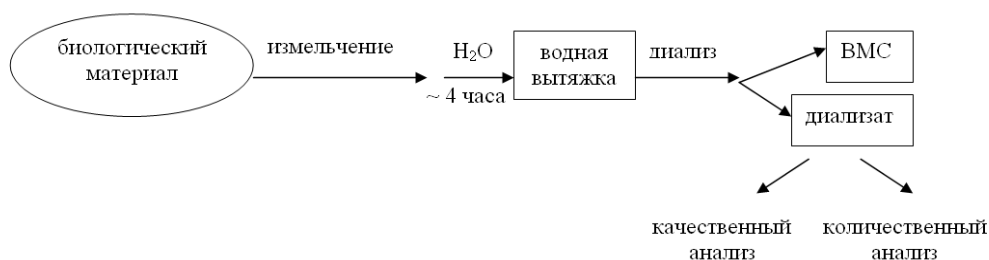
К группе веществ, изолируемых экстракцией водой в сочетании с диализом, относятся минеральные кислоты – серная, хлористоводородная, азотная; органические кислоты; щелочи, водный раствор аммиака и ряд солей, из которых токсикологическое значение имеют, главным образом, натрия нитрит (реже калия нитрит), натрия и аммония нитраты (реже калия нитрат), калия хлорат.

Исследование на эти вещества производится в случае, если существуют указания материалов дела на возможное отравление этими веществами или основания после проведения предварительных испытаний.

По истечению долгого времени после отравления щелочи могут переходить в карбонатные формы, а свободные минеральные кислоты в солевые формы. В этом случае их обнаружение не имеет токсикологического значения, поскольку образующиеся соли являются эндогенными соединениями (входят в состав живых организмов).

Объектами исследования на наличие этой группы веществ являются содержимое желудка, рвотные массы, остатки пищи, части одежды и пр. При исследовании на соли к перечисленным объектам следует отнести также печень.

Метод изолирования минеральных кислот, щелочей и их солей подразумевает настаивание измельченного биологического материала в очищенной воде в течение 1 – 2 часов, с последующим фильтрованием и очисткой. Очистку водных вытяжек проводят, используя метод диализа.



Диализ - разделение растворённых веществ, различающихся молекулярными массами. Используется для очистки водных вытяжек от сопутствующих высокомолекулярных веществ (белки, макромолекулы) с помощью полупроницаемой мембраны.

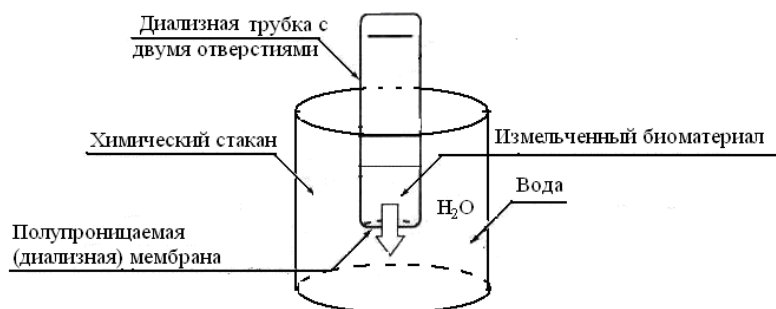
Процесс основан на неодинаковых скоростях диффузии этих веществ через проницаемую мембрану, разделяющую концентрированные и разбавленные растворы. Под действием градиента концентрации растворённые вещества с разными скоростями диффундируют через мембрану в сторону разбавленного раствора. Скорость переноса веществ в обратном направлении снижается вследствие диффузии растворителя (обычно вода). В качестве мембран для диализа используется пергаментная бумага, пленки из нитро – и ацетилцеллюлозы (коллодий, целлофан). Мембраны - это разделительные перегородки. Разделение с помощью мембран - результат конкурирующих взаимодействий компонентов смеси с поверхностью перегородки. В пограничном слое около поверхности перегородки накапливается вещество, имеющее наименьшую скорость проникания.

Кроме диализа для этих целей используют электродиализ. Электродиализ - метод разделения растворов под действием электродвижущей силы, которая создаётся по обе стороны полимерных перегородок. Электродиализаторы состоят из ряда камер, по которым перемещаются растворы электролитов. Они широко используются для обессоливания растворов.

Задание 1. Провести выделение токсических веществ из биологического объекта.

Исследуемый объект (10 граммов) измельчают, смешивают в химическом стакане с небольшим количеством дистиллированной воды до образования густой кашицы, смесь через 1-2 часа фильтруют или центрифугируют, фильтрат (центрифугат) помещают в стеклянный цилиндр с натянутой целлофановой мембраной вместо дна, цилиндр помещают во внешний сосуд с налитой в него водой и подвергают диализу.

Диализ производится 2–3 раза по 4–6 часов. Слитые вместе диализаты выпаривают на водяной бане до объема 5 – 10 мл и исследуют на наличие кислот, щелочей и солей.



Исследование диализата на наличие кислот

1. 1 каплю диализата наносят на индикаторную бумагу красный Конго и наблюдают изменение цвета бумаги. Параллельно на индикаторную бумагу красный Конго наносят 2 капли хлористоводородной кислоты и наблюдают изменение окраски индикаторной бумаги до красного окрашивания. Окраска индикаторной бумаги с диализатом должна быть идентична окраске параллельного опыта.

2. К 2 каплям диализата добавляют 2 капли спиртового раствора диметиламиноазобензола и наблюдают изменение цвета диализата. Параллельно к 2 каплям хлористоводородной кислоты добавляют 2 капли спиртового раствора диметиламиноазобензола, наблюдается яркое малиновое окрашивание. Окраска диализата должна быть идентична окраске параллельного опыта.

Исследование диализата на наличие щелочей

1. К 2 каплям диализата добавляют 2 капли раствора тропеолина 00 и наблюдают изменение цвета диализата. Параллельно к раствору натрия гидроксида добавляют 2 капли раствора тропеолина 00, появляется яркое красное окрашивание. Окраска диализата должна быть идентична окраске параллельного опыта.

2. К 2 каплям диализата добавляют 2 капли раствора индигокармина и наблюдают изменение цвета диализата. Параллельно к раствору натрия гидроксида добавляют 2 капли раствора индигокармина, появляется яркое зеленое окрашивание. Окраска диализата должна быть идентична окраске параллельного опыта.

3. К 2 каплям диализата добавляют 2 капли спиртового раствора фенолфталеина и наблюдают изменение цвета диализата. Параллельно к раствору натрия гидроксида добавляют 2 капли спиртового раствора фенолфталеина, появляется яркое малиновое окрашивание. Окраска диализата должна быть идентична окраске параллельного опыта.

Анализ диализата на наличие минеральных кислот.

В случае положительных испытаний диализата на наличие кислот (реакция среды кислая) возникает необходимость идентификации кислоты. Как правило, определение характера кислоты заключается в обнаружении *свободной кислоты* (в исходном состоянии), что может быть осуществлено лишь после процесса перегонки диализата.

Температуры кипения кислот достаточно высоки, поэтому применяется способ перегонки более летучих соединений, в которые восстанавливают кислоты (например, серную кислоту переводят в сернистую, летучую в виде ангидрида SO₂, азотную кислоту – в окислы азота).

При простой перегонке из диализата свободной серной кислоты, из объекта исследования перегоняется хлористый водород, образующийся из-за постоянного присутствия хлоридов в объекте исследования, поэтому, для предотвращения переоткрытия хлористоводородной кислоты, исследование на наличие кислот необходимо начинать с серной кислоты.

Азотная кислота из диализата перегоняется не сразу, вначале отгоняется вода, затем – азотная кислота. По этой причине диализаты, содержащие азотную кислоту, отгоняют почти досуха. Добавление медных опилок к диализатам способствует перегонке кислоты.

Предварительные исследования диализата.

1. *Испытания на сульфаты.* К 1 мл диализата добавляют 0,1 мл 10% раствора хлористоводородной кислоты и 1 мл 5% раствора хлорида бария.

2. *Испытания на хлориды.* К 1 мл диализата добавляют 0,1 мл 10% раствора азотной кислоты и 0,1 мл 1% раствора серебра нитрата.

3. *Испытание на нитраты и нитриты.* К 1 – 2 каплям диализата добавляют 1 каплю раствора дифениламина в концентрированной серной кислоте.

Основное исследование диализата на серную кислоту.

Отгонка серной кислоты. К части диализата добавить медные опилки и отогнать сернистую кислоту в приемник с раствором йода в йодиде калия. После добавления к отгону разбавленной хлористоводородной кислоты и удаления йода нагреванием (до обесцвечивания раствора) проводят качественное обнаружение серной кислоты в приемнике.

Качественное обнаружение серной кислоты (сульфат-иона).

1. *Реакция с бария хлоридом.* К 5 каплям дистиллята добавить 2 капли 5% раствора бария хлорида.

2. *Реакция со свинца ацетатом.* К 5 каплям диализата добавить 2 капли 3% раствора свинца ацетата.

3. *Реакция с натрия родизонатом.* На фильтровальную бумагу наносят по 1 капле 1% раствора бария хлорида и свежеприготовленного 0,2% раствора натрия родизоната, наблюдается красное окрашивание, после нанесения на пятно 2 капель дистиллята, содержащего сульфат-ион, окраска пятна исчезает.

Количественное определение. 10 мл водного извлечения титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии метилового оранжевого. Содержание серной кислоты указывают в г/100 г биообъекта.

Основное исследование диализата на хлористоводородную кислоту.

Качественное обнаружение хлорид-иона.

1. *Реакция с нитратом серебра.* В пробирку помещают 1 – 2 мл диализата, прибавляют 1 – 2 капли 5% раствора нитрата серебра и 1 мл 10% азотной кислоты.

2. *Реакция выделения йода.* В пробирку помещают 1 мл диализата, прибавляют несколько кристаллов калия хлората и нагревают. В верхней части пробирки закрепляют йодкрахмальную бумажку, которая при наличии хлористоводородной кислоты в диализате, приобретает синее окрашивание.

Количественное определение. К 10 мл водного извлечения добавляют 10 мл 0,1 М раствора нитрата серебра и титруют 0,1 М раствором роданида аммония (индикатор железоаммонийные квасцы). Параллельно проводят контрольный опыт. Содержание хлористоводородной кислоты указывают в г/100 г биообъекта.

Основное исследование диализата на азотную кислоту.

Качественное обнаружение азотной кислоты.

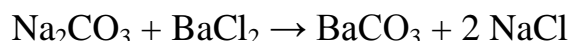
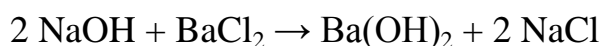
1. *Окрашивание шерсти.* Часть исследуемой жидкости выпаривают с шерстяными нитками, при этом шерсть (содержащая белки) окрашивается в желтый цвет, переходящий при добавлении раствора аммиака в оранжевый (свободная азотная кислота).

2. *Реакция с дифениламино.* Каплю исследуемой жидкости смешивают с 2–3 каплями раствора дифениламина в концентрированной серной кислоте (в выпарительной чашке белого цвета) – появляется синее окрашивание.

Количественное определение. 10 мл водного извлечения титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида в присутствии фенолфталеина. Содержание серной кислоты указывают в г/100 г биообъекта.

Анализ диализата на наличие едких щелочей и аммиака.

При щелочной реакции на лакмус для обнаружения щелочей к диализату прибавляют несколько капель спиртового раствора фенолфталеина, а затем избыток хлорида бария. В присутствии едких щелочей (NaOH, KOH и Ca(OH)₂), а также в присутствии раствора аммиака NH₄OH розовая окраска сохраняется. В случае исчезновения розовой окраски делается вывод о присутствии карбонатной щелочи.



Поскольку стекло, из которого производится лабораторная посуда, имеет свойство выщелачивания, то при проведении исследования необходимо предварительно убедиться, что лабораторная посуда щелочно-устойчива.

Анализ диализата на наличие аммиака.

Качественное обнаружение аммиака.

1. *Посинение красной лакмусовой бумажки.* Извлечение помещают в колбу с пробкой, к нижней поверхности которой прикреплены три индикаторные бумажки: 1 – красная лакмусовая; 2 – смоченная раствором меди сульфата; 3 – смоченная раствором свинца ацетата. Посинение 1 и 2 бумажек указывает на наличие аммиака. Для приготовления бумажки 2 берут разведенный раствор, имеющий лишь голубую окраску, которая от аммиака делается интенсивно синей.

Почернение «свинцовой» бумажки указывает на наличие сероводорода и, следовательно, на процесс гниения; последнее делает уже нецелесообразным исследование на наличие аммиака. Образование аммиака может происходить также при наличии щелочей (NaOH, KOH), выделяющих аммиак из его солей и белковых веществ.

2. *Реакция с реактивом Несслера.* В пробирку с 1 - 2 каплями диализата вносят по 3 - 5 капель воды и 3 – 4 капли реактива Несслера. В присутствии аммиака выпадает желто-бурый или оранжево-коричневый осадок.

Количественное определение. 10 мл диализата титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты в присутствии метилового оранжевого. Содержание аммиака указывают в г/100 г биообъекта.

Анализ диализата на наличие калия гидроксида.

Качественное обнаружение калия гидроксида.

1. *Реакция с натрия гидротартратом.* В пробирку вносят 3 - 5 капель исследуемого диализата, 3 - 4 капли 1 М раствора натрия гидротартрата, такой же объем смеси равных количеств 2 М раствора винной кислоты и 2 М раствора натрия ацетата. Стенки пробирки осторожно потирают стеклянной палочкой. В присутствии ионов калия выпадает белый кристаллический осадок.

2. *Реакция с натрия кобальтинитритом.* К 3 - 5 каплям исследуемого диализата добавляют 2 - 3 капли раствора натрия кобальтинитрита. Выпадение желтого осадка указывает на наличие ионов калия в диализате.

Количественное определение. 10 мл диализата титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты в присутствии фенолфталеина. Содержание калия гидроксида указывают в г/100 г биообъекта.

Анализ диализата на наличие натрия гидроксида.

Качественное обнаружение натрия гидроксида.

1. *Реакция с калия гидроксистибиатом (антимонатом).* К 3 - 5 каплям диализата, нейтрализованного уксусной кислотой, добавляют 2 - 3 капли раствора калия гидроксистибиата, потирают стенки пробирки стеклянной палочкой. Появление кристаллического осадка указывает на наличие ионов натрия в диализате.

2. *Реакция с цинк-уранилацетатом.* На предметное стекло наносят каплю диализата и выпаривают досуха. Затем добавляют 1 - 2 капли раствора цинк-уранилацетата, появление зеленовато-желтого осадка указывает на наличие ионов натрия в диализате.

Количественное определение. 10 мл диализата титруют 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты в присутствии фенолфталеина. Содержание натрия гидроксида указывают в г/100 г биообъекта.

Анализ диализата на наличие солей кислот.

Анализ диализата на наличие солей азотистой кислоты (нитриты)

Качественное обнаружение нитритов.

1. *Реакция с сульфаниловой кислотой и β -нафтолом.* К 3 каплям предварительно нейтрализованного диализата добавляют 3 капли 0,5% раствора сульфаниловой кислоты в 2 % растворе хлористоводородной кислоты. Через 3 - 5 минут к смеси прибавляют 1- 2 капли

свежеприготовленного щелочного раствора β -нафтола. Появляется оранжево-красное окрашивание или осадок (интенсивность окраски зависит от содержания нитритов в пробе).

2. *Реакция с реактивом Грисса.* В пробирку с 5 каплями нейтрализованного диализата вносят 3 капли реактива Грисса. Появляется темно-красное, красное или розовое окрашивание с образованием осадка.

3. *Реакция с феназоном.* К 1 мл диализата добавляют 1 мл 10% раствора серной кислоты и несколько капель 1% раствора феназона.

В случае слабоинтенсивной окраски реакций с реактивом Грисса и сульфаниловой кислотой и β -нафтолом, проводится отгонка нитритов из диализатов в токе оксида углерода (IV) и проведение исследования содержимого приемника на наличие нитритов.

Часть диализата вносят в колбу, подкисляют уксусной кислотой, которая из нитритов вытесняет азотистую кислоту, и не вытесняет азотную из нитратов, из аппарата Киппа пропускают оксид углерода (IV), который переносит азотистую кислоту в приемник с 1% раствором натрия гидроксида. После отгонки содержимое приемника нейтрализуют 10% раствором уксусной кислоты. В нейтрализованном дистилляте определяют наличие нитритов с помощью описанных выше реакций, а также с помощью окрашивания йодкрахмальной бумажки.

Реакция с йодкрахмальной бумажкой. На йодкрахмальную бумажку наносят каплю 1 М раствора хлористоводородной кислоты и 3 капли нейтрализованного диализата. При наличии нитритов йодкрахмальная бумажка синееет.

Количественное определение нитритов.

К 25 мл диализата добавляют 0,5 мл раствора сульфаниловой кислоты и тщательно перемешивают. Через 5 – 10 мин, приливают 0,5 мл раствора α -нафтиламина, 1,0 мл раствора ацетата натрия. Содержимое колбы перемешивают и через 15 мин определяют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду.

По калибровочного графика определяют содержание нитритов в диализате.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы на 25 мл вносят соответственно 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0 мл рабочего стандартного раствора нитрита натрия и доводят до метки дистиллированной водой. Растворы перемешивают и переливают в конические плоскодонные колбы на 50 мл.

Затем в каждый раствор добавляют 0,5 мл раствора сульфаниловой кислоты и тщательно перемешивают. Значение рН полученной смеси должно быть около 1,4. Дают раствору постоять 3 – 10 мин, затем приливают 0,5 мл раствора α – нафтиламина, 1,0 мл раствора ацетата натрия и хорошо перемешивают. Полученный окрашенный раствор должен иметь рН в границах 2,0 до 2,5. Через 10 – 30 мин определяют его оптическую плотность при $\lambda = 540$ нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду. Полученные данные заносят в таблицу.

Таблица 1. Данные для построения калибровочного графика .

V (раб.ст.р-ра), мл	1,0	2,0	3,0	5,0	7,0
C (NO ₂ ⁻), мкг/мл	0,04	0,08	0,12	0,20	0,28
A, отн. Ед.					

Строят калибровочный график зависимости оптической плотности (A) от концентрации нитрит-ионов (C (NO₂⁻))

Приготовление стандартного раствора нитрита натрия. Для приготовления основного стандартного раствора нитрита натрия 0,4927 г дважды перекристаллизованного и высушенного до постоянной массы при 110 °С нитрита натрия помещают в мерной колбу на 1000 мл, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки. Для консервации добавляют 2 мл хлороформа с таким расчетом, чтобы общий объем раствора был 1000 мл. Раствор устойчив в течении шесть месяцев при хранении в холодильнике при 4 – 5 °С. Концентрация нитритного азота составляет 100 мкг/мл.

Рабочий стандартный раствор нитрита натрия готовят разбавлением в 100 раз основного раствора в день проведения анализа. Для этого 1 мл основного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Раствор используют свежеприготовленным. Концентрация нитритного азота в рабочем растворе составляет 1 мкг/мл.

Лабораторная работа № 8
Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых
экстракцией водой в сочетании с диализом
Определение содержания нитратов в биологическом объекте

Метод определения нитритов и нитратов (после восстановления в нитриты) основан на фотометрическом измерении интенсивности окраски водного извлечения их из исследуемых проб азосоединения розово-малинового цвета, образующегося при реакции нитритов с α -нафтиламином и сульфаниловой кислотой (реактив Грисса) в кислой среде после водного извлечения их из исследуемых проб. Реакция специфична для нитритов.

Предел определения нитритов составляет 0,05 мг/кг (мг/л), степень определения нитритов $90 \pm 10\%$.

Предел определения нитратов составляет 0,5 мг/кг (мг/л), степень определения нитратов $83 \pm 17\%$.

Задание 1. Провести выделение токсических веществ из биологического объекта.

Измельченный растительный материал (картофель, лук, капуста, зелень и др.) в количестве 2-10 г помещают в диализационный цилиндр (стеклянную трубку с мембраной). Отмеривают 100 мл дистиллированной воды в стакан и помещают туда диализационный цилиндр с биоматериалом, предварительно смочив его несколькими миллилитрами дистиллированной воды из первоначального объема воды в стакане. Воды приливают столько, чтобы она хорошо смочила пробу. Проводят диализ в течение 1,5 - 2 часов.

Не вынимая диализационного цилиндра из стакана, пипеткой отбирают 10 мл диализата для анализа на нитриты и 5 мл для анализа на нитраты.

Количественное определение нитритов.

К 10 мл диализата, помещенного в пробирку добавляют 1 мл реактива Грисса, встряхивают содержимое пробирки. Через 15 мин. определяют оптическую плотность полученного раствора при $\lambda = 540$ нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду.

Количественное определение нитратов.

К 5 мл диализата, помещенным в пробирку с притертой пробкой, в которую предварительно помещают 0,3 г сухого восстановителя, приливают 5 мл 12% уксусной кислоты, закрывают пробирку пробкой и энергично встряхивают ее в течение точно 2 мин.

В параллельную пробирку помещают 0,3 г сухого восстановителя и приливают 10 мл 12% уксусной кислоты, закрывают ее пробкой и встряхивают в течение 2 мин. ("холостой" раствор).

Через 10 мин. переливают содержимое пробирок в центрифужные пробирки и центрифугируют при 5 - 6 тыс. об./мин. в течение 5 мин. После этого определяют оптическую плотность исследуемого раствора при $\lambda = 540$ нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют "холостой" раствор - раствор уксусной кислоты, обработанный сухим восстановителем.

По калибровочным графикам находят содержание нитратов (нитрат - иона) и нитритов (нитрит - иона) и рассчитывают их концентрацию в исходном биологическом материале по формуле:

$$C_{(мг/кг)} = \frac{C_{калиб} \cdot V_{диал}}{m \cdot V_{аликв}},$$

Где: $C_{калиб}$ – концентрация нитрит-иона (нитрат-иона), найденная по калибровочному графику, мкг;

$V_{диал}$ – объем диализата, мл;

$V_{аликв}$ – объем аликвоты, взятой для анализа, мл;

m – масса навески биоматериала, г.

В том случае, если в пробах устанавливается наличие большого содержания нитритов - свыше 20 мкг (интенсивная окраска в пробирке), их следует удалять, так как они несколько завышают результаты определения нитратов. Для удаления нитритов к диализату в стакане, соответственно 50 или 100 мл, прибавляют 2 - 4 мл 1-процентного раствора сульфаминовой кислоты, перемешивают раствор стеклянной палочкой и оставляют на 5 мин. После этого отбирают 5 мл диализата для анализа на нитраты и проводят анализ, как описано выше. При расчетах учитывают увеличение общего объема пробы.

Построение калибровочных кривых

1. Построение калибровочной кривой для определения нитритов.

В 11 химических пробирок помещают рабочий раствор нитрита натрия в количествах, указанных в таблице. Объем в пробирках доводят дистиллированной водой до 10 мл. Приливают по 1 мл реактива Грисса и энергично встряхивают.

Таблица: Данные для приготовления стандартных растворов для определения нитритов.

№ пробирки	Количество рабочего раствора NaNO ₂ , мл	Содержание NO ₂	
		мг	мкг
1	0,1	0,0005	0,5
2	0,2	0,0010	1,0
3	0,4	0,0020	2,0
4	0,6	0,0030	3,0
5	0,8	0,0040	4,0
6	1,0	0,0050	5,0
7	1,2	0,0060	6,0
8	1,4	0,0070	7,0
9	1,6	0,0080	8,0
10	1,8	0,0090	9,0
11	2,0	0,0100	10,0

Для построения калибровочной кривой через 15 мин. определяют оптическую плотность полученных растворов при $\lambda = 540$ нм в кюветах с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют дистиллированную воду.

2. Построение калибровочной кривой для определения нитратов.

В 7 пробирок с притертыми пробками или в 7 центрифужных пробирок с притертыми пробками последовательно прибавляют по 0,3 г реактива для восстановления нитратов, затем приливают рабочий раствор и 12% уксусную кислоту в количествах, указанных в таблице (общий объем составляет 10 мл).

Таблица: Данные для приготовления стандартных растворов для определения нитратов.

№ пробирки	Количество рабочего раствора NaNO ₂ , мл	Содержание NO ₂		Кол-во 1% уксусной кислоты, мл
		мг	мкг	
1	0,0	0,0	-	10,0
2	1,0	0,010	10	9,0
3	2,0	0,020	20	8,0
4	4,0	0,040	40	6,0
5	6,0	0,060	60	4,0
6	8,0	0,080	80	2,0
7	10,0	0,100	100	0,0

Затем пробирки или центрифужные пробирки закрывают пробками и энергично встряхивают в течение ровно 2 мин. Через 10 мин. пробы центрифугируют в центрифужных пробирках при 5 - 6 тыс. об./мин. в течение 5 мин. После этого определяют оптическую плотность исследуемого раствора при $\lambda = 540$ нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения используют "холостой" раствор - раствор уксусной кислоты, обработанный сухим восстановителем

Вопросы для самоконтроля.

1. Каковы особенности исследования на наличие минеральных кислот в биоматериале и биожидкости?
2. Какие предварительные испытания на вещества, изолируемые настаиванием с водой, вы знаете?
3. Какие объекты следует направлять на исследования при остром отравлении минеральными кислотами?
4. Какие объекты следует направлять на исследования при остром отравлении едкими щелочами?
5. Какие существуют методы изолирования и очистки извлечений при отравлениях минеральными кислотами, едкими щелочами?
6. Как проводится химико-токсикологический анализ на наличие серной кислоты?
7. Как проводится химико-токсикологический анализ на присутствие азотной кислоты?
8. Каковы особенности проведения исследования на наличие хлористоводородной кислоты?
9. Токсикологическое значение минеральных кислот, симптомы отравления, первая помощь при отравлении ими.
10. В чем заключается особенность обнаружения аммиака в биологическом материале? Интерпретация результатов исследования на наличие аммиака.
11. Как проводится химико-токсикологический анализ на наличие натрия гидроксида?
12. Химико-токсикологический анализ на присутствие солей азотной и азотистой кислот (нитритов и нитратов).
13. Как отличить едкую щелочь от растворов карбонатов (гидрокарбонатов)?
14. Как отличить минеральные кислоты от органических?

Лабораторная работа № 9

Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых минерализацией

Дробный метод анализа «металлических ядов».

Дробный метод анализа на «металлические яды» рассматривают как сумму отдельных, наиболее характерных и наиболее чувствительных реакций обнаружения соединений мышьяка и металлов, имеющих токсикологическое значение.

Для дробного анализа ядовитых катионов избраны наиболее чувствительные и специфичные аналитические реакции. Доказательность и надежность этих реакций достигается применением не одной, а, по меньшей мере, двух реакций — основной (специфичной) и дополнительной (подтверждающей). Применение дополнительных реакций производится после того, как основные реакции дали положительный результат.

В дробном методе анализа используются определенные приемы для устранения мешающего влияния посторонних элементов: маскирование ионов, реакции окисления-восстановления и т.д., а также широко используются селективная экстракция с последующей рекстракцией различными органическими реактивами после переведения катиона в то или иное соединение, или в комплексе. Среди качественных реакций большое место отведено микрокристаллоскопическим реакциям, как наиболее чувствительным, специфичным и доказательным.

В основу методов количественного определения элементов положены те же реакции, методики и приемы, что для качественного обнаружения.

Исследование минерализата с осадком.

Минерализат, полученный после процесса денитрации, может представлять собой прозрачную бесцветную или окрашенную жидкость, или может содержать осадок.

Наличие осадка является свидетельством присутствия в минерализате сульфатов бария и свинца, или их смеси.

При проведении анализа такого минерализата его фильтруют через бумажный фильтр и используют для дальнейшего анализа на другие катионы, за исключением ртути, сурьмы и таллия.

Осадок на фильтре промывают горячим подкисленным раствором аммония ацетата в чистую колбу. При этом в фильтрате остаются катионы свинца, на которые проводят предварительную реакцию образования дитизоната свинца в хлороформном слое (при рН 7-10) (П.О. 0,05 мкг/мл).

При больших количествах осадка свинца сульфата (свыше 2 мг) или большом объеме водной фазы (2 мл и более), полученной после разрушения комплекса свинца с дитизоном проводят макрохимические реакции,

получение сульфида свинца (при рН 5), получение сульфата свинца, хромата свинца, реакция с йодидом калия (П.О. макрохимических реакций 0,2 мг свинца в 100 г биологического объекта).

При малом объеме водной фазы (0,5 мл) или малом количестве осадка свинца (менее 2 мг) проводят микрокристаллоскопические реакции: образование гексанитрита калия, свинца и меди (П.О. 0,03 мкг свинца в пробе), а так же образование двойной соли йодида цезия и свинца (П.О. 0,01 мкг свинца в пробе).

Оставшийся после промывки фильтра аммония ацетатом осадок проверяют на наличие ионов бария, проводя реакцию перекристаллизации сульфата бария (П.О. 0,05 мкг в исследуемой пробе) и растворение сульфата бария через восстановление (П.О. 0,03 мкг в пробе)

При анализе фильтрата на наличие других катионов, сначала проводят процесс рекстракции катионов висмута, цинка, кадмия с использованием диэтилдитиокарбамата натрия (ДДТК-Na). Если процесс рекстракции не проводить, то катионы, присутствующие в минерализате, будут мешать дальнейшему исследованию на наличие висмута, цинка и кадмия.

Для **висмута** процесс проводят при рН 12, экстрагируя ДДТК-Vi хлороформом, а затем рекстрагируют азотной кислотой. С рекстрагентом проводят реакции на висмут: с 8-оксихинолином в хлористоводородной кислоте в присутствии калия йодида (П.О. 0,005 мкг в исследуемом объеме), и тиомочевинной (П.О. 0,005 мкг/мл исследуемого раствора), с бруцином и бромидом калия (0,4 мкг/мл исследуемого раствора).

Для **цинка** процесс проводят при рН 8,5, экстрагируя ДДТК-Zn хлороформом, а затем рекстрагируют хлористоводородной кислотой. С рекстрагентом проводят дальнейшие исследования. Обнаружение цинка проводят реакциями с дитизоном в хлороформе (при рН 4,5 – 5) (П.О. 5 мг/100 г объекта), образования сульфида цинка, феррицианида цинка (при рН 5), с тетрароданомеркуратом аммония (П.О. реакций 0,5 мг/100 г объекта).

Для **кадмия** процесс проводят при рН 12, экстрагируя ДДТК-Cd хлороформом, а затем рекстрагируют хлористоводородной кислотой. С рекстрагентом проводят дальнейшие исследования. На катион кадмия выполняют реакции получения сульфида кадмия (П.О. 50 мкг в исследуемой пробе), феррицианида кадмия (П.О. 4 мг/100 г объекта), с бруцином и бромидом калия (П.О. 0,12 мкг в пробе), с пиридином и бромидом калия (П.О. 0,05 мкг в пробе).

На катион **марганца** проводят реакции окисления персульфатом аммония (П.О. 0,1 мг в пробе) и калия перйодатом в кислой среде (П.О. 0,02

мг в пробе). Проведение реакции окисления персульфатом аммония проходит в присутствии катализатора – серебра нитрата. Добавление натрия дигидрофосфата необходимо для устранения влияния мешающих определению катионов железа и сурьмы.

Обнаружение катионов **хрома** проводят по реакциям окисления хрома (III) до хрома (VI) персульфатом аммония (П.О. 2 мкг/мл минерализата) с последующим взаимодействием хрома с дифенилкарбазидом (при pH 1,7) (П.О. 0,2 мкг/мл минерализата).

Катионы **серебра** обнаруживают по реакции образования дитизоната серебра в хлороформе (при pH 1 – 2) (П.О. 0,04 мкг/мл в минерализате). Дитизонат серебра способен разрушаться при встряхивании его с кислотой хлористоводородной, что и позволяет отличить его от дитизоната ртути. При положительной реакции с дитизоном на наличие катионов серебра, его выделяют из минерализата в виде хлорида серебра. Полученный осадок хлорида серебра отфильтровывают и растворяют в аммиаке. С аммиачным раствором проводят реакции с дихроматом калия (П.О. 0,15 мкг в пробе), микрокристаллическую реакцию образования кристаллов аммиачного комплекса хлорида серебра (П.О. 0,05 мг в пробе), с тиомочевинной и пикратом калия (П.О. 0,03 мкг в пробе), с хлоридами золота и рубидия (П.О. 0,1 мкг в пробе).

Присутствие **меди** определяют по реакции реакцией с ДДТК-Pb (при pH 3) в хлороформном слое (П.О. 0,5 мкг/мл исследуемом растворе). После разрушения комплекса ДДТК-Cu проводят реакции образования ферроцианида меди и кадмия (П.О. 0,1 мкг/мл исследуемого раствора), пиридин-роданового комплекса (П.О. 1 мкг/мл исследуемого раствора) и реакцию с тетрароданомеркуратом аммония и сульфатом кадмия (П.О. 0,1 мкг/мл исследуемого раствора).

Катионы **сурьмы** и **таллия** определяют по реакции с малахитовым (бриллиантовым) зеленым (П.О. 0,05 мкг/мл сурьмы и 0,03 мкг/мл таллия в исследуемом растворе), с тиосульфатом натрия (П.О. 0,01 мг сурьмы в исследуемом объеме минерализата), с дитизоном (П.О. 0,1 мкг/мл таллия в исследуемом растворе).

Обнаружение **мышьяка** проводят по реакции Зангера-Блека (П.О. 0,02 мг или 0,1 мкг в 2 мл минерализата) и в аппарате Марша (П.О. 0,01 мкг при разведении 1:1000000).

Для обнаружения **ртути** проводят реакции с дитизоном (П.О. 0,05 мкг/мл в исследуемом растворе), с йодидом меди (П.О. 1 мкг в исследуемом объеме).

Исследование минерализата

«Металлические яды»	Исследования	
	Предварительные	Подтверждающие
Свинец	С дитизоном	Образование двойной соли йодида цезия и свинца или реакции с йодидом и дихроматом калия
Магний	С калия периодатом	С аммония персульфатом
Хром	С дифенилкарбазидом	Образование надхромовых кислот
Серебро	С дитизоном	Образование хлорида серебра
Висмут	С 8-оксихинолином или тиомочевинной	С калия бромидом и бруцином
Цинк	С дитизоном	Образование цинка сульфида
Мышьяк	Проба Зангера-Блека	Реакция Марша
Сурьма	С бриллиантовым или малахитовым зеленым	Образование сульфида сурьмы
Медь	С диэтилдитиокарбаматом свинца	С пиридинродановым реактивом
Таллий	С бриллиантовым или малахитовым зеленым	Образование дитизоната таллия
Кадмий	С диэтилдитиокарбаматом натрия	Образование сульфида кадмия

I. Определение свинца и бария в минерализате.

Осадок, выделенный из минерализата фильтрованием, промывают 15-20 мл 0,2 М раствора серной кислоты, 10 мл воды, обрабатывают кипящим раствором аммония ацетата (при значительном осадке – 3 раза по 5 мл, при незначительном – 1-2 мл).

Обнаружение иона свинца.

1. Выделение свинца в виде дитизоната.

К 0,5 мл фильтрата добавляют 1 мл 10% раствора гидроксиламина солянокислого, устанавливают рН 7,5 - 8 (по универсальному индикатору) с помощью 10% раствора аммиака, добавляют 5 мл хлороформа и по каплям

0,01% раствор дитизона в хлороформе (зеленый цвет). При наличии иона свинца хлороформный слой приобретает пурпурно-красное окрашивание.

Экстракцию свинца дитизоната производят хлороформом при энергичном взбалтывании в течение 30 секунд. Хлороформный слой отделяют, свинца дитизонат разрушают, промывая его в течение 1 минуты 1М раствором азотной кислоты.

Водный слой отделяют и усредняют добавлением 1М раствора натрия гидроксида (или аммония гидроксида) до рН 5,0 (по универсальному индикатору), делят на части, с которыми проводят следующие реакции.

2. Реакция получения свинца сульфида.

К части полученного раствора (0,5 мл), помещенного на предметное стекло, добавляют 3-5 капель натрия сульфида, при наличии иона свинца наблюдается появление черного окрашивания (мути) или черного осадка.

3. Реакция образования свинца сульфата.

К части раствора (0,5 мл), помещенного на предметное стекло, добавляют 3 - 5 капель 10% раствора серной кислоты; при наличии иона свинца появляется белый осадок или белая муть, увеличивающаяся при добавлении двойного объема этилового спирта.

Полученный осадок растворяется при добавлении к нему по каплям 10% раствора натрия гидроксида или насыщенного раствора натрия ацетата.

4. Реакция образования свинца хромата.

К части раствора (0,5 мл), помещенного на предметное стекло с подложенным под него куском белой бумаги, смешивают с 10% раствором калия хромовокислого или двуххромовокислого; при наличии иона свинца образуется желтый осадок свинца хромата, растворимый в растворе натрия гидроксида.

5. Реакция с калия йодидом.

К части раствора (0,5 мл) добавляют несколько капель 5 % раствора калия йодида. При наличии ионов свинца выпадает желтый осадок свинца йодида, который растворяется при нагревании и вновь появляется в виде желтых пластинок при охлаждении.

Оставшуюся часть водного раствора распределяют на 2 предметных стекла и жидкость упаривают досуха при осторожном нагревании на пламени горелки.

6. Реакция получения двойной соли цезия и свинца.

К сухому остатку добавляют 1—2 капли хлористоводородной кислоты (1 М раствор) и несколько кристаллов калия йодистого, после растворения осадка туда же вносят 1—2 кристалла цезия хлорида, через 10-15 минут при

наличии свинца наблюдают игольчатые кристаллы желто-зеленого цвета, собранные в сфероиды.

7. Реакция получения калия, меди и свинца гексанитрита.

Остаток смешивают с 1-2 каплями насыщенного раствора меди ацетата и осторожно выпаривают досуха, затем растворяют его в 2-3 каплях 30% раствора уксусной кислоты, в полученный раствор вносят несколько кристалликов калия азотнокислого: при наличии ионов свинца через 5-10 минут появляются характерные кристаллы в форме кубов черного или коричневого цвета.

Обнаружение иона бария.

К одной капле исследуемого минерализата, помещенной на предметное стекло, добавляют 1 каплю 2 М раствора серной кислоты и оставляют на некоторое время. Воду из реакционной смеси удаляют фильтровальной бумагой, осадок разделяют на 2 части, подвергают дальнейшему исследованию.

1. Реакция перекристаллизации бария сульфата.

К части осадка на предметном стекле добавляют 1-2 капли концентрированной серной кислоты, смесь нагревают на пламени горелки до появления белых паров и затем еще в течение 1 минуты. При последующем охлаждении капли образуется кристаллический осадок, имеющий при рассматривании под микроскопом вид пластинок и сростков из них в виде мелких косых крестов.

2. Реакция перевода бария сульфата в бария йодат.

Часть осадка на платиновой проволоке вносят на несколько секунд в несколько капель 10% раствора хлористоводородной кислоты, помещенной на предметное стекло, затем – в пламя горелки. Подобные операции повторить 2-3 раза. При наличии бария пламя горелки окрашивается в зеленый цвет. К полученному на предметном стекле раствору бария хлорида добавляют 2 капли 10% раствора калия йодата: при наличии иона бария выпадает характерный микрокристаллический осадок йодата бария (см. приложение).

II. Определение катионов в минерализате.

Обнаружение иона марганца.

1. Реакция окисления марганца калия перйодатом.

К 1 мл исследуемого минерализата добавляют 4 мл воды, 1 мл насыщенного раствора однозамещенного натрия фосфата, 0,2 г калия перйодата и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 минут. При

наличии иона марганца наблюдается розовая или красно-фиолетовая окраска раствора.

2. Реакция окисления марганца аммония персульфатом.

К 1 мл исследуемого минерализата в пробирке добавляют 4 мл воды, 1 мл насыщенного раствора однозамещенного натрия фосфата и нагревают 5-6 минут. Затем в горячий раствор добавляют каплю 10% раствора серебра азотнокислого, 0,5 г аммония персульфата и вновь нагревают до полного прекращения выделения пузырьков газа. При наличии иона марганца наблюдается розовая или красно-фиолетовая окраска раствора.

Обнаружение иона хрома.

1. Реакция с дифенилкарбазидом.

К 1 мл исследуемого минерализата добавляют 4 мл воды, 1 каплю 10% раствора серебра нитрата, 0,5 г аммония персульфата и нагревают 20 минут на кипящей водяной бане. При этом жидкость приобретает желтую окраску. Затем к жидкости добавляют 1 мл насыщенного раствора однозамещенного натрия фосфата, по каплям 10% раствор калия (натрия) гидроксида до pH 1,5 - 1,7 и 0,1 мл 0,25% раствора дифенилкарбазида: при наличии хрома появляется окрашивание от светло-розового до красно-фиолетового.

2. Реакция образования надхромовых кислот.

К 5 мл исследуемого минерализата в пробирке добавляют по каплям 30% раствор натрия гидроксида до pH 7 (по универсальному индикатору), 1 каплю 10% раствора серебра азотнокислого, 0,5 г аммония персульфата, реакционную смесь нагревают на кипящей водяной бане 20 минут, охлаждают, добавляют 1 мл насыщенного раствора однозамещенного натрия фосфата. При pH=1,7 добавляют этилацетат до слоя 0,5 см, 2-3 капли 25% раствора перекиси водорода, содержимое пробирки встряхивают: при наличии хрома слой органического растворителя приобретает голубую или интенсивно синюю окраску.

Обнаружение иона серебра.

1. Реакции образования серебра дитизоната.

В делительную воронку помещают 5 мл исследуемого минерализата, при pH 1 – 2 (можно добавить 1 мл 8М серной кислоты) добавляют 5 мл хлороформа и по каплям 0,01% раствор дитизона в хлороформе - при встряхивании появляется золотисто-желтое окрашивание хлороформного слоя.

В случае сохранения зеленой окраски хлороформного слоя его отделяют, промывают 0,1% раствором аммония гидроксида (для удаления избытка

дитизона), после чего возможно появление золотисто-желтого окрашивания. *Похожую окраску может дать ртути дитизонат!*

Для отличия серебра дитизоната от ртути дитизоната окрашенный хлороформный слой обрабатывают при энергичном встряхивании 5 мл 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты. Серебра дитизонат в этих условиях разрушается, и золотисто-желтая окраска хлороформного слоя переходит в зеленую.

2. Реакция образования серебра хлорида.

К 5 мл исследуемого минерализата добавляют 0,05 - 0,5 г натрия хлорида. При наличии иона серебра образуется белый осадок или муть.

Жидкость нагревают до кипения, дают осадку скоагулировать, отделяют, промывают его один раз водой и растворяют в 0,5 – 2,5 мл 25% раствора аммония гидроксида.

Аммиачный раствор исследуют следующими реакциями:

а) каплю раствора помещают на предметное стекло, закрывают сверху часовым стеклом и капле дают медленно (без нагревания) испариться. При наличии серебра появляются мелкие прозрачные кристаллы в виде кубов, октаэдров и четырехугольников (см. приложение).

б) каплю исследуемого раствора выпаривают, на сухой остаток наносят по 1 капле насыщенных растворов тиомочевины и пикриновой кислоты. При наличии серебра появляются желтые игольчатые кристаллы и сростки из них в виде розеток.

в) 2 - 3 капли полученного аммиачного раствора выпаривают на предметном стекле до полного удаления аммиака. С противоположных концов исследуемой капли подводят капли раствора золотохлористоводородной кислоты и рубидия хлорида (в концентрированной хлористоводородной кислоте). Образуются призматические кристаллы темно-красного цвета и сростки из них.

г) к 2 – 3 каплям полученного раствора добавляют 10% раствор уксусной кислоты до кислой реакции среды (по универсальному индикатору) и вносят кристалл дихромата или хромата калия. Наблюдается появление красного или красно-бурого окрашивания и кристаллического осадка (см. приложение).

Обнаружение иона меди.

1. Выделение меди из минерализата.

К 10 мл фильтрата, полученного после выделения хлорида серебра, прибавляют 25% раствор аммиака до pH 3 (по универсальному индикатору) и встряхивают с 5 мл хлороформного раствора свинца диэтилдитиокарбамата.

При наличии меди хлороформный слой окрашивается от желтого до коричневого цвета.

Хлороформный слой отделяют и промывают 6 М раствором хлористоводородной кислоты (30 сек.) для удаления избытка ДДТК-Рb, а затем дистиллированной водой. После промывания к хлороформному слою прибавляют 1% раствор ртути (II) хлорида до тех пор, пока не наступит обесцвечивание хлороформного слоя. Затем к полученному бесцветному раствору прибавляют 1 мл воды и интенсивно взбалтывают. Через 2 минуты водный слой отделяют и делят на части для проведения качественных реакций.

2. Реакция образования меди и цинка тетрароданомеркуриата.

К части исследуемого реэкстракта (0,5 мл) добавляют несколько капель 5% раствора цинка сульфата и несколько капель раствора аммония тетрароданомеркуриата (II). В присутствии меди осадок окрашивается в розовато-лиловый цвет.

3. Реакция образования меди и кадмия ферроцианида.

К части исследуемого реэкстракта (0,5 мл) добавляют 10 капель 2% раствора кадмия хлорида и 1—2 капли 5% раствора калия ферроцианида. При наличии меди осадок окрашивается в лиловый цвет.

4. Реакция образования пиридинроданового комплекса меди.

К части исследуемого реэкстракта (0,5 мл) добавляют по каплям (1—2 мл) пиридинродановый реактив до получения осадка или мути, 1 мл хлороформа. При наличии меди хлороформный слой приобретает изумрудно-зеленую окраску.

Обнаружение иона кадмия.

1. Выделение кадмия из минерализата.

К 10 мл минерализата в делительной воронке добавляют несколько капель 10% раствора калия гидроксида до pH 12, затем 2 – 3 мл 1% раствора ДДТК-Na, 10 мл хлороформа и встряхивают. Отделяют хлороформный слой и переносят его в другую делительную воронку, где энергично встряхивают в течение 30 сек. с 3 мл 1М кислоты хлористоводородной, затем отделяют водную фазу, с которой проводят реакции обнаружения кадмия.

2. Реакция образования кадмия сульфида.

К 1 мл исследуемого реэкстракта добавляют по каплям 10% раствор натрия (калия) гидроксида до pH 5 (по универсальному индикатору) и 3 - 4 капли свежеприготовленного натрия сульфида. Образуется осадок или муть желтого цвета. (При отрицательной реакции дальнейшие исследования на кадмий не проводят).

3. Реакция образования кадмия ферроцианида.

К 1 мл исследуемого резкстракта добавляют раствор калия гидроксида до рН 5 и 2—3 капли калия ферроцианида: наблюдается осадок или муть белого цвета.

4. Микрокристаллоскопическая реакция с пиридином и калия бромидом.

2—3 капль исследуемого резкстракта выпаривают на предметном стекле, на сухой остаток наносят каплю 5% раствора калия бромида и каплю пиридина: образуются бесцветные призматические кристаллы и сростки из них в виде сфероидов (см. приложение).

5. Микрокристаллоскопическая реакция с бруцином и натрия бромидом.

На предметное стекло наносят 3 – 5 капль резкстракта и испаряют досуха. Прибавляют к сухому остатку каплю насыщенного раствора бруцина в 0,5 М растворе кислоты серной и 1 каплю 5% раствора натрия бромида. В присутствии ионов кадмия образуются бесцветные призматические кристаллы в виде сфероидов (см. приложение). При добавлении к осадку йодида калия цвет кристаллов не изменяется (в отличие от висмута).

Обнаружение иона висмута.

1. Реакция с тиомочевинной.

К 1 мл исследуемого минерализата добавляют 0,5 мл насыщенного водного раствора тиомочевины. В присутствии висмута образуется лимонно-желтое окрашивание.

2. Реакция с оксихинолином в присутствии калия йодида (основная реакция).

К 10 мл исследуемого минерализата добавляют 0,5 г аскорбиновой кислоты (или 20—30 капль 20% раствора натрия тиосульфата) до образования и исчезновения фиолетового окрашивания, затем добавляют 0,5 г калия-натрия тартрата и 1 мл 10 % раствора калия йодида до образования желтого или оранжевого окрашивания калия йодвисмутата. Дальнейшее добавление нескольких капль 2% раствора оксихинолина в 5% растворе хлористоводородной кислоты приводит к образованию яркого оранжево-красного осадка оксихинолинового комплекса висмута йодида.

Если количество висмута в 100 г объекта менее 2 мг и осадок не образуется, к реакционной смеси добавляют 1 мл смеси ацетона и амилацетата (1:1), при встряхивании раствора осадок растворяется в органическом растворителе, окрашивая последний от желтого до малинового цвета.

3. Выделение висмута из минерализата.

К 10 мл минерализата в делительной воронке добавляют 30% раствор натрия гидроксида до рН 14 (по универсальному индикатору), 2 мл 1%

раствора ДДТК-Na, 10 мл хлороформа и энергично встряхивают. После отделения хлороформного слоя к нему прибавляют 3 мл 4 М раствора кислоты азотной, встряхивают в течение 1 минуты и отделяют хлороформный слой.

Водную фазу исследуют на наличие висмута по реакции с тиомочевинной и микрокристаллическими реакциями

4. Микрокристаллическая реакция с цезия хлоридом и калия йодидом.

Несколько капель исследуемого минерализата выпаривают на предметном стекле досуха, затем остаток растворяют в одной капле раствора натрия-калия тартрата, добавляют одну каплю концентрированной хлористоводородной кислоты и небольшой кристалл цезия хлорида; при добавлении нескольких кристаллов калия йодида образуются окрашенные в оранжевый цвет кристаллы в виде многоугольников.

5. Микрокристаллическая реакция с калия бромидом и бруцином.

1 – 2 капли реэкстракта выпаривают на предметном стекле досуха. К сухому остатку прибавляют каплю насыщенного раствора бруцина в разбавленной серной кислоте и 1 каплю 5% раствора калия бромида. В присутствии ионов висмута образуются зеленоватые игольчатые кристаллы в виде сфероидов (см. приложение). При добавлении к осадку йодида калия цвет кристаллов изменяется на красный.

Обнаружение иона цинка.

1. Реакция образования дитизоната цинка.

К 0,5 мл исследуемого минерализата добавляют 0,5 мл насыщенного раствора тиомочевинны или 2 капли насыщенного раствора натрия тиосульфата, устанавливают рН 4,5 — 5,0 (по универсальному индикатору), добавляют 1 мл ацетатного буфера (рН 5), 2 капли 0,01% раствора дитизона в хлороформе и 1 мл хлороформа. Смесь энергично взбалтывают, при наличии цинка хлороформный слой приобретает окрашивание от розового до красно-фиолетового.

2. Выделение цинка из минерализата.

К 10 мл минерализата в делительной воронке прибавляют 10% раствор натрия гидроксида до рН 8,5 (по универсальному индикатору). Затем добавляют 3 мл 1% раствора ДДТК-Na и 5 мл хлороформа, сильно встряхивают. Отделяют хлороформный слой и встряхивают с 3 мл 1М раствора хлористоводородной кислоты. водное извлечение отделяют и делят на части для проведения подтверждающих реакций.

3. Реакция образования цинка сульфида.

К 1 мл исследуемого реэкстракта добавляют 10% раствор калия гидроксида до создания рН 5 (по универсальному индикатору), 3-4 капли свежеприготовленного раствора натрия сульфида. Образуется осадок белого цвета или муть.

4. Реакция образования цинка ферроцианида.

К 1 мл исследуемого реэкстракта добавляют 10% раствор калия гидроксида до создания рН 5, 3-4 капли раствора калия ферроцианида. Образуется осадок или муть белого цвета.

5. Реакция образования цинка тетраданомеркуриата.

3-4 капли исследуемого реэкстракта помещают на предметное стекло и выпаривают досуха. Остаток растворяют в капле 10% раствора уксусной кислоты и добавляют каплю раствора аммония тетраданомеркуриата.

Через несколько минут под микроскопом в присутствии цинка наблюдают характерные сростки кристаллов в виде дендритов (см. приложение).

Обнаружение иона сурьмы.

1. Реакция окрашивания с малахитовым зеленым.

1 мл исследуемого минерализата помещают в делительную воронку, добавляют 4 мл раствора 40% серной кислоты, 3 мл 5М раствора хлористоводородной кислоты, 2 капли 5% раствора натрия нитрита, 7 капель 0,5% спиртового малахитового зеленого, 1 - 2 г безводного натрия сульфата и 5 мл толуола. Смесь энергично встряхивают в течение 15 сек. *Слой толуола окрашивается при наличии сурьмы и таллия в голубой цвет, водный слой — в оранжевый цвет.*

Слой органического растворителя отделяют, к нему добавляют 3 мл 25% раствора серной кислоты и встряхивают жидкость в течение 5 секунд. *Если окраска обусловлена наличием сурьмы и таллия, голубая окраска слоя толуола сохраняется.*

2. Реакция образования сурьмы сульфида.

К 10 мл исследуемого минерализата прибавляют 5 капель насыщенного водного раствора натрия тиосульфата, жидкость кипятят в течение 1—2 минут. При наличии сурьмы выпадает осадок, принимающий через 5- 10 минут характерную оранжевую окраску.

Обнаружение иона таллия.

1. Реакция окрашивания с малахитовым зеленым, (см. реакцию сурьмы с малахитовым зеленым).

2. Реакция образования таллия дитизоната.

В делительную воронку помещают 5 мл исследуемого раствора, добавляют по 2 мл 20% раствора лимонной кислоты, 10% раствора гидроксиламина сульфата и 5% раствора калия цианистого, затем добавляют 3 М раствор аммиака до рН 11—12 (по универсальному индикатору), энергично встряхивают и добавляют еще 1-3 мл 3 М раствора аммиака, 2 - 3 мл 0,01% раствора дитизона в хлороформе. При встряхивании зеленый слой хлороформа окрашивается в красный или фиолетовый цвет. Хлороформный слой отделяют от водного и промывают смесью 1% раствора калия цианистого и 0,3 М аммиака (1:1). В присутствии таллия слой хлороформа окрашен от розового до малиново-красного цвета.

Обнаружение иона мышьяка.

1. Реакция Зангера-Блека (проводить под тягой!).

2 мл исследуемого минерализата помещают в колбу прибора Зангера-Блека, туда же добавляют 5 мл 4 н раствора серной кислоты, 2 мл воды и 1 мл 10% раствора олова хлорида в концентрированной серной кислоте. Туда же помещают 2,0 г купрированного цинка, прибор закрывают пробкой с насадкой, куда устанавливается реактивная бумажка, обработанная ртутным бромидом (хлоридом) и высушенная. В горлышке насадки ниже бумажки вставлен тампон из ваты, обработанный раствором свинца ацетата и высушенный.

Через 1 час, в зависимости от количества мышьяка, наблюдают изменение окраски реактивной бумажки. Бумажка окрашивается сначала в желтый, а затем — в бурый цвет.

Если пятно не появится в течение 1 часа, то бумагу опускают в 3% раствор калия йодида. При этом бумага приобретает красноватую окраску. Затем бумагу опускают в насыщенный раствор калия йодида. При наличии мышьяка в минерализате на бумаге остается желтое или коричневатое пятно, красноватая окраска вокруг него исчезает.

2. Реакция Марша.

Подготовка аппарата Марша. В реакционную колбу вносят 10 г купрированного цинка. Хлоркальциевую трубку наполняют прокаленным хлоридом кальция.

Все части прибора соединяют встык, закрепляют в штатив. В капельную воронку наливают 50 мл 4 н. раствора серной кислоты, которую затем из капельной, воронки спускают в реакционную колбу небольшими порциями. В течение 15—20 минут образующийся водород вытесняет из прибора воздух. Чтобы убедиться в этом, над концом восстановительной трубки помещают опрокинутую узкую пробирку. Через несколько минут (5—7) к

ней, не перевертывая, подносят зажженную спичку. Если в пробирке содержится только водород, он загорается без звука взрыва.

После вытеснения из прибора воздуха, аппарат закрывают полотенцем и зажигают выделяющийся водород. Восстановительную трубку аппарата нагревают в одной из широких частей до слабо-красного каления. Суженную часть восстановительной трубки обертывают фитилем из марли, один конец которого находится в чашке с водой, а другой конец опущен в стакан. Время от времени в реакционную колбу из делительной воронки вводят новые порции серной кислоты. Операция продолжается в течение часа, через час отодвигают фитиль и смотрят, не появилось ли в охлаждаемом месте трубки буровато-серого налета металлического мышьяка. Если такого налета нет, в приборе можно производить исследования подготовленной для этой цели жидкости, т.е. использованные реактивы считают судебно-химически чистыми.

К 20 мл минерализата прибавляют 1 мл хлорида олова в концентрированной серной кислоте, жидкость помещают в капельную воронку прибора Марша.

Жидкость небольшими порциями затем спускают в реакционную колбу прибора, продолжая нагревать восстановительную трубку Марша.

Исследование минерализата в аппарате Марша проводят в течение одного часа, проделывая при этом ряд реакций:

а) отмечают, не окрашено ли пламя у конца восстановительной трубки в синеватый цвет, и не ощущается ли запах чеснока, что наблюдается при наличии мышьяковистого водорода.

В пламя у конца восстановительной трубки вносят холодную фарфоровую крышку; при наличии больших количеств мышьяка на фарфоре могут появиться буровато-серые пятна.

б) восстановительную трубку осторожно поворачивают на 180° , конец трубки погружают в 2—5% раствор нитрата серебра, налитый в пробирку и слабо подщелоченный 10% раствором аммиака: при наличии мышьяка наблюдают потемнение или почернение раствора;

в) испытание минерализата в аппарате продолжают в течение часа. По истечении этого времени наблюдают, не появился ли там налет серо-бурого цвета с металлическим блеском;

г) по истечении часа гасят горелку, налет в трубке Марша подвергают дальнейшему исследованию, для чего место налета в восстановительной трубке осторожно нагревают на маленьком пламени горелки. На холодных частях трубки при наличии мышьяка образуется белый налет;

д) налет рассматривают под микроскопом, а трубку с ним представляют при акте химико-токсикологического исследования преподавателю.

После проведения реакций заполнить таблицу.

Исследуемый катион	Реакция обнаружения	Эффект и химизм реакции

Вопросы для самоконтроля

1. Каким превращениям подвергаются при нагревании в присутствии органических веществ серная, азотная и хлорная кислоты? Какова их роль в процессе минерализации?
2. Какие методы минерализации биологического материала существуют, сравнить их преимущества и недостатки?
3. Сравните два способа изолирования «металлических» ядов, исходя из времени, затрачиваемого на проведение минерализации, и их доступности.
4. Какими преимуществами по сравнению с методом обработки хлором в момент выделения или методом разрушения серной кислотой и нитратом аммония обладают рассматриваемые методы?
5. Как определить окончание минерализации при обработке биологического материала серной и азотной кислотами и серной, азотной и хлорной кислотами?
6. С какой целью минерализат испытывают с раствором дифениламина в концентрированной серной кислоте?
7. С какой целью проводят пробу с концентрированным раствором аммиака в минерализате, полученной после обработки биологического материала серной, азотной и хлорной кислотами?
8. Какое значение имеет удаление окислителей для дальнейшего хода судебно-химического исследования?
9. В чем заключается сущность процесса денитрации?
10. Что такое нитрозилсерная кислота (в судебно-химическом отношении)?
11. Какие химические вещества применяются в судебно-химической практике в целях денитрации минерализата?
12. Какие газообразные вещества выделяются из минерализата при действии на него формалина, натрия сульфита, мочевины?

Содержание

Лабораторная работа	Страницы
Правила безопасной работы в лаборатории	3
Лабораторная работа № 1 Предварительные испытания объектов химико-токсикологического анализа	4
Лабораторная работа № 2 Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды» Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром. Алкилгалогениды	9
Лабораторная работа № 3 Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды» Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром. Кислородсодержащие соединения	12
Лабораторная работа № 4 Химико-токсикологический анализ группы веществ, изолируемых дистилляцией «летучие яды» Анализ веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром. Спирты	17
Лабораторная работа № 5 Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией (лекарственные средства, некоторые алкалоиды)	28
Лабораторная работа № 6 Химико-токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией органическими растворителями (фосфорсодержащие пестициды)	34
Лабораторная работа № 7 Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых экстракцией водой в сочетании с диализом	39
Лабораторная работа № 8 Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых экстракцией водой в сочетании с диализом «Определение содержания нитратов в биологическом объекте»	48
Лабораторная работа № 9 Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемых минерализацией Дробный метод анализа «металлических ядов».	52

Татьяна Леонидовна Талызина
Виктор Васильевич Талызин

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 10.12.2015 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 3,95. Тираж 50 экз. Изд. № 4180.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ