

Методы определения основных групп токсических веществ ХТА.

Этапы химико-токсикологического анализа:

- I. **Изолирование:** токсических веществ из биологического материала (метод экстракции/настаивания);
- II. **Очистка ТВ** от балластных веществ (белков тканей, пигментов, липидов, гормонов и т.д.);
- III. **Микрохимический анализ :** качественное обнаружение, микрокристаллоскопия
- IV. **Количественное обнаружение ТВ**— титрование, методы хроматографии (жидкогазовая хроматография, хроматография в тонком слое сорбента), спектральная характеристика, полярография и люминесцентный анализ (хинин, алкалоиды тропана, спорыньи, секуринин)
- V. **Биологическая проба** (на мышках, стилонихиях)

Классификация токсических веществ по методам изолирования(экстрагирования):

I. веществ органической природы применяют: —

- изолирование дистилляцией с водяным паром;
- — изолирование подкисленным 96° или 70" этиловым спиртом (алкалоиды, ряд синтетических веществ, гликозиды); —
- изолирование подкисленной водой (алкалоиды, синтетические лекарственные вещества и др.);
- изолированно подщелоченной водой (некоторые органические кислоты, вещества фенольного характера);
- изолирование различными органическими растворителями (остаточные количества пестицидов и др.).

II. Для изолирования веществ неорганической природы используются:

- — минерализация (соединения металлов и мышьяка);
- — диализ (кислоты, щелочи)
- озоление – особые способы выделения(фториды, кремнефтористые соединения).

Методы очистки вытяжек от балластных веществ.

- Очистка вытяжек от балластных веществ достигается несколькими способами:
- осаждением примесей различными реагентами (солями, кислотами, спиртами)
- возгонка (барбитураты, салициловая и бензойная кислоты и некоторые алкалоиды);
- Реэкстракция;
- Диализ, элетродиализ ,Электрофорез;
- Фильтрование;
- Центрифугирование;
- хроматография в тонком слое сорбента;

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИКАНТОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ВОДОЙ

К группе веществ, изолируемых экстракцией водой:

- минеральные кислоты: серная, азотная и хлористоводородная;
- щелочи (гидроксиды калия, натрия), гидроксид аммония;
- некоторые соли, имеющие токсикологическое значение: **нитрит натрия** (реже калия), **нитраты натрия и аммония** (реже калия), **натрия хлорид**.

Пат. Материал: желудки, рвотные массы, остатки пищи, печень.

Изолирование минеральных кислот, щелочей и солей из биологического материала.

1 этап экстракция : Подлежащие исследованию объекты измельчают и прибавляют к ним дистиллированную воду до получения кашицеобразной массы, которую оставляют на 1-2 ч,

II этап: Методы очистки **фильтрование, центрифугирование, диализ, электродиализ**

Для ускорения фильтрования применяют воронки или стаканчики с пористым дном, которые через соответствующие приспособления присоединяют к водоструйному насосу.

- Для более полного освобождения вытяжек из биологического материала от белковых веществ и некоторых других примесей применяют **метод диализа.**

Диализ- разделение растворённых веществ, различающихся молекулярными массами.

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). Для диализа используют нитро и ацетилцеллюлозные мембраны.

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.

Диализ объекта проводят 2-3 раза по 4- 6 часов.

Полученные диализаты выпаривают на водяной бане до объёма 5-10 мл и исследуют на наличие кислот, щелочей и солей.

Проводят рН-метрию: с индикаторами – лакмус, фенофталеин, конго-красный.

При ярко выраженной кислой реакции диализата проводят исследование на наличие анионов кислот. Обнаружение анионов серной, азотной и соляной кислот не является доказательством отравления кислотами, так как эти анионы могут быть в организме как составная часть органов и тканей.

Для доказательства кислот необходимо отогнать их из диализата и исследовать отгон на наличие свободных кислот, соли этих кислот при этом не отгоняются.

Доказательством отравления едкими щелочами является ярко выраженная щелочная реакция диализата (рН 8-10, индикатор фенолфталеин).

Предварительной пробой на аммиак является посинение красной лакмусовой бумажки от паров вытяжки.

Обнаружение аммиака в биологическом материале может говорить не только об отравлении им, но и об образовании аммиака при гниении трупного материала. При гниении трупного материала кроме аммиака образуется сероводород. Почернение бумажки, пропитанной щелочным раствором уксуснокислого свинца, указывает на наличие сероводорода и на процессы гниения исследуемых объектов, что делает невозможным открытие введённого аммиака.

Качественная реакция :Определение натрия хлорида (поваренной соли) в патологическом материале.

Способы _ - озоление

В фарфоровый тигель или чашку помещают 10 г тщательно измельченного материала (мышцы, внутренние органы, содержимое желудка и др.), подсушивают на водяной бане и переносят тигель в холодную муфельную печь;

Постепенно нагревая муфель до температуры не выше 500°C, обугливают материал до равномерного черного цвета примерно в течение 20 минут от момента появления дыма. Содержимое тигля должно легко распадаться при надавливании стеклянной палочкой.

Содержимое тигля переносят количественно (дистиллированной водой) в химический стакан и нагревают при помешивании до кипения.

Жидкость охлаждают до комнатной температуры, фильтруют в мерную колбу объемом на 100 мл, остаток в стакане промывают небольшим количеством дистиллированной воды и присоединяют смыв к фильтрату.

Фильтрат в колбе доводят до метки, перемешивают и исследуют.

2. В мерную колбу объемом на 100 мл помещают 10 г тщательно измельченного материала, наливают дистиллированной воды на $\frac{3}{4}$ объема, встряхивают и нагревают на водяной бане до 80°C ;

после чего колбу снимают и оставляют на 30 минут периодически перемешивая;

Затем колбу охлаждают под краном до комнатной температуры доливают дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и хорошо перемешивают;

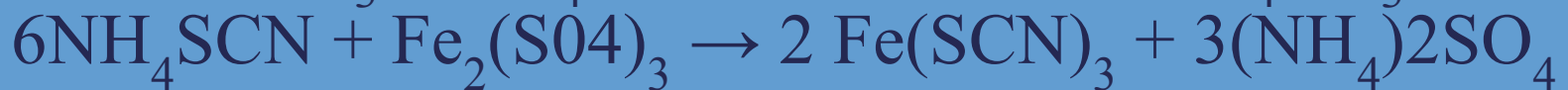
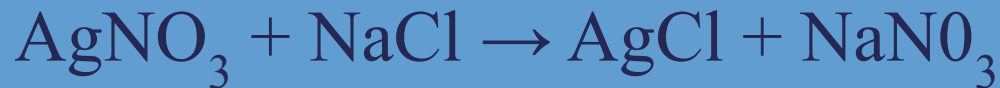
Жидкость фильтруют через сухой складчатый фильтр в сухой стакан или колбу. Первую порцию фильтрата отбрасывают, остальное используют для исследования.

Если вытяжка интенсивно окрашена, то извлечение поваренной соли делают по первому способу.

Количественное определение натрия хлорида обратным титрованием (по Фольгарду).

Метод основан на осаждении хлоридов стандартным раствором азотнокислого серебра, взятым в избытке. Азотнокислое серебро образует с ионом хлора белый осадок хлористого серебра.

Остаток нитрата серебра, не прореагировавшего с хлоридом натрия, оттитровывают стандартным раствором роданистого аммония в присутствии индикатора - железоаммонийных квасцов. При этом последовательно протекают три реакции:



Качественное обнаружение нитратов и нитритов в патологическом материале и кормах

- **Проба с дифениламином**

В маленькую фарфоровую чашечку вносят 10-15 капель концентрированной серной кислоты и затем 1-2 кристаллика дифениламина, который растирают стеклянной палочкой или смешивают путем встряхивания. После этого в чашечку вносят 1-2 капли испытуемой жидкости (фильтрат содержимого желудочно-кишечного тракта, вытяжка из корма и т.п.). При наличии нитритов и нитратов жидкость окрашивается в синий или темно-синий цвет.

- **Дифференциальная проба с дифениламином.**

В колбочку помещают 10-15 г исследуемого материала (растертого корма, содержимого желудка или фильтрата), добавляют к нему 3-5 капель серной кислоты и закрывают колбочку часовым стеклом с висячей каплей 1%-го раствора дифениламина на серной кислоте. При наличии нитритов выделяющиеся окислы азота окрашивают висячую каплю в синий цвет. Нитраты при этом не мешают реакции. Продолжительность пробы не более 30 минут.

Проба с реактивом Грисса (р-р сульфаниловой к-ты и альфа-нафтиламина в уксусной кислоте)

- 1. В пробирку помещают примерно 1-2 мл исследуемого фильтрата или раствора и добавляют около 1 мл реактива Грисса. Если в образце присутствуют нитриты, то появляется темно-красное или розовое окрашивание с образованием осадка. Степень окраски зависит от концентрации присутствующих в фильтрате нитритов.
- 2. Корм тщательно измельчают, помещают в колбочку и заливают равным объемом дистиллированной воды. Колбочку закрывают и дают смеси постоять 15-20 минут, периодически встряхивая. Затем берут 2 мл вытяжки в пробирку и приливают 3 мл реактива Грисса. При наличии нитритов появляется розовый или красный цвет.

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИКАНТОВ ПУТЕМ ПЕРЕГОНКИ С ВОДЯНЫМ ПАРОМ/ДИСТИЛЛЯЦИЕЙ

«Летучие яды» - класс токсичных жидкостей органических веществ высокой липофильности и летучести.

К группе летучих ядов относятся органического вещества с низкой температурой фазового перехода жидкость - пар; изолируемые из биологического материала методом перегонки с водяным паром и методом количественного определения - газовой или газожидкостной хроматографией.

Летучие яды легко абсорбируются через легкие, кожу и желудочно-кишечный тракт. Липофильность растворителей возрастает с увеличением молярной массы, а летучесть при этом уменьшается.

Классы летучих ядов различной химической природы:

- алифатические углеводороды и их галогенопроизводные (**хлороформ**; хлоралгидрат; четыреххлористый углерод; дихлорэтан; трихлорэтан; трихлорэтилен; тетрахлорэтилен; метиленхлорид и др.);
- циклические алканы и их галогенопроизводные (гексан, гексахлороциклогексан и др.);
- кетоны (**ацетон** и др.);
- карбоновые кислоты (муравьиная, уксусная кислоты и др.);
- ароматические соединения (бензол; хлорзамещенные производные бензола; нитробензол; толуол; этилбензол и др.);
- фенолы (фенол; крезолы; пентахлорфенол; хлорофенолы и др.);
- простые газообразные вещества (хлор Cl_2 , фтор F_2 и др.);
- летучие оксиды и гидриды (угарный газ CO , диоксид азота NO_2 , фтороводород HF , сероводород H_2S , селеноводород H_2Se , **арсий** AsH_3 , фосфин PH_3 и др.);
- цианид водорода HCN ;
- акрилонитрил $\text{CH}_2=\text{CHCN}$;
- ацетонитрил CH_3CN ;
- диметилформамид $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$.

Из перечисленных соединений согласно действующего до настоящего времени приказа Минздрава СССР №1021 от 25.12.73г., в обязательный круг химико - токсикологического исследования при проведении общего анализа включены:

- 1. Кислота синильная.
- 2. Алкилгалогениды: хлороформ, дихлорэтан.
- 3. Альдегиды: формальдегид.
- 4. Алканолаы: метанол, этанол, пропанол, бутанол, пентанол, изоамиловый спирт.
- 5. Оксипроизводные ароматического ряда: фенол, крезолы.

По физическим свойствам «летучие» яды, в основном, представляют собой летучие жидкости (за исключением таких твердых веществ, как хлоралгидрат, фенол, салициловая кислота, фосфорорганические соединения).

Способность химических соединений перегоняться с водяным паром зависит от их физических свойств. У них у всех разная температура кипения, соответственно при дистилляции с водяным паром температура понижается.

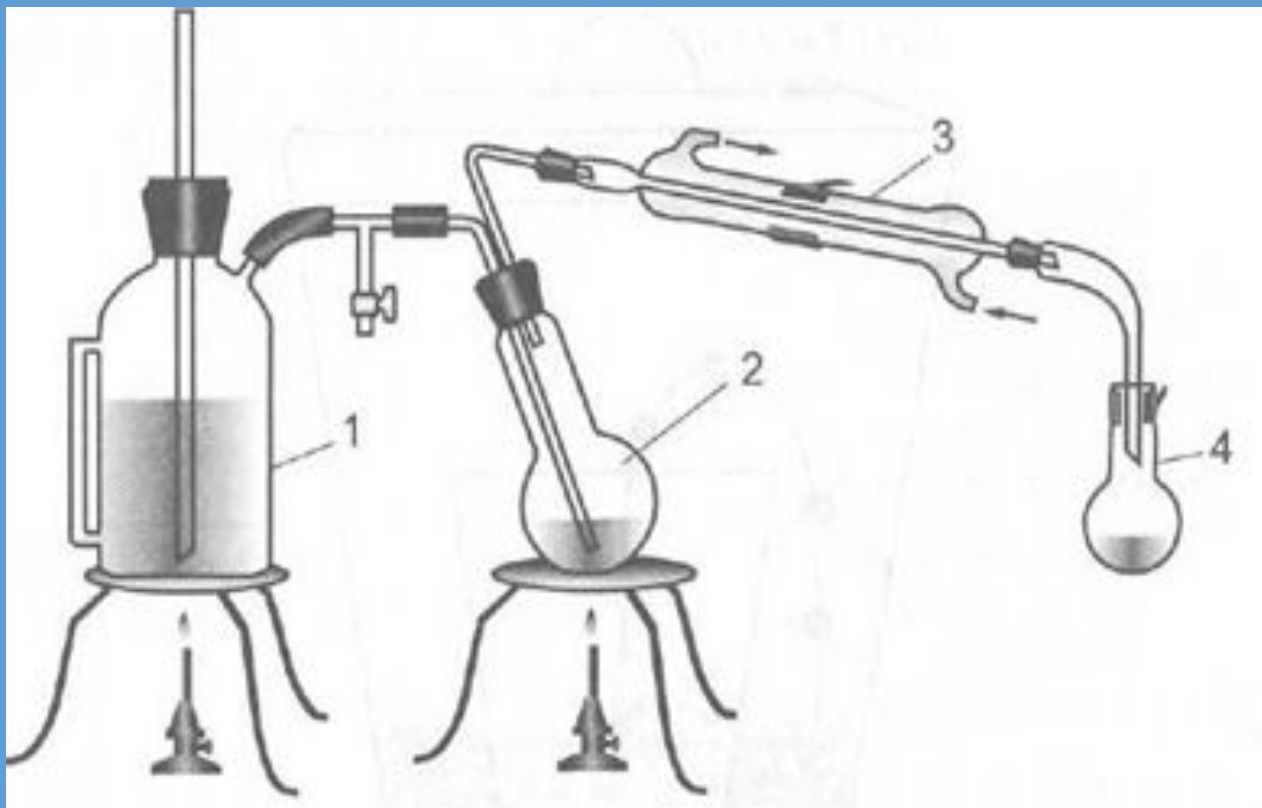
Как пример: анилин в истом виде перегоняется при $t = 184^\circ\text{C}$, а в смеси с водой при $t = 200^\circ\text{C}$).

С водяным паром перегоняются некоторые жидкости, практически не смешивающиеся или ограничено смешивающиеся с водой, азеотропные смеси (их пары тоже не смешиваются).

При перегонке смесей органических веществ большое значение имеет их взаимная растворимость. При этом возможны 3 случая:

- 1 Жидкости взаимно не растворимы, т.е. образуют двухфазную систему. При перегонке с водяным паром одной из фаз является вода(азеотропные соединения)..
- 2. Жидкости ограниченно растворимы друг в друге, т.е. двухфазная система образуется только при определенных соотношениях компонентов. Такую систему образуют с водой толуол, нитробензол, дихлорэтан, тетраэтилсвинец и др.
- 3. Компоненты смешиваются в любых соотношениях, т.е. вещества растворимы в воде, образуется однофазная система. С водой такую систему образуют метанол, ацетон, формальдегид, этиленгликоль, уксусная кислота.

Дистилляция с водяным паром проводится в специальном приборе, который состоит из трех основных частей: герметично соединенных друг с другом: парообразователя; круглодонной колбы с объектом исследования; холодильника; приемник дистиллята.



При перегонке обращают внимание на запах и внешний вид дистиллята

Качественные реакции на цианиды.

Реакция образования берлинской лазури. К части дистиллята (щелочной раствор) добавляют 1-3 капли 40% раствора сульфата железа (II), содержащего следы сульфата железа (III). Смесь взбалтывают, нагревают до кипения, охлаждают и добавляют 10% раствор хлороводородной кислоты до слабокислой реакции. Появление синего окрашивания, а затем синего осадка указывает, что в дистилляте обнаружена синильная кислота (цианиды).

Микрористаллоскопия:

Часть дистиллята испаряют и остаток переносят на предметное стекло.

К сухому остатку добавляют каплю 10% раствора азотной кислоты, по одной капле 1% раствора метиленовой сини и 1% раствора нитрата серебра. Под микроскопом наблюдают образование кристаллов в виде длинных игл и отростков из них голубого цвета

- **Определение фенола**
- **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.
- **Реакция образования индофенола.** К 0,5-7,0 мл исследуемого раствора прибавляют 1 кап. анилина и 2 мл раствора гипохлорита натрия. Появляется грязно-фиолетовая окраска, после прибавления раствора аммиака переходящая в синюю (щелочная соль индофенола).
- **Реакция с хлоридом окисного железа.** 1-2 кап. раствора помещают на фарфоровую пластинку и прибавляют 1-2 кап. свежеприготовленного 5% раствора хлорида железа (III). Появляется сине-фиолетовая окраска, исчезающая от добавления воды, спирта и кислот (отличие от салициловой кислоты).
-
- **Определение ацетона**
- **Реакция образования йодоформа.** К 1 мл исследуемого раствора прибавляют 1 мл 10% раствора аммиака и несколько капель раствора йода в йодиде калия. Образуется желтый осадок йодоформа.
- **Реакция с нитропруссидом натрия.** К 1 мл исследуемого раствора прибавляют 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и 5 кап. свежеприготовленного 1% раствора нитропрусида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание, переходящее при добавлении 10% раствора уксусной кислоты в красно-фиолетовое или вишнево-красное.
- **Реакция с фурфуролом.** К 1 мл исследуемого раствора прибавляют 5 кап, 1% раствора фурфурола в этаноле и 3 кап. 10% раствора гидроксида натрия. Через 3-5 мин. к этой жидкости добавляют 10-12 кап. концентрированной соляной кислоты. Появляется краевая окраска.

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ ПОДКИСЛЕННЫМ СПИРТом ИЛИ ПОДКИСЛЕННОЙ ВОДОЙ

- Наиболее практическое значение из этой группы представляют алкалоиды
- Групповая проба на алкалоиды - осадочный метод на фильтровальной бумаге.
- Метод окрашивания;
- Биологический метод;
- Гемолитическая проба на сапонины.
-

Изолирование алкалоидов из биологического материала можно проводить общими методами для группы «нелетучих ядов»- подкисленным спиртом, водой, подкисленной щавелевой кислотой.

Для жидких алкалоидов, основания которых летучи с водяным паром, в качестве методов изолирования может быть применена перегонка с водяным паром. Оптимальное значение pH для изолирования алкалоидов при настаивании биологического материала с растворителями должно быть 2-3, чтобы перевести алкалоиды в солеобразные ионизированные формы, хорошо растворимые в воде.

Кислая реакция среды, кроме того, способствует разрушению комплексов алкалоидов с белками, что усиливает выход алкалоидов. Далее pH доводят до 9-10, что дает возможность перевести алкалоиды из солей в основания, т.е. молекулярные формы, хорошо растворимые в органических растворителях.

- **Качественные реакции на алкалоиды**

Принцип метода.

Алкалоиды имеют некоторые общие свойства, например, растворимость в одних и тех же растворителях, давать даже в разбавленных растворах простые или комплексные соли с кислотами, солями тяжелых металлов, комплексными йодидами и другими веществами. С некоторыми реактивами алкалоиды образуют цветные реакции или нерастворимые осадки.

Эти свойства алкалоидов и легли в основу методов их определения. Ввиду различной чувствительности общеалкалоидных осадительных реактивов, в химико-токсикологическом анализе применяют обычно не один, а три-четыре наиболее чувствительных, характерных и доступных реактива.

Основные реактивы:

- 1. Раствор йода в калия йодиде (реактив Бушарда).
- Раствор висмута йодид в калия йодиде (реактив Драгендорфа)
- Раствор кадмия йодида в калия йодиде (реактив Марме).
- Раствор ртути йодида в калия йодиде (реактив Майера).
- Кислота фосфорно-молибденовая (реактив Зонненштейна).
- Кислота фосфорно-вольфрамовая (реактив Шейблера).
- Свежеприготовленный 10% водный раствор танина с 10% спирта. С алкалоидами образует осадки белого или желтоватого цвета.
- Кислота пикриновая (10% раствор). Дает почти со всеми алкалоидами, кроме аконитина, кофеина, теобромина, кониина и морфина пикраты - осадки желтого цвета.
- .

Методы извлечения алкалоидов из растительного материала

1.

Навеску 10 г сухого растительного материала, размолотого в мелкий порошок или 30-40 г свежих измельченных растений помещают в колбу на 250 мл и добавляют 10 мл 10%-го раствора аммиака. Содержимое колбы хорошо перемешивают и через 20-30 минут заливают дихлорэтаном в соотношении 1:10 к навеске. Хорошо встряхивают и оставляют на сутки. Затем дихлорэтан отфильтровывают с 10 мл 10 %-ной серной кислоты. Полученный фильтрат используют для исследования общеалкалоидными реактивами (групповая проба на алкалоиды).

Групповая проба на алкалоиды

- На часовые стекла или на предметные стекла наносят столько капель фильтрата, сколько приготовлено реактивов для осаждения алкалоидов. К каждой капле добавляют по капле одного из реактивов для осаждения алкалоидов. При наличии алкалоидов образуется муть или изменится цвет, или появится осадок. Если алкалоидов нет - капли остаются прозрачными.
- Для полного осаждения алкалоидов требуется от 10 до 30 капель реактива. Наблюдение производят при дневном свете на темном фоне.
- При учете этих реакций возникают затруднения:
- Учет реакции зависит от индивидуальных особенностей исследователя.
- Полученные данные нельзя перенести в карточку химико-токсикологического исследования.
- Поэтому осадочные реакции удобнее проводить не на стекле, а на хроматографической бумаге или фильтровальной бумаге с синей лентой.
- Полоски бумаги для хроматографирования или фильтровальной бумаги с синей лентой размером 2,5 x 8 см пропитывают до середины реактивом, состоящим из смеси двух растворов: 20 мл раствора А, 20 мл раствора Б и 60 мл 40% уксусной кислоты. Просушивают в вертикальном положении при комнатной температуре. Бумага окрашивается в желтый цвет.

- На чистом конце индикаторной бумаги пишут № экспертизы, дату и объект исследования. На окрашенную часть индикаторной бумаги наносят каплю исследуемого материала. При наличии алкалоидов на желтом фоне индикаторной бумаги отчетливо появляются цветные пятна: коричневые, синие, оранжевые, красные и т.д. При большом содержании алкалоидов пятно появляется после первой капли; малом - при последующих каплях.
- Все общеалкалоидные реактивы не являются специфичными для алкалоидов. Кроме того их муть или трудно растворимые осадки способны образовывать белки, продукты их распада и другие вещества. Поэтому реакции с общеалкалоидными реактивами рассматриваются как своего рода предварительные исследования, способные дать ориентир химику-токсикологу для дальнейших исследований. Получение им положительных реакций с 2-3-мя общеалкалоидными реактивами не служит поводом для заключения о наличии в объекте исследования алкалоидов. Наоборот, отрицательный результат реакций с общеалкалоидными реактивами - отсутствие мути или осадка - дает право делать вывод о том, что алкалоидов не найдено.
- При положительной реакции приступают к идентификации алкалоидов. С целью идентификации, алкалоидов проводят специфические (цветные) реакции, микрокристаллические реакции и хроматографические методы анализа (тонкослойная и бумажная хроматография).

Определение сапонинов

В колбочку помещают 1 г измельченного сена, травы, муки или отрубей и добавляют 10 мл физиологического раствора.

Пробу сена или травы ставят на 10 минут в кипящую водяную баню (помешивая); а пробы муки или отрубей экстрагируют 15 минут при комнатной температуре (периодически встряхивая). После этого фильтруют через обычный бумажный фильтр. К 2 мл фильтрата добавляют 0,5 мл 5%-й взвеси эритроцитов. Осторожно встряхивают и оставляют в штативе. При наличии сапонинов, в зависимости от их количества, произойдет гемолиз эритроцитов сразу же или через 5-10 минут.

- Для контроля берут в пробирку 2 мл физиологического раствора и добавляют 0,5 мл 5%-й взвеси эритроцитов.
- Проба очень простая и высокочувствительная- 1:50000.

ИЗОЛИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПУТЕМ РАЗРУШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА- МЕТОД «МИНЕРАЛИЗАЦИИ»

- Важнейшими в токсикологическом отношении «металлическими ядами» являются соединения Ba, Bi, Cd, Mn, Cu, Hg, Pb, Ag, Tl, Cr, Zn.
- Правилами судебно-химического исследования при проведении ненаправленного анализа предусмотрено обязательное исследование на указанные элементы.
- По воздействию на организм металлы классифицируют следующим образом:
- 1) металлы, необходимые для организма (Co, Cu, Cr, Ge, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V, Zn).
- 2) металлы, имеющие токсикологическое значение (As, Be, Cd, Cu, Co, Cr, Hg, Mo, Ni, Pb, Pd, Se, Sn, Ti, V, Zn).

**Ртуть, кадмий, свинец, мышьяк, медь, стронций, цинк,
железо**

Объединенная комиссия ФАО/ВОЗ по пищевому кодексу (Codex Alimentarius) включила в число компонентов, содержание которых контролируется при международной торговле продуктов питания. В России и СНГ подлежат контролю еще 6 элементов (сурьма, никель, хром, алюминий, фтор, йод), а при наличии показаний могут контролироваться и некоторые другие металлы.

Медико-биологическими требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01 определены критерии безопасности для следующих металлов: **свинец, кадмий, ртуть, медь, цинк, олово, железо.**

Минерализация - это окисление (сжигание) органического вещества (объекта) для освобождения металлов из комплексов с белками и другими соединениями. Наиболее широко распространенные методы минерализации можно разделить на 2 большие группы:

Методы сухого озоления - минерализация путем простого сжигания или сплавления со смесью нитратов и карбонатов щелочных металлов. К числу частных методов относится и метод частичной минерализации (деструкция) (для ртути)

а. Метод простого сжигания основан на нагревании органического вещества (объекта) при высокой температуре при доступе воздуха. Сухое озоление проводят в фарфоровых, платиновых или кварцевых тиглях. На исследование берут небольшие навески (1-3 г), температура нагревания достигает 300-400°C. Метод применяется при специальных заданиях по обнаружению катионов марганца, меди, цинка, висмута.

Б.Метод сплавления с нитратами щелочных металлов

в химико-токсикологическом анализе применяется чаще, чем **сухое озоление**. Биологический материал нагревают с расплавленными нитратами щелочных металлов. Но с чистыми нитратами окисление идет очень быстро, особенно при повышенных температурах, при этом может наблюдаться выбрасывание пробы из тигля. Поэтому, для предотвращения бурного протекания реакции при сплавлении применяют смесь нитратов с карбонатами щелочных металлов.

- **2. Общие методы** (методы мокрой минерализации) применяются при общем (ненаправленном) исследовании на группу металлических ядов, пригодны для изолирования всех катионов металлов, кроме ртути. Для минерализации используют смеси кислот - окислителей (серной и азотной, серной, азотной и хлорной), а также калия хлорат и пергидроль.
- Под действием окислителей происходит разрушение биологического материала с образованием более простых химических соединений. При этом связи между металлами и биологическими субстратами организма (белками, аминокислотами и др.) разрушаются, образуются соли этих металлов, которые можно обнаружить в минерализате при помощи соответствующих реакций и методов.

Определение ядов, изолируемых путем минерализации.

Подготовка материала (приготовление минерализата)

Если материал был консервирован спиртом или содержит много воды, то пробу помещают в фарфоровую чашку и подсушивают на кипящей водяной бане;

Затем 20-25 г патологического материала или корма помещают в колбу Кьельдаля, заливают 10-12,5 мл пергидроля, 1-2 минуты перемешивают и прибавляют постепенно 6-7 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое колбы разогревается и наступает бурная реакция с образованием большого количества пены;

Когда реакция затихает, колбу осторожно нагревают на электроплитке и прибавляют до 1-2 мл пергидроля до тех пор, пока содержимое (минерализат) колбы сделается прозрачным.

В результате частичной минерализации органического материала (остаются неразрушенными жир и продукты распада белков) металлические яды освобождаются от связи с белками и становятся доступными для определения. Разрушение материала при этом занимает примерно 30-40 минут.

Обнаружение ртути

На беззольную фильтровальную бумагу наносят каплю взвеси йодистой меди (раствор предварительно взбалтывают), выжидают 2-3 минуты и наносят на это место каплю минерализата.

В присутствии ртути появляется **красное или красно-оранжевое окрашивание**. Реакция высокочувствительная, можно обнаружить до 0,25 мкг ртути в одной капле минерализата.

Определение свинец-содержащих соединений

Перед началом исследования минерализат хорошо плодогревают (но не доводят до кипения), для того чтобы свинца хлорид (хлористый свинец) перевести в растворенное состояние, поскольку при охлаждении минерализата он выпадает в осадок.

Каплю горячего минерализата наносят на кусочек фильтровальной бумаги, пропитанной 4% раствором натрия тартрата (виннокислого натрия), и держат над горлом банки с 25% раствором аммиака (концентрированного нашатырного спирта) до полной нейтрализации хлористоводородной кислоты (соляной кислоты).

- После этого бумажку с нанесенным минерализатом просушивают на воздухе или закрытом источнике тепла и опрыскивают из пульверизатора раствором натрия родизоната, а затем буферным раствором с рН 2,8.
- При наличии свинец-содержащих соединений в исследуемом материале пятно на фильтровальной бумажке в момент опрыскивания окрашивается **в светло-фиолетовый (сиреневый) цвет**.
- Если в исследуемом материале содержится незначительное количество свинецсодержащих веществ (свинца), то пятно приобретает **красновато- оранжевый цвет**.
- Для дифференцирования на часть окрашенного пятна наносят маленькую каплю 10% раствора сульфата натрия (сернокислого натрия). В том числе, когда цвет пятна не изменяется, делают заключение о наличии в пробе свинца. Микроколичества свинца, присутствующие обычно в тканях животных этим методом не определяются.

Определение мышьяка по Зангер-Блеку:

Метод основан на восстановлении соединений мышьяка до мышьяковистого водорода (AsH_3). Последний, в зависимости от количества мышьяка, окрашивает бумажку, пропитанную бромидом или дихлоридом ртути от желтого до темно-коричневого цвета вследствие образования комплексного соединения.

ГРУППА ВЕЩЕСТВ, ИЗОЛИРУЕМЫХ ОСОБЫМИ МЕТОДАМИ

- **Группа токсикологически важных веществ, требующих особых методов изолирования (соединения фтора).** К этой группе веществ относятся соли фтористоводородной (плавиковой) кислоты: NaF , NH_4F , LiF , CaF_2 , BaF_2 , PbF_2 , $\text{CuF}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4HF_2 , CrF_3 , Na_3AlF_6 (3NaFAIF_3) и другие, а также соли кремнефтористоводородной кислоты: Na_2SiF_6 , K_2SiF_6 , $\text{CaSiF}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, BaSiF_6 и другие. Данные соли применяются в промышленности, сталеварении, стекловарении, в качестве консерванта древесины, в сельском, хозяйстве в качестве инсектицидов.
- Объектами исследования являются моча, содержимое желудка, внутренние органы и пищевые продукты.

Изолирование. Измельчённый объект в количестве 25 г подщелачивают избытком едкой извести, смачивают раствором аммония нитрата или концентрированной кислотой азотной, высушивают и прокаливают при температуре не выше 500°C до полного сжигания.

Качественная реакция с помощью ализаринциркониевого лака.

В химический стаканчик помещают 50 г тщательно измельчённого исследуемого материала, добавляют 5-10 мл 10 % HCl (кислая реакция по лакмусу), перемешивают и оставляют на 15-30 мин.

В пробирку вносят 0,2-0,3 г угля и сюда фильтруют из стаканчика 4-5 мл жидкости, закрывают пробку и энергично встряхивается 1-2 мин. после чего фильтруют в чистую пробирку через бумажный фильтр, смоченный дистиллированной водой.

Для анализа берут 2-3 мл прозрачного фильтрата и добавляют к нему 5-10 капель ализаринциркониевого лака. При наличии фтора лак обесцвечивается, фильтрат становится розовато-жёлтым или жёлтым. При отсутствии фтора лак не изменяется.

ПЕСТИЦИДЫ И ИХ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

1. ФОС и ХОС, карбамиды 2. Пиретроиды и зооциды

Изолирование пестицидов, в большинстве случаев, осуществляют экстракцией различными органическими растворителями: пентан, гептан, петролейный эфир, хлороформ, четыреххлористый углерод и др. Единого универсального метода изолирования пестицидов, так же как и общей схемы очистки полученных экстрактов, не существует.

Методы очистки пестицидов, выделенных из биологических объектов, разнообразны. Имеет место очистка перегонкой с водяным паром, кристаллизацией, хроматография в тонких слоях сорбента.

Объектами исследования при ХТА могут быть как сами ядохимикаты, биологические объекты - желудок с содержимым, печень, почки в смертельных случаях отравления и биологические жидкости - кровь, моча - у живых лиц при установлении диагноза острого отравления, а при санитарно-гигиенических исследованиях - пищевые продукты, почва, вода.

Изолирование из внутренних органов трупа основано на настаивании измельченных органов с 3-х кратным объемом смеси: ацетон-этанол-хлороформ (1,5:1,5:1) при рН 5-5,5 в течение 4 часов с последующим экстрагированием хлороформом.

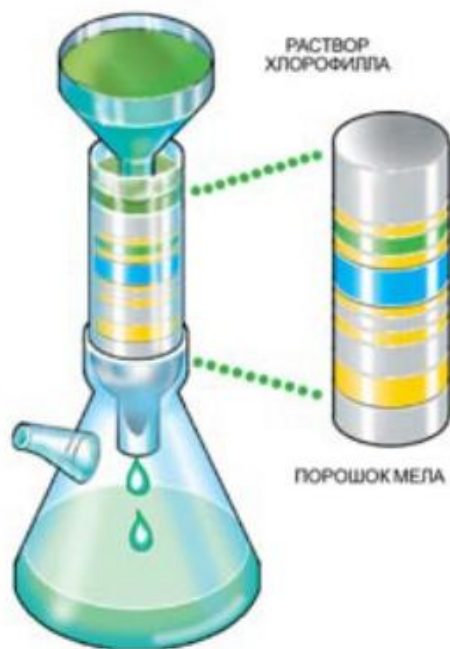
Изолирование из биологических жидкостей проводят при рН 5 экстракцией хлороформом с последующей концентрацией извлечения.

Хроматография

Хроматографические методы – это методы **молекулярного анализа**, основанные на разделении компонентов смеси путем их избирательного поглощения (**сорбции**).



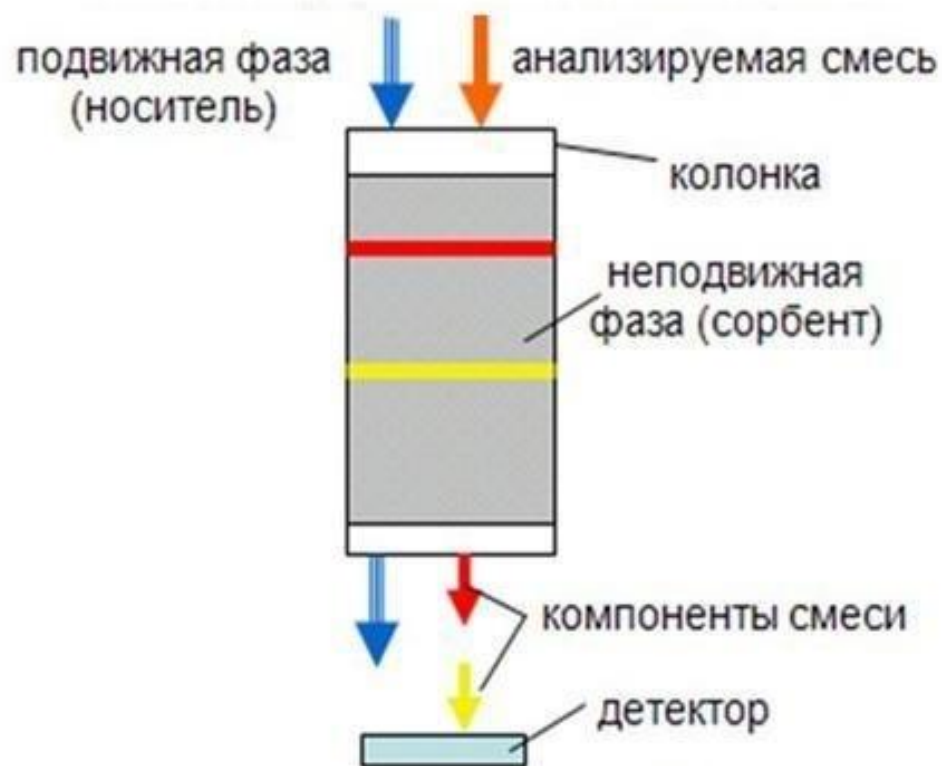
Цвет Михаил Семенович



Разделение хлорофилла (1903)

Адсорбционная хроматография - метод, основанный на многократном перераспределении молекул определяемого компонента (сорбата) между подвижной фазой (элюентом) и поверхностью твердого сорбента вследствие адсорбции и десорбции этих молекул. Если адсорбционные свойства компонентов смеси различны, то при движении элюента через сорбент компоненты разделяются.

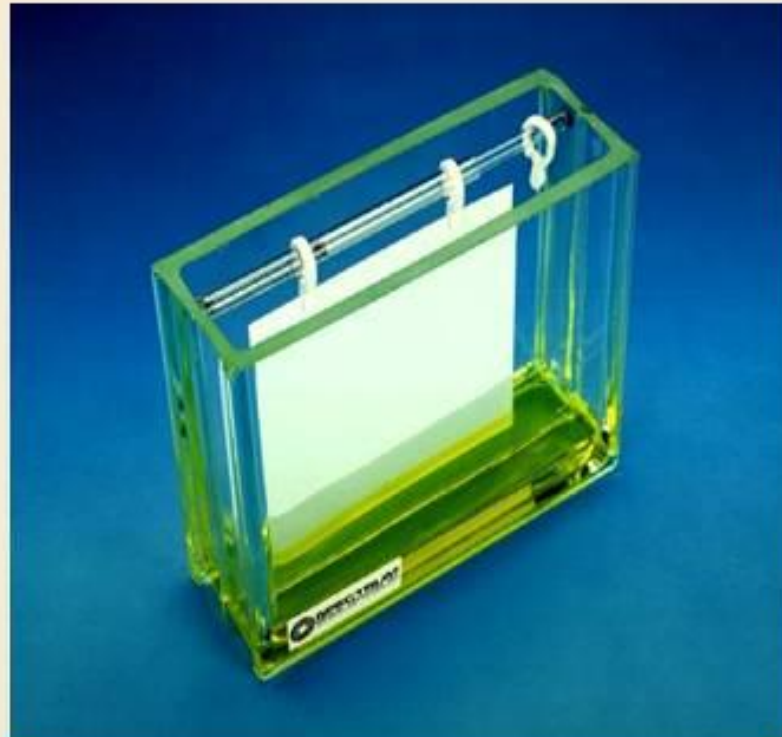
Схема хроматографической колонки



Тонкослойная хроматография

ТСХ —

вариант хроматографии,
основанный на различии
в скорости перемещения
компонентов смеси в
плоском тонком слое
(толщина 0,1–0,5 мм)
сорбента при их
движении в потоке
подвижной фазы
(элюента).



Анализ и методы расчета хроматограмм

Качественный анализ

- Время удерживания, объем удерживания - характеризуют природу анализируемого вещества

Идентификация по времени удерживания

- Совпадение величин удерживания неизвестного и стандартного соединения свидетельствует об идентичности этих веществ
- При использовании данных, полученных на разных хроматографах (или справочных данных), более надежна идентификация по исправленному времени удерживания t_R' .

- Газожидкостная хроматография основана на физико-химическом разделении анализируемых компонентов, находящихся в газовой фазе, при их прохождении вдоль нелетучей жидкости, нанесенной на твердый сорбент. Это один из наиболее перспективных методов анализа. Широкое распространение и перспективность методов ГЖХ обусловлены тем, что они позволяют разделить и количественно определить вещества в сложной смеси даже в тех случаях, когда они сходны по химическим свойствам, а температуры кипения W различаются на десятые доли градуса. Для анализа требуются очень малые количества вещества, а время определения обычно исчисляется минутами.
- Разделение анализируемых веществ происходит в колонках (трубках), наполненных твердым пористым сорбентом, на который нанесена жидкая нелетучая стационарная фаза. Пары анализируемых веществ, смешанные с газом-носителем, движутся через колонку. При этом происходит многократное установление равновесия между подвижной газовой и жидкой стационарной фазами, обусловленное многократным повторением процессов растворения и испарения. Вещества, лучше растворимые в стационарной фазе, дольше удерживаются ею. Благодаря этому происходит разделение анализируемой смеси на отдельные компоненты, которые выходят из колонки отдельно и регистрируются на выходе.
- Эффективность использования метода ГЖХ в каждом отдельном случае зависит от правильного выбора жидкой фазы, размера частиц и природы твердого носителя, скорости и природы газа-носителя, температуры, количества вводимой пробы, длины колонки и других факторов. Поскольку теоретический учет этих факторов не всегда возможен, эффективность анализа ГЖХ в большой степени зависит от практических знаний и опыта экспериментатора.

Спасибо за внимание!

Мы —молодцы!