

Современные общие и отдельные методы выделения и анализа ядов, токсичных и лекарственных веществ.

Сучасні загальні та окремі методи
виділення та аналізу отрут,
токсичних та лікарських речовин.

Химико-токсикологический анализ «летучих» токсикологически значимых веществ

Токсикологічна характеристика та методи хіміко-токсикологічного аналізу групи «летких» отрут з організму.

В первый раздел включены:

- синильная кислота;
- Спирты: метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый и амиловый;
- формальдегид;
- хлороформ, хлоралгидрат, четыреххлористый углерод, дихлорэтан;
- фенол, крезолы.

Во второй раздел Перечня включены: этиленгликоль, ацетон, бензол, толуол, ксилол и др.

Схема химико-токсикологического анализа

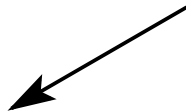
Выбор объекта



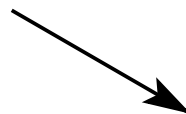
Подготовка изолированной пробы



Анализ



**Газожидкостная
хроматография
(ГЖХ)**



Химический метод

Объекты исследования

- Желудок и кишечник (их содержимое);
- Кровь
- Легкие
- Органы, осуществляющие элиминацию ксенобиотиков (печень, почки)
- Селезенка
- Мозг
- Моча
- Жировая ткань

Методы изолирования

Дистилляция

С водяным паром

Азеотропная (селективная) перегонка с органическим растворителем (для в-в не образующих азеотропы с водой)
Например: этиленгликоль

Частный метод дистилляции с пропусканием сжатого азота для HCN и ее солей

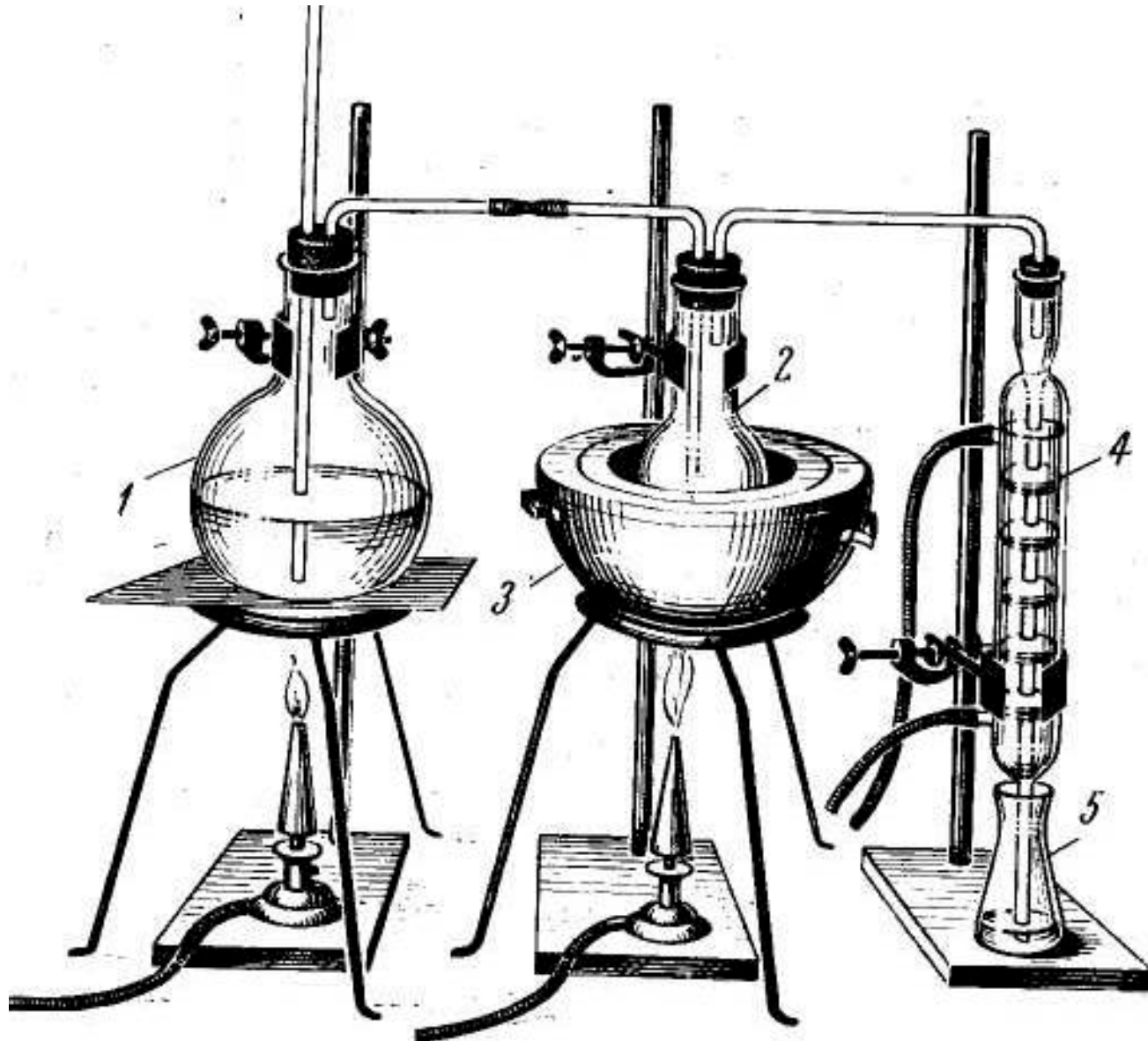
Методы изолирования

- Дериватизация (для спиртов)
- Парофазный анализ
- Микродиффузионный метод

Перегонка с водяным паром. Схема прибора

- Паро-образователь («паровик», нагрев выше 100 °С)
- Колба с анализируемым образцом (нагрев на водяной бане до 60-70 °С)
- Холодильник
- Колба-Приемник

Прибор для дистилляции с водяным паром



1 – парообразователь; 2 – колба с объектом исследования; 3 – баня водяная;
4 – холодильник; 5 – приемник дистиллята.

Основы метода

- В основе метода лежит закон парциальных давлений;
- Смеси жидкостей кипят при температуре более низкой, чем температура кипения каждого из компонентов (азеотроп);

Основы метода

- Азеотропная смесь — смесь двух или более жидкостей, состав которой не меняется при кипении, то есть смесь с равенством составов равновесных жидкой и паровой фаз.
- Суммарное давление паров компонентов над системой P , равное сумме давлений $p_1 + p_2$ всегда выше давления пара каждого компонента в отдельности - положительные азеотропы.

Основы метода

- Давление при котором начинается кипение, достигается при температурах, меньших температур кипения отдельных компонентов;
- В отдельных случаях, если вещество с водой не дает азеотропа, в реакционную смесь дополнительно вводят вещество, образующее с токсичным веществом азеотроп (пример – этиленгликоль)

Пример

- **бензол** (Ткип. **80,2°C** при 760 мм рт. ст.) перегоняется с водой (Ткип. **100°C** при 760 мм рт. ст.) при температуре **69°C**.

При этом количественное соотношение в дистилляте (в граммах)

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{M_1 \cdot P_1}{M_2 \cdot P_2},$$

Где:

m_1 и m_2 - массы данных веществ в дистилляте,

M_1 и M_2 – их молекулярные массы,

P_1 и P_2 – парциальные давления их паров.

Схема общего анализа группы веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром

100 г биологического материала
рН 2-3, щавелевая кислота

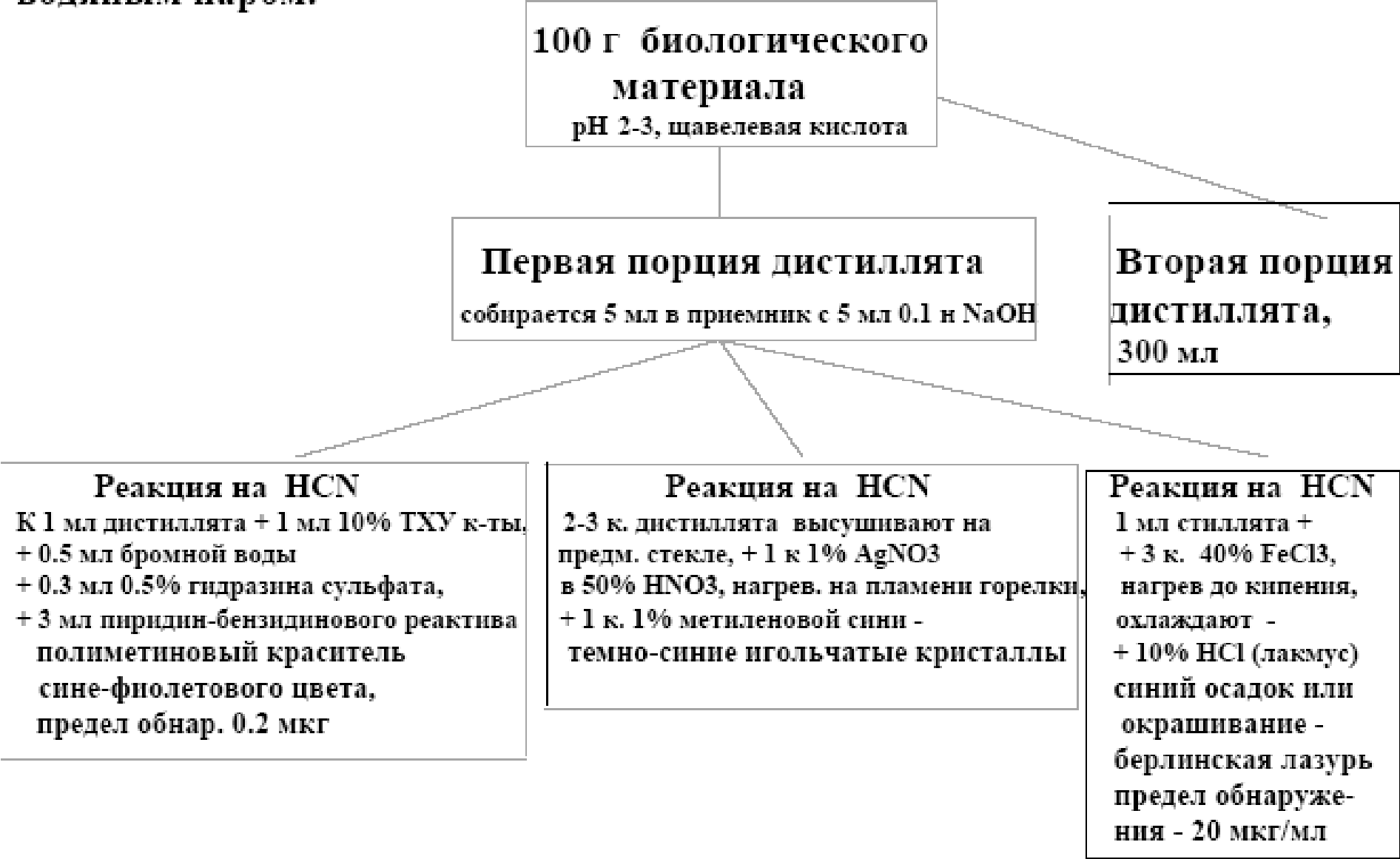
- 1) 5 мл - первая фракция собирается в приемник с 5 мл 0,1 н NaOH
 - $\text{HCN} + \text{NaOH} \rightarrow \text{NaCN} + \text{H}_2\text{O}$
- 2) 300 мл – вторая фракция

Химико-токсикологический анализ

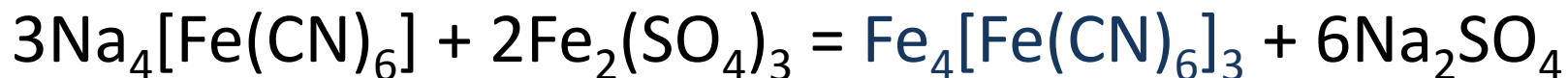
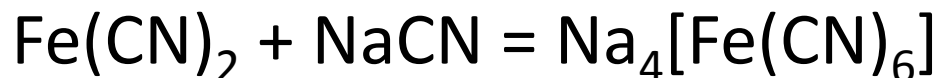
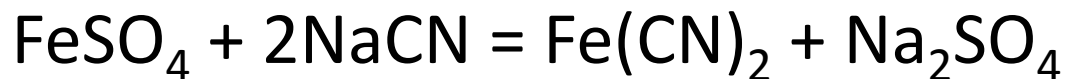
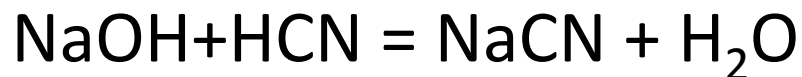
СИНИЛЬНОЙ КИСЛОТЫ

- 1) К 1 мл дистиллята + 1 мл 10% ТХУ + 0,5 мл бромной воды + 0,3 мл 0,5% гидразин сульфата
 - → сине-фиолетовый цвет (> 0.2 мкг)
- 2) 2-3 капли дистиллята высушивают на предметном стекле + 1 к 1% AgNO_3 в 50% азотной кислоте, нагрев на пламени горелки, + 1 к 1% метиленовой сини
 - → темно-зеленые игольчатые кристаллы (> 0.2 мкг)
- 3) 1 мл дистиллята + 3 к 40% $\text{FeCl}_3/\text{FeCl}_2$, нагрев до кипения, охлаждают, + 10% HCl до кислой среды по лакмусовой бумаге (наиболее доказательная)
 - → берлинская лазурь (> 20 мкг/мл)

Схема общего анализа группы веществ, изолируемых перегонкой с водяным паром.



Образование берлинской лазури



синее окрашивание

Заключение о качественном обнаружении (если синий осадок не выпадает тотчас) или отсутствии HCN дается лишь по истечении 24-48 час, т.к. при следовых количествах HCN в присутствии органических веществ осадок **Берлинской лазури** может выпадать медленно.

Чувствительность реакции 20 мкг HCN в 1 мл раствора

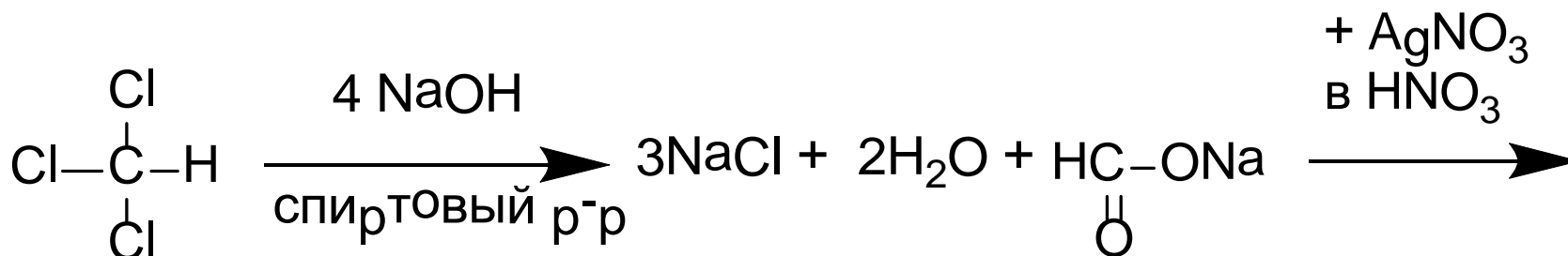
Химико-токсикологический анализ хлорсодержащих растворителей (хлороформ, четырёххлористый углерод и т.д.)

Вторая порция дистиллята (300 мл)
качественные реакции

- Реакция отщепления атома хлора
- Реакция образования изонитрила
- Реакция с резорцином

Реакции на органически связанный хлор

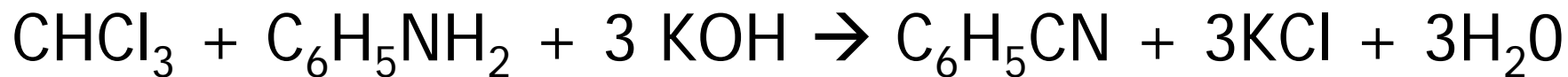
1. Общей реакцией на галогенопроизводные является реакция отщепления галоида, что достигается при нагревании части дистиллята со спиртовым раствором NaOH:



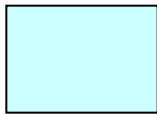
→ осадок или муть

Реакции на органически связанный хлор

2. В случае отсутствия осадка или мути проводят реакцию получения изонитрила



Отрицательный результат этой реакции позволяет судить об отсутствии в исследуемом объекте галогенорганических веществ.



**Вторая порция дистиллята
300 мл**

**Реакция на органически
связанный хлор**

5 мл дистиллята + 2 мл
10% спиртового раствора
NaOH, нагрев. на газовой горелке,
охлаждение + 10% HNO₃
(по лакмусу) + 0.5 мл 10% AgNO₃ -
белая муть или осадок

**Реакция на органически
связанный хлор**

1 мл дистиллята + 10 к.10% спир.
р-ра NaOH + 1 к. анилина,
нагрев на водяной бане -
резкий запах изонитрила
(имеет отрицательное суд.-хим.)
значение для хлороформа, CCl₄,
хлоралгидрата)

Реакция с резорцином

1 мл дистиллята + 1 мл 1%
резорцина в 10% NaOH,
нагрев. 5-10 мин на кип.
бане водяной бане -
**розовое или малиновое
окрашивание**
(обнаружение CHCl₃, CCl₄,
хлоралгидрата)
для формальдегида имеет
отрицательное суд.-хим.
Значение

Реакция на формальдегид

1 мл дистиллята + 5 мл H₂SO₄ конц.
+ 0.02-0.03 г коденна
сине-фиолетовое окрашивание
предел обнар. 0.02 мкг

Реакция на фенол, крезолы

50 мл дистиллята подщел. NaHCO₃
экстракция эфиром (3 x 15 мл)
эфир упаривается, остаток
растворяется в подкисл. воде - 1-2 мл

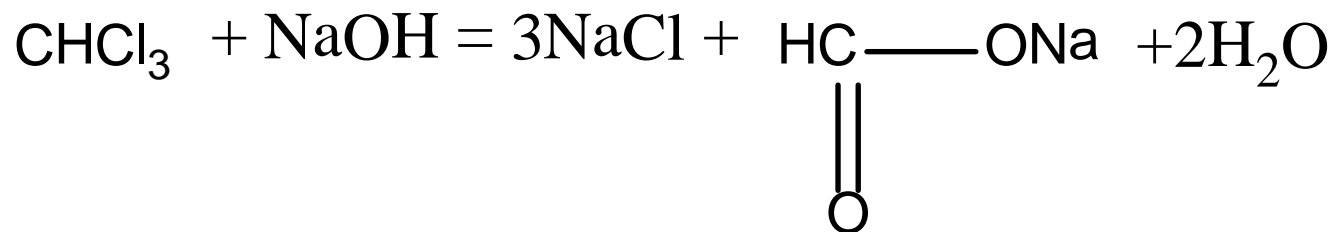
Реакция на ацетон

10 мл дистиллята + 1 мл 10%
NaOH + 5 к. 1% нитро-
пруссиды натрия -
**интенсивное красное
окрашивание**
при подкислении 10%
уксусной кисл отой -
красно-фиолетовое

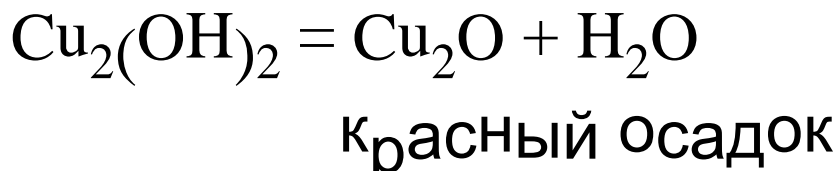
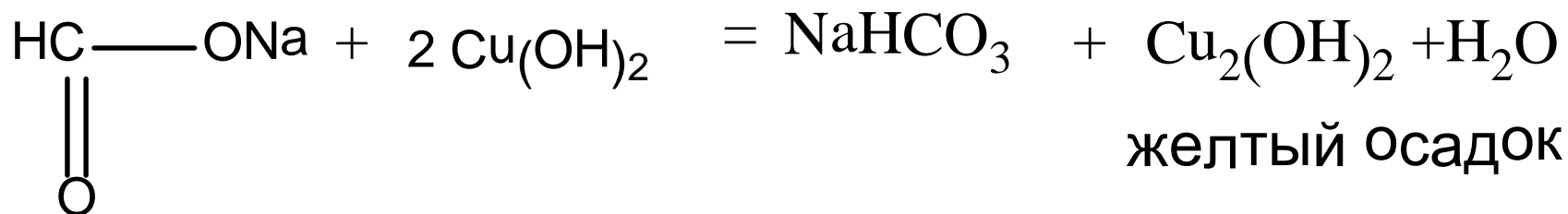
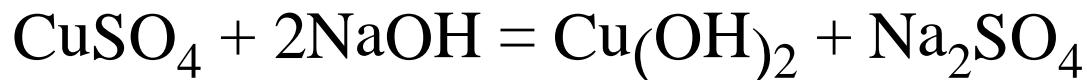
1 мл раствора + бромная вода
**желто-белый осадок,
игольчатые кристаллы**
**отрицательное суд.-хим.
значение**

1 к. раствора в фарф. чашке
+ 1-2 к. 5% FeCl₃
**фиолетовое, сине-фиол.
окрашивание,**
исчезает при добавлении
воды, спирта, кислоты

Образование закиси меди

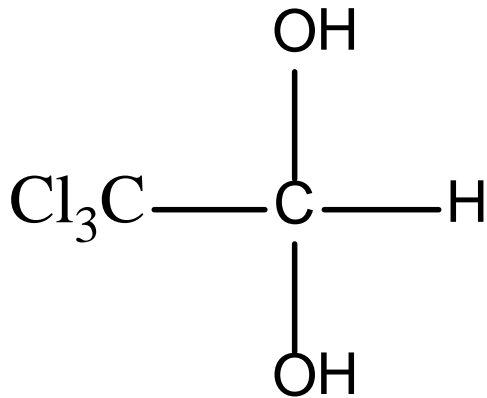


Формиат натрия



3. Реакция дистиллята с 1% свежеприготовленным раствором резорцина (м-диоксибензол) в 10% р-ре NaOH при нагревании:

Появление розового (красного) окрашивания может указывать на наличие **хлороформа**, **четырёххлористого углерода**, **хлоралгидрата**.



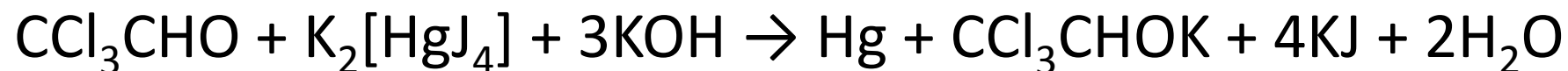
Хлоралгидрат

4. При значительных количествах CHCl_3 и хлоралгидрата проводят реакцию восстановления $\text{Cu}(\text{OH})_2$ в $\text{Cu}_2(\text{OH})_2$, переходящую далее в Cu_2O при кипячении с р-ром Феллинга.

При наличии хлороформа, хлоралгидрата и летучих с водяным паром альдегидов (формальдегид, уксусный альдегид) образуется желтый осадок гидрата закиси меди, переходящий почти тотчас в красный осадок закиси меди.

Альдегиды исключаются в ходе анализа соответствующими реакциями.

Для отличия хлоралгидрата от хлороформа используют реакцию с реактивом Несслера:



При наличии хлоралгидрата в исследуемом растворе образуется кирпично-красный осадок, который затем становится грязно-зеленым.

Такую же реакцию дают альдегиды и некоторые другие восстанавливающие вещества.

Для отличия дихлорэтана от хлороформа и др. используют реакции:

- 1) образования этиленгликоля и обнаружение его после переведения в формальдегид:

При нагревании 1,2-дихлорэтана с раствором карбоната натрия в запаянной ампуле образуется этиленгликоль. При взаимодействии этиленгликоля с периодатом калия образуется формальдегид.

Формальдегид подтверждают реакциями с хромотроповой и фуксинсернистой кислотой.

Такую же реакцию дают альдегиды и некоторые другие восстанавливающие вещества

2) образования ацетиленида меди:

При нагревании 1,2-дихлорэтана с раствором гидроксида натрия запаянной ампуле образуется ацетилен, который при взаимодействии с солями меди (I) дает ацетиленид меди, имеющий розовую или вишневую окраску.

Продолжение



Химико-токсикологический анализ формальдегида

1. Реакция с резорцином в щелочной среде.

Чувствительность - 0,03 мкг в пробе.

- Реакция не является специфичной и имеет только отрицательное значение.
- Белки и продукты их разложения мешают реакции, поэтому ее нельзя проводить (например, для установления факта консервирования формалином) непосредственно с жидкостью, которой залиты внутренние органы трупа.

Химико-токсикологический анализ

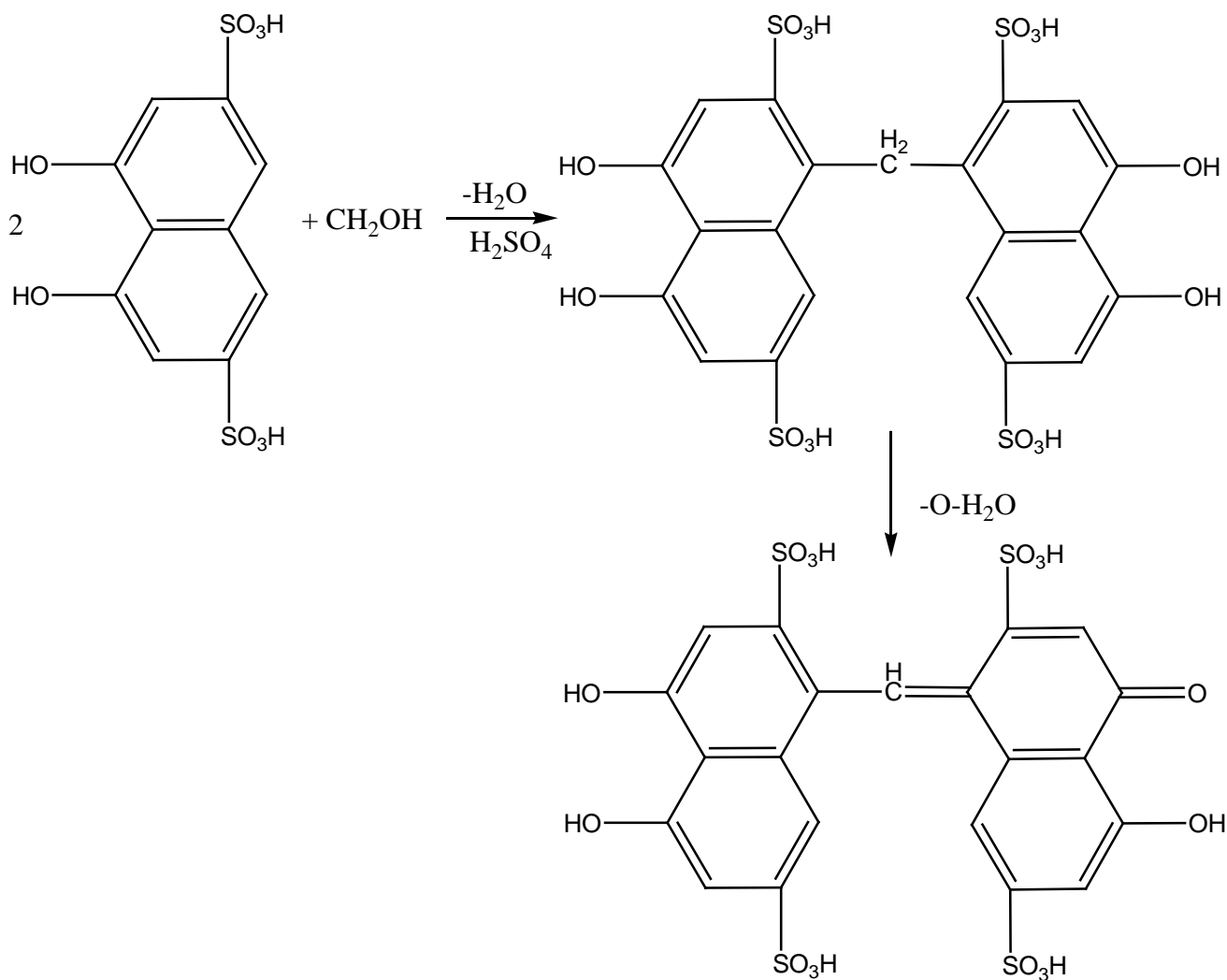
формальдегида

2. Дистиллят смешивают с 5-кратным объемом конц. H_2SO_4 . После охлаждения смеси вносят 0,02-0,03 г кодеина (морфина) – сразу или через несколько минут появляется красно- или сине-фиолетовое окрашивание. Чувствительность - 0,02 мкг в пробе.

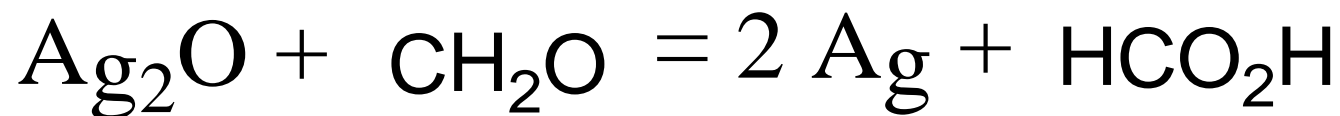
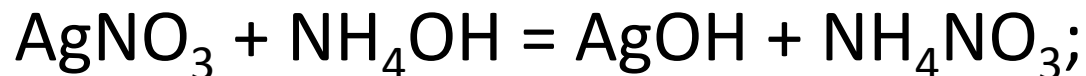
3. Дистиллят смешивают с 2-3 каплями конц. H_2SO_4 или HCl и р-ром фуксинсернистой кислоты (реактив Шиффа) – через несколько минут появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание. Чувствительность - 0,03 мкг в пробе.

Реакцию дают все альдегиды. Ацетон также дает сине-фиолетовое окрашивание.

4. С хромотроповой кислотой формальдегид в присутствии конц. H_2SO_4 дает красно-фиолетовое окрашивание. Чувствительность - 1,0 мкг в пробе.



5. При нагревании дистиллята с AgNO_3 в аммиачной среде восстанавливается металлическое серебро:

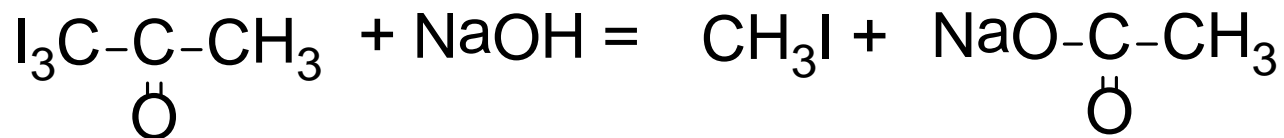
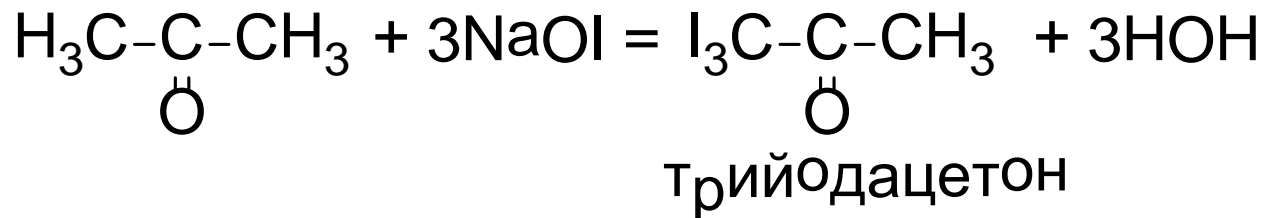
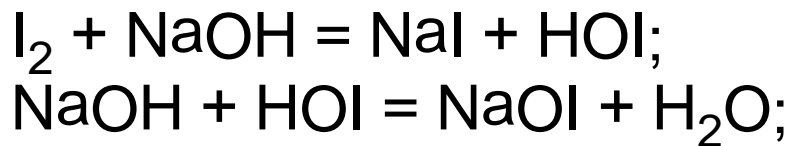


Чувствительность – 0,02 мкг в пробе.

Заключение о нахождении формальдегида в биоматериале дается, как правило, при условии получения положительных результатов второй и третьей реакций.

Химико-токсикологический анализ ацетона

1. 1 мл дистиллята или исследуемой жидкости с несколькими каплями 1% свежеприготовленного нитропрусида натрия $[\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ дает оранжево-красное окрашивание, переходящее при добавлении CH_3COOH до кислой реакции в красно-фиолетовой или вишнево-красное окрашивание.
2. С р-ром йода в KI в присутствии 10% водного р-ра NH_4OH образуется йодоформ (характерный запах) и выпадает желтый кристаллический осадок.
Чувствительность реакции – 0,1 мг/мл.



Обе реакции неспецифичны для ацетона. Уксусный альдегид и этанол также дают эту реакцию, поэтому реакция имеет значение только при отсутствии этих веществ.

3. С 1% р-ром фурфурола в 96°этаноле в присутствии 10% NaOH и дальнейшем подкислении конц. HCl дистиллят, содержащий ацетон, дает интенсивное красное окрашивание. **Это общая реакция для альдегидов и кетонов.**

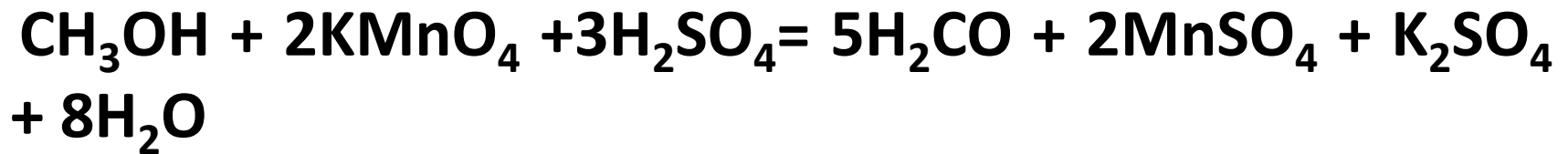
Химико-токсикологический анализ **метанола**

Наиболее характерными и чувствительными реакциями доказательства **метанола** являются реакции, основанные на окислении его в **формальдегид**. Поэтому необходимо убедиться в отсутствии формальдегида.

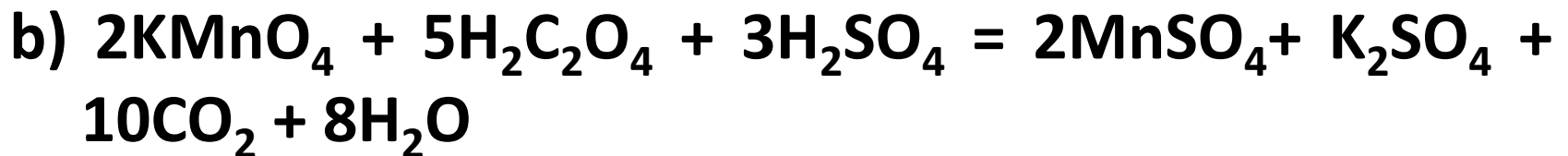
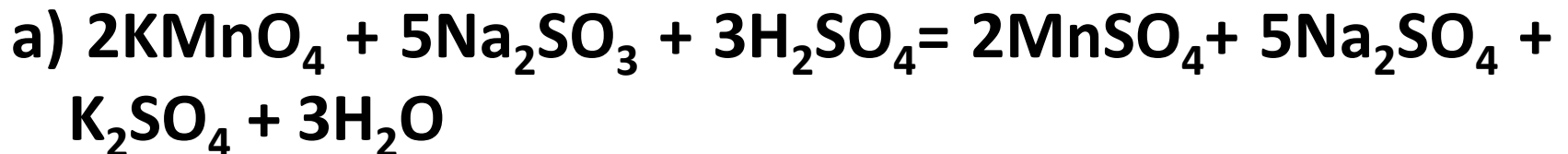


Химико-токсикологический анализ метанола

1. Окисление метанола в дистилляте проводят 2% р-ром KMnO_4 в кислой среде (10% H_2SO_4) при охлаждении холодной водой, добиваясь возможно большей полноты окисления метанола до формальдегида.



Для уничтожения избытка KMnO_4 к исследуемой жидкости по каплям прибавляют до обесцвечивания 15% р-р бисульфита натрия или щавелевой кислоты:



Раствор, содержащий метанол, окисленный до формальдегида, делят на 2 части и исследуют:

А) с р-ром кодеина или морфина в конц. H_2SO_4 – при наличии H_2CO появляется красно-фиолетовое (сине-фиолетовое) окрашивание.

Б) с р-ром фуксинсернистой кислоты в присутствии 1 мл конц. HCl - появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание.

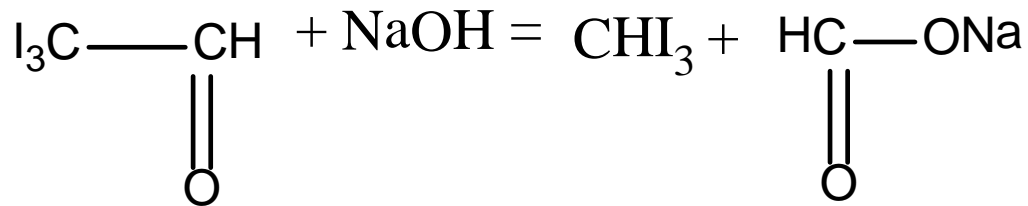
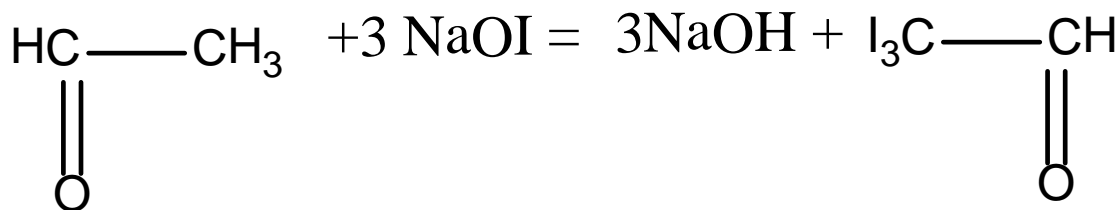
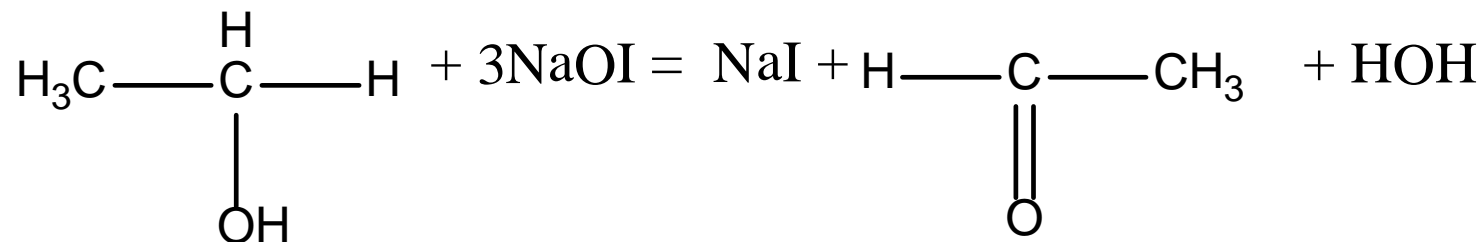
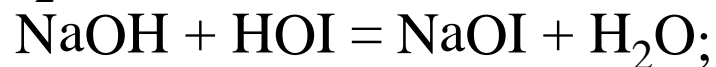
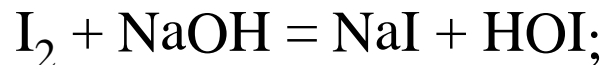
Чувствительность реакции – 0,1 мг в пробе.

2. Реакция образования метилового эфира салициловой кислоты. - Характерный запах.

Чувствительность реакции – 0,3 мг в пробе.

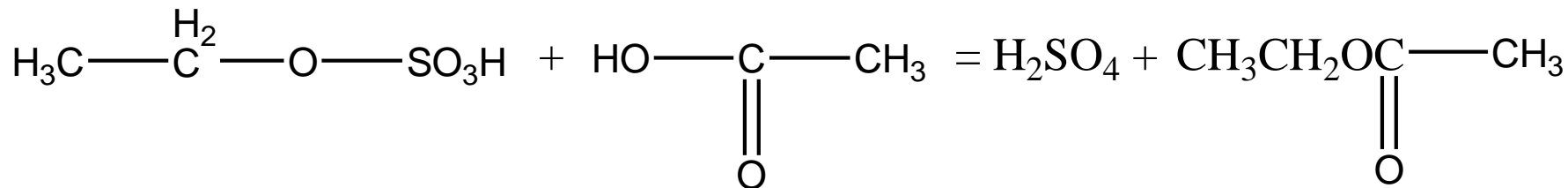
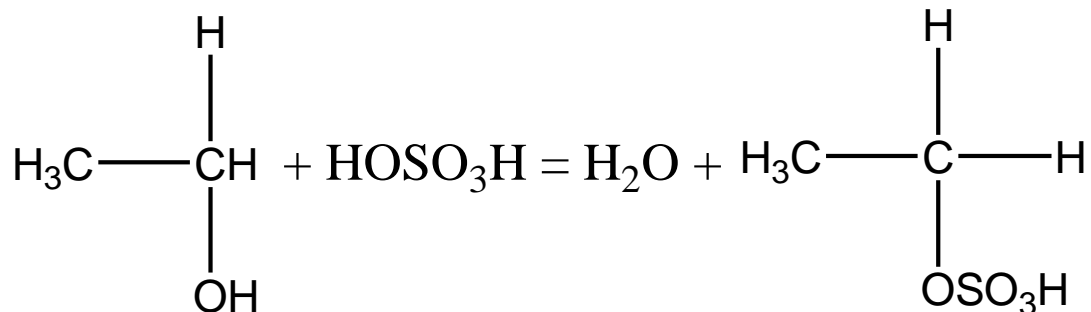
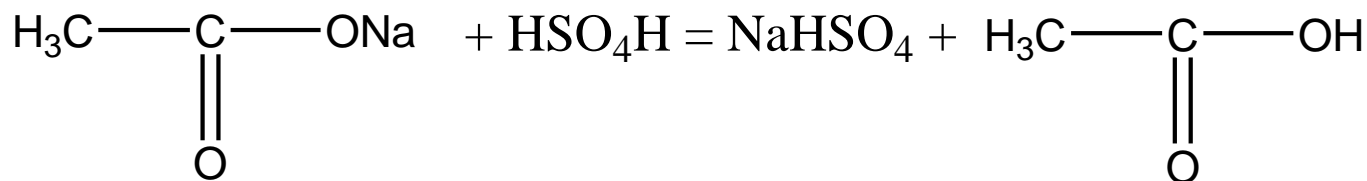
Химико-токсикологический анализ этанола

1. Реакция образования йодоформа (неспецифична)

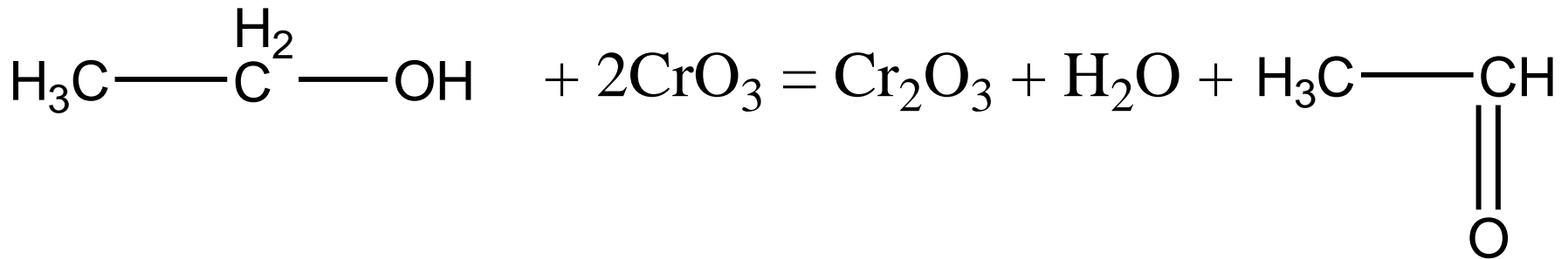
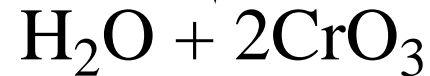
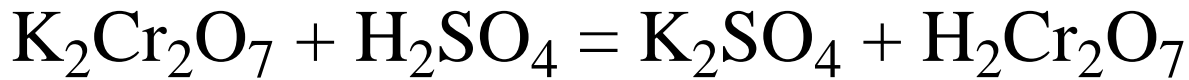


Образуются характерные для йодоформа кристаллы.
Чувствительность реакции – 0,04 мг/мл.

2. Реакция образования сложного эфира с уксусной кислотой (характерный запах):

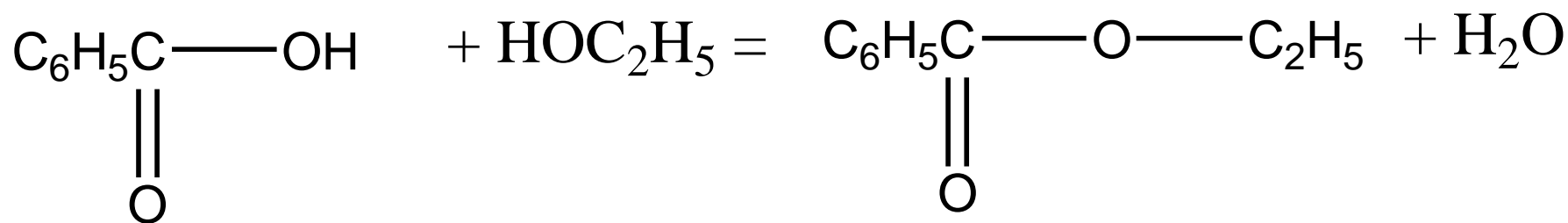
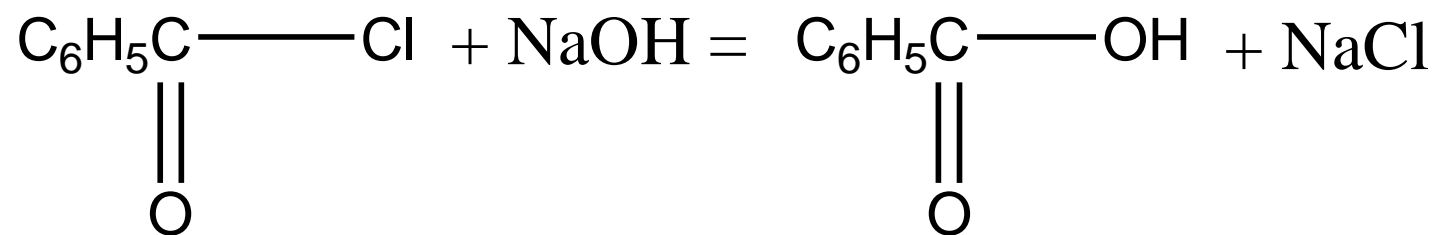


3. Реакция окисления этанола 5% р-ром бихромата калия в сернокислой среде до уксусного альдегида – специфический запах:



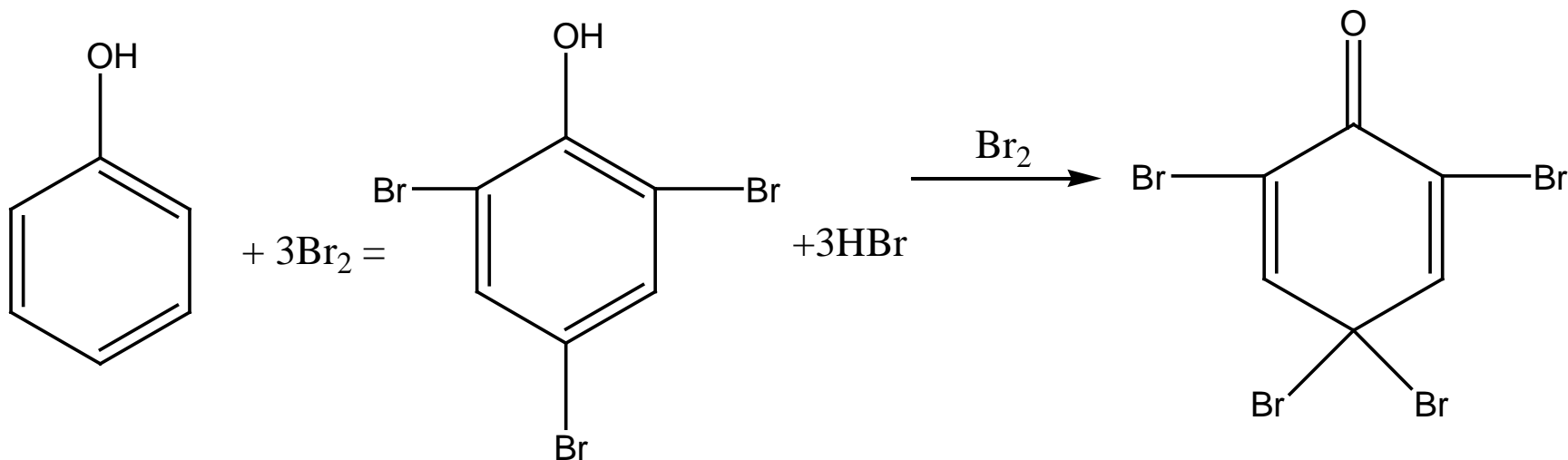
Чувствительность реакции не превышает 3 мг в 1 мл дистиллята.

4. Реакция получения этилбензоата, обладающего специфическим запахом. Реакция проводится с дистиллятом и бензоилхлоридом в присутствии 40% NaOH:

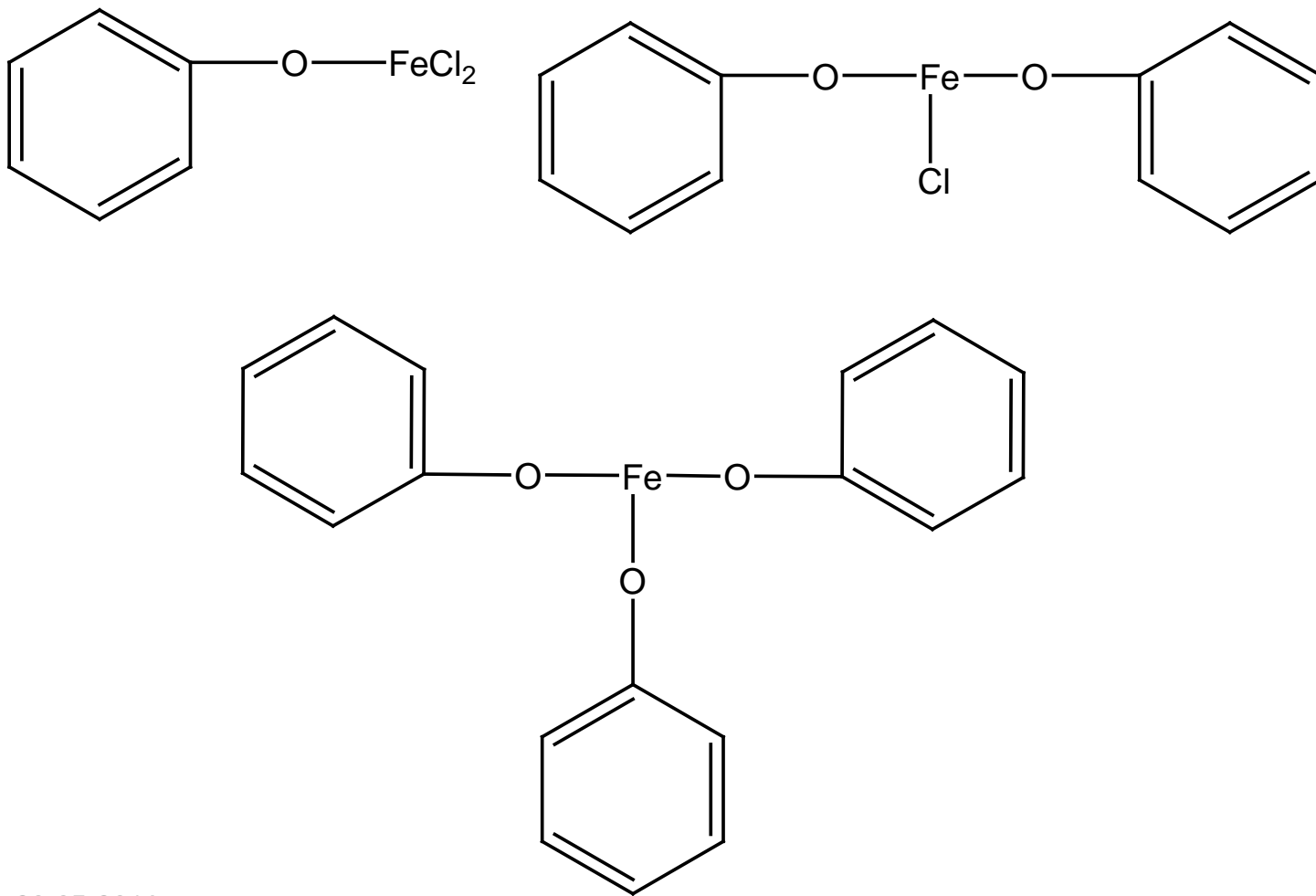


Химико-токсикологический анализ фенола, крезолов

1. Реакция с бромной водой – появляется белый осадок или муть трибромфенола (кристаллы имеют форму игл). При избытке брома реакция идет дальше с переходом в кетоформу:



2. К р-ру прибавляют 1-2 капли 5% свежеприготовленного р-ра FeCl_3 появляется синее или сине-фиолетовое окрашивание. Реакция специфична для фенольного гидроксила.



Химико-токсикологическое определение

этиленгликоля

Метаболизм – летальный синтез

т.кип. 195°C

Выделение из тканей:
перегонка с бензолом

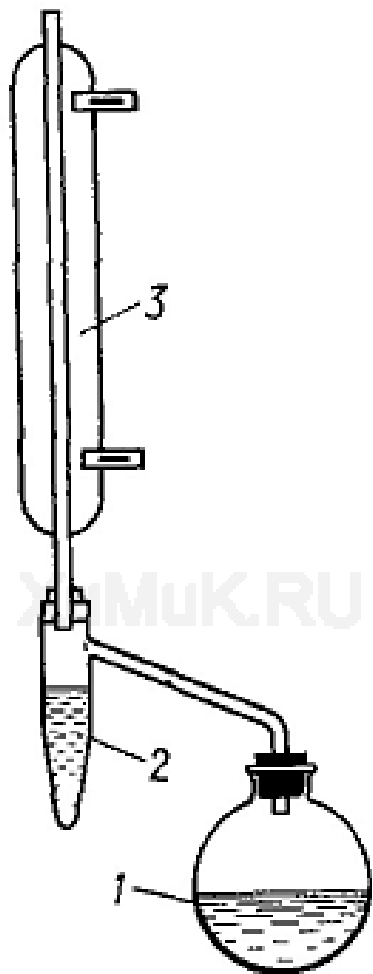


Рис. 5. Аппарат для обнаружения этиленгликоля.

Выделение из тканей: перегонка с бензолом

Пары бензола и увлекаемые им вода и этиленгликоль конденсируются в холодильнике и попадают в специальное приспособление.

Поскольку в этой насадке бензол (плотностью 0,879) находится сверху воды, он стекает в колбу. Вода и находящийся в ней этиленгликоль остаются в насадке. После окончания отгонки разбирают прибор и пипеткой из насадки отбирают необходимое для анализа количество жидкости.

Химико-токсикологическое определение

ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

1. Окисление перманганатом калия в щелочной среде до щавелевой кислоты, подкисление и образование оксалатов калия при добавлении хлорида кальция – помутнение

2. С сульфатом меди в щелочной среде – синяя окраска



3. Окисление до формальдегида и обнаружение его реакцией с фуксинсернистой кислотой – сине-фиолетовое окрашивание



Химико-токсикологическое значение амилового спирта $C_5H_{11}OH$

качественные реакции

- С ванилином (или салициловым альдегидом) в кислой среде – красная окраска

- **Метод микродиффузии широко используется в биохимических и некоторых токсикологических лабораториях для обнаружения химических соединений, имеющих большую упругость паров.**
- Метод микродиффузии позволяет обнаружить летучие вещества, содержащиеся в небольших количествах исследуемых объектов. При использовании этого метода не образуется пена (что возможно при перегонке летучих ядовитых веществ с водяным паром), определяемые вещества не подвергаются сильному разбавлению и г. д.

Для обнаружения исследуемых веществ методом микродиффузии применяют чашки Конвея или подобные им сосуды, в которых летучие вещества из исследуемых объектов сначала переходят в пространство прибора, а затем в соответствующий растворитель или в раствор реактивов, реагирующих с определяемыми веществами.

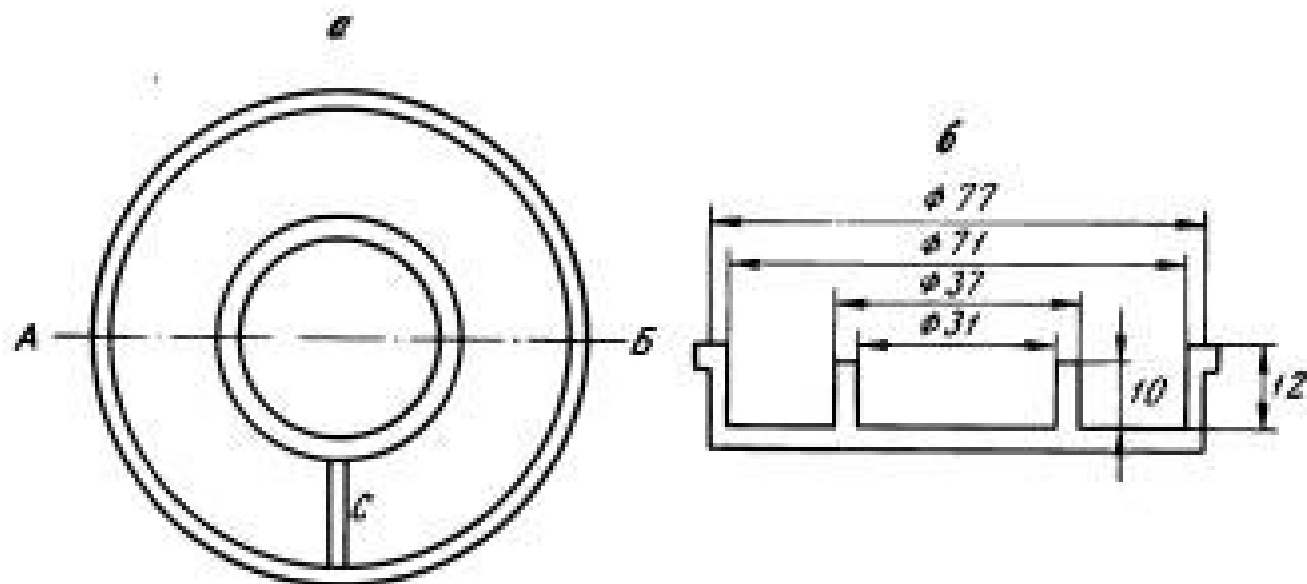


Рис. 4. План чашки Конвея

а — вид сверху; б — разрез по линии АБ. Размеры даны в мм

Летучие вещества из исследуемых объектов сначала переходят в пространство прибора, а затем в соответствующий растворитель или в раствор реактивов, реагирующих с определяемыми веществами.

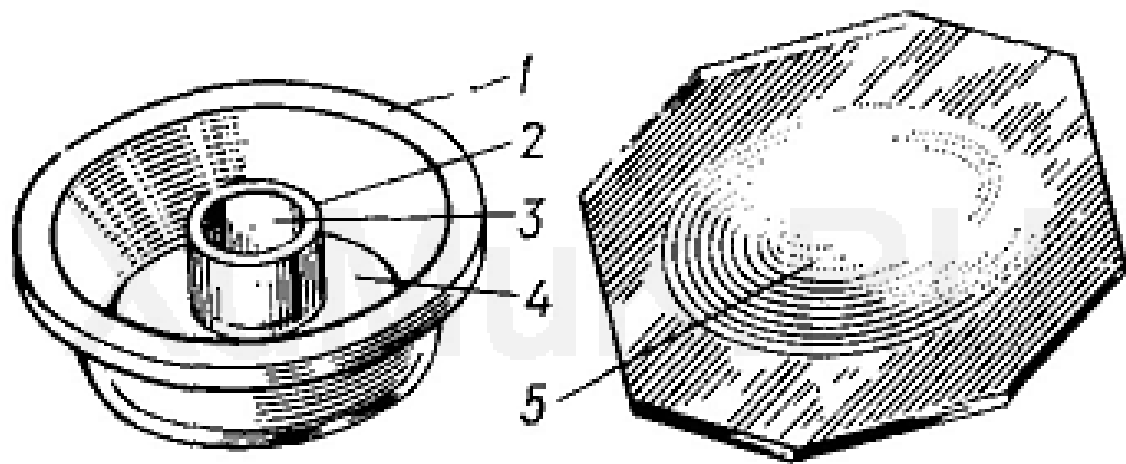
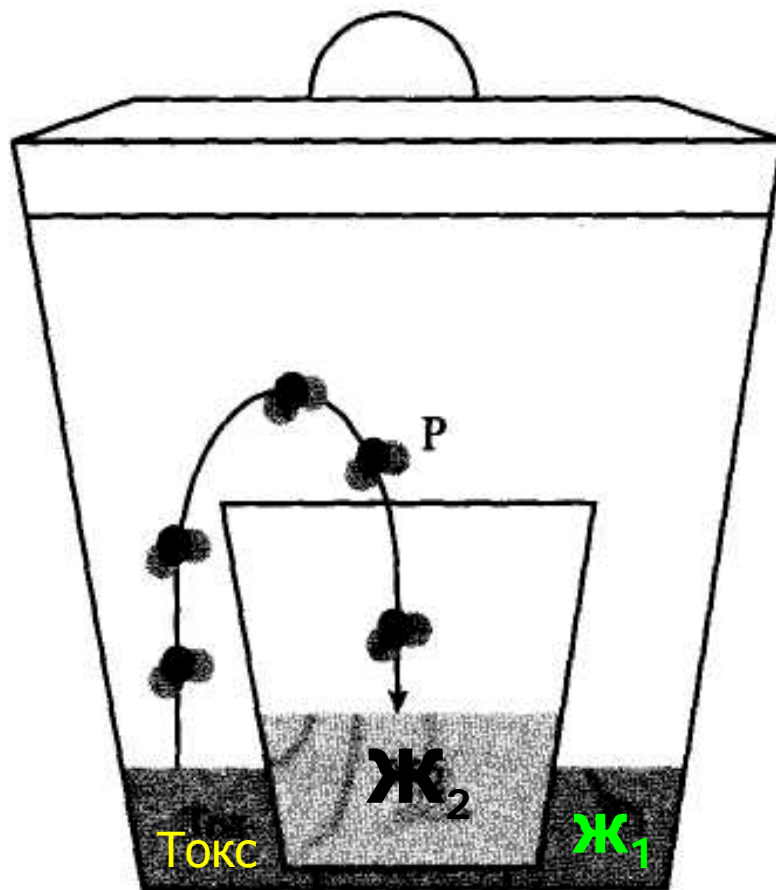


Рис. 1. Прибор для микродиффузии.

Микродиффузия молекул летучего яда (токсина) из вытесняющей жидкости ($ж_1$) в абсорбирующую жидкость ($ж_2$) через газовую фазу до выравнивания давления в системе.



Методика обнаружения отдельных летучих соединений с помощью метода микродиффузии

Обнаружение формальдегида.

В наружную камеру прибора для микродиффузии вносят 3 мл крови или мочи, или 1 г гомогената тканей. Затем в ту же камеру вносят 3—4 капли 10% раствора серной кислоты. Во внутреннюю камеру прибора вносят 3,3 мл 0,15М раствора гидросульфита или сульфита натрия. Прибор плотно закрывают крышкой и оставляют на 4 ч при комнатной температуре. После этого жидкость, находящуюся во внутренней камере прибора, исследуют на наличие формальдегида.

Методика обнаружения отдельных летучих соединений с помощью метода микродиффузии

Обнаружение формальдегида.

1. В наружную камеру прибора для микродиффузии вносят 3 мл крови или мочи, или 1 г гомогената тканей. Затем в ту же камеру вносят 3—4 капли 10% раствора серной кислоты. Во внутреннюю камеру прибора вносят 3,3 мл 0,15М раствора гидросульфита или сульфита натрия. Прибор плотно закрывают крышкой и оставляют на 4 ч при комнатной температуре. После этого жидкость, находящуюся во внутренней камере прибора, исследуют на наличие формальдегида.

Методика обнаружения отдельных летучих соединений с помощью метода микродиффузии

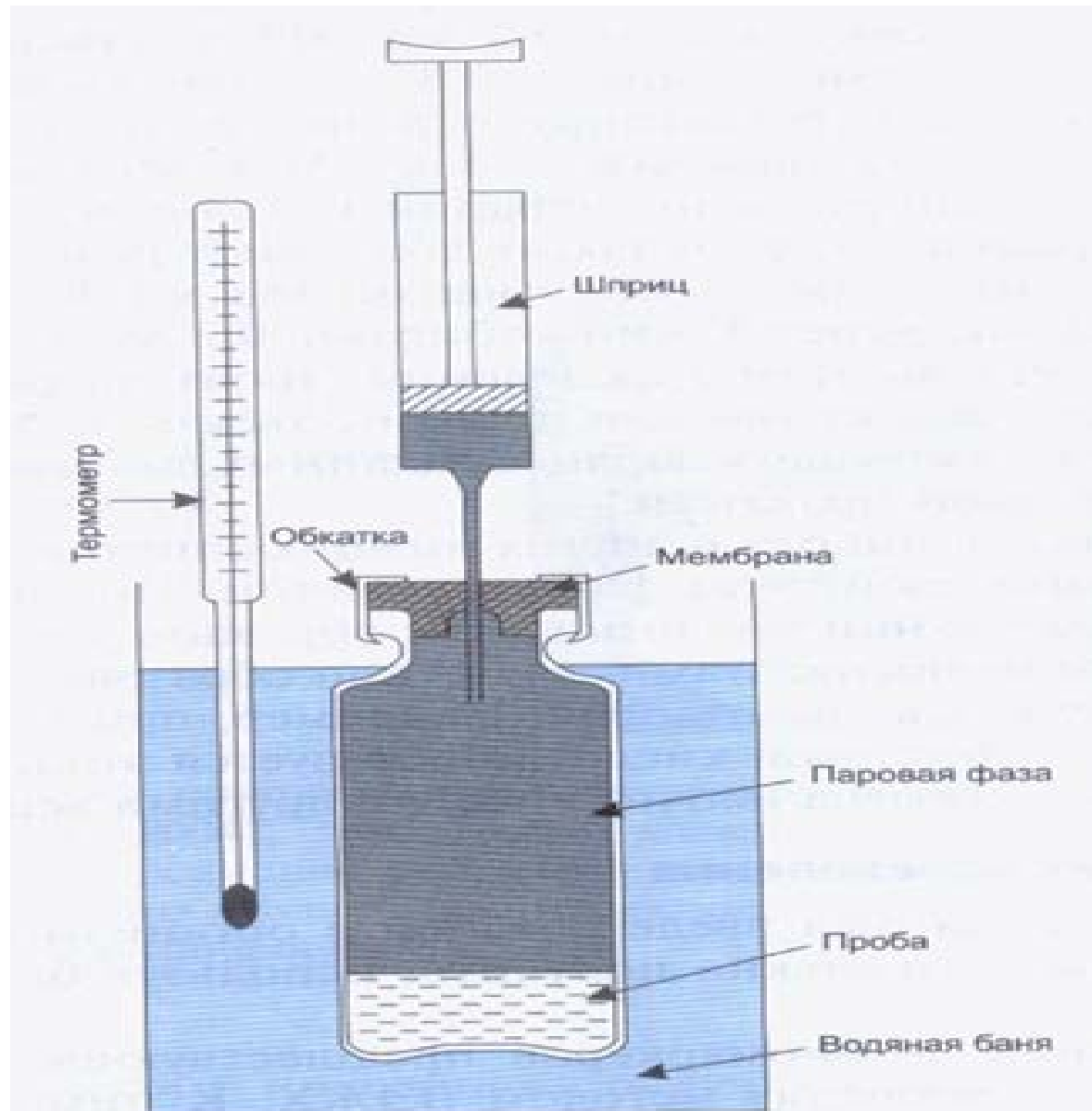
Обнаружение формальдегида.

2. Из внутренней камеры прибора берут 1 мл жидкости, которую вносят в пробирку, и прибавляют 9 мл воды. Пробирку охлаждают ледяной водой, а затем прибавляют 0,2 мл свежеприготовленного 0,5% раствора хромотроповой кислоты и 4 мл концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо взбалтывают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин, а затем охлаждают. О наличии формальдегида в исследуемой пробе свидетельствует появление розовой или фиолетовой окраски.

Подготовка пробы к Газо-Жидкостному Хроматографическому анализу

- Прямой парофазный анализ
- Пробоподготовка, основанная на дериватизации анализируемых соединений

Прямой парофазный анализ



Алкилнитрильный метод

Качественное и количественное определение спиртов C₁-C₅



Методика

- 0,5 мл 50% трихлоруксусной кислоты
- 0,5 мл дефлегмата
- Закрывается пробкой и закатывается
- 0,5 мл 30% нитрита натрия
- Взбалтывается и через 1 мин шприцом отбирается 0,3 мл парогазовой пробы и вводится в испаритель хроматографа

Методика

- При проведении количественного определения в качестве внутреннего стандарта в пробу добавляется 0,5 мл 0,1% н-пропанола