

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВПО «ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО
ОСНОВАМ ЭКОТОКСИКОЛОГИИ**

БЛАГОВЕЩЕНСК

Издательство ДальГАУ

2012

УДК 631.95 (072)

Лабораторный практикум по основам экотоксикологии / сост. С.Г. Харина, А.Б. Козлова, Е.Ю. Григорьянц / Благовещенск: ДальГАУ, 2012. – 94 с.

Лабораторный практикум составлен в соответствии с программой по курсу «Основы экотоксикологии» для направления подготовки 110100.62 «Агрохимия и агропочвоведение». Практикум содержит краткое описание методик отбора и хранения проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и других объектов окружающей среды. Даны характеристики основных экотоксикантов: тяжелых металлов, нитратов, хлорорганических соединений, микотоксинов и т.д. Показаны пути загрязнения объектов окружающей среды поллютантами и вызываемые ими токсикологические эффекты у живых организмов. Представленные в практикуме лабораторные работы позволяют ознакомить студентов с различными способами обнаружения ксенобиотиков: биоиндикация; тонкослойная хроматография; фотоколориметрирование. Включенные в сборник методы анализа широко используются в настоящее время в центрах санэпиднадзора и научных лабораториях. В каждой лабораторной работе изложен порядок выполнения, приведены расчётные формулы, контрольные вопросы и список рекомендуемой по темам литературы.

Рецензенты: к.б.н., доцент Семенова Е.А.

к.х.н., доцент Митрофанова В.И.

Редактор – Казимова А.И.

Издательство ДальГАУ

2012

Введение

Рост численности населения и индустриализация привели к возрастающему загрязнению окружающей природной среды экотоксикантами. В природных объектах экотоксиканты подвергаются разложению, аккумуляции, перераспределению и метаболизму. Наблюдаются случаи избирательного накопления ксенобиотиков в растениях и животных, намного превышающего их содержание в воздухе, воде и почве. Загрязнители, попадая в трофические цепи, могут приводить к непредвиденным негативным воздействиям на живые организмы.

Проблема обеспечения человека полноценными безопасными продуктами питания является важнейшей в ряду других экологических проблем. Актуальность этой проблемы обусловлена не только расширяющимся ассортиментом новых продуктов, созданием новых технологий их производства, использованием все возрастающего количества различных веществ в качестве пищевых добавок, но главным образом отрицательным влиянием на здоровье человека загрязнения окружающей среды, в том числе и через продукты питания. По данным гигиенистов, от 30 до 80% (в зависимости от местных условий) чужеродных химических веществ поступает в организм человека из окружающей среды.

Бесконтрольное использование химических и биологических веществ в сельском хозяйстве, загрязнение почв тяжелыми металлами, в результате воздействия промышленности, автомобильного транспорта, применения химических мелиорантов и удобрений становится очень опасным для природы и человека.

Вместе с тем расширяются исследования за состоянием экосистем, увеличивается сеть лабораторий, изучающих поведение экотоксикантов в объектах окружающей среды. Подготовка высококвалифицированных специалистов – агроэкологов требует освоения ими современных методик определения экотоксикантов в продуктах питания, воздухе, воде, почве и других объектах.

Лабораторная работа 1

Отбор проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания, почвы и воды

Цель работы: ознакомиться с методикой отбора проб.

Теоретические сведения

Для получения достоверных данных о загрязнении сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды следует строго придерживаться правил отбора проб для исследования. Ошибки при отборе проб могут привести к неправильной гигиенической оценке исследуемых образцов.

Целью отбора проб является взятие и доставка для лабораторного анализа проб пищевых продуктов, кормов или сельскохозяйственной продукции в том виде, в каком они употребляются в пищу или передаются для дальнейшей переработки, а также проб воды, почвы и воздуха.

При отборе проб пользуются следующей терминологией. **Ареал отбора проб** – площадь сельскохозяйственных угодий одной территории или одного комплекса хозяйства. **Площадь отбора проб** – площадь поля под одной культурой. **Схема отбора проб** – разработанный на научной основе план сроков отбора проб и размещения точек отбора проб. Эта схема зависит от стадии развития культуры. Схема отбора проб устанавливается так, чтобы сроки отбора проб совпадали со сроками "ожидания", установленными в инструкциях по проведению защитных мероприятий.

Выемка – небольшое количество продукта (зерно, комбикорма, семена, картофель и др.), отобранного из партии за один прием, или почвы, отобранной в одной точке для составления исходного образца. **Выборка** – определенное количество консервированных пищевых продуктов, отбираемое за один прием от каждой единицы упаковки, ящика, клетки, бочки или штабеля неупакованной продукции, для составления исходного образца. **Исходный образец** – совокупность всех выемок и выборок, отобранная из партии или участка почвы. **Разовая проба** – проба, отобранная из каждой единицы упа-

ковки или единицы продукции (баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц). **Общая проба** – совокупность разовых проб. **Средняя проба** – (жиры, молоко, картофель, колбасные изделия) общая проба после тщательного перемешивания и в случае необходимости растапливания разовых проб.

Средний образец – часть исходного образца или средней пробы, выделенная для определения качества. Для небольших партий продукта или участка почвы исходный образец или средняя проба одновременно являются и средним образцом. **Навеска** – точно отвешенная часть среднего образца, выделенная для анализа.

Метод конверта – способ отбора проб сыпучего или поштучного материала, хранящегося насыпью. В зависимости от величины склада или хранилища применяется метод одиночного, двойного или тройного конверта. **Метод квартования** – способ оставления среднего образца из исходного образца. Материал необходимо высыпать на гладкую, чистую и сухую поверхность, чтобы сформировать на ней пирамиду с основанием в форме квадрата. Тщательно перемешать. С помощью двух коротких дощечек со скошенными ребрами насыпать сыпучий растительный материал с двух противоположных концов и ссыпать его с обеих дощечек на середину квадрата до тех пор, пока слой сыпучего растительного материала не приобретет форму продолговатого холмика. Затем набрать дощечками материал с обоих концов холмика и ссыпать его на середину. Сформированную таким образом кучку расплющить в слой, имеющий форму квадрата, и поделить его диагоналями на четыре треугольника, из которых два противоположных отбросить, а из оставшихся снова создать квадрат и поделить его диагоналями на четыре треугольника. Эту процедуру повторять до получения средней или лабораторной пробы нужной величины.

Технология отбора проб сельскохозяйственной продукции и продуктов питания, воды, воздуха, почвы.

Отбор проб складывается из нескольких этапов:

- 1) отбор выемок, выборок, разовых проб;
- 2) составление исходного образца, общей пробы, средней пробы;
- 3) составление среднего образца;
- 4) выделение навесок для анализа.

Отбор выемки. Разовая проба. Растения на поле срезают ножом или серпом, выкапывают или вырывают из земли клубни, срывают плоды чистой рукой. Если растения вырывают, корни следует отряхнуть от земли. Пробы соломоподобного материала, жома и подобных им отбирают рукой, следя за тем, чтобы не разорвать и не сломать отдельных фрагментов материала. Приспособления для отбора проб и руки отбирающего пробы должны быть чистыми и сухими.

Составление исходного образца общей пробы заключается в объединении всех выемок разовых проб. Исходный образец, общую пробу приготавливают в чистом сосуде, на чистом полотняном полотнище соответствующей плотности или на листе бумаги, чтобы предупредить попадание частиц проб на землю.

Составление средней пробы. Среднюю пробу выделяют из общей пробы путем квантования.

Составление среднего образца. Средний образец выделяют из средней пробы или исходного образца после тщательного перемешивания, квартования, размельчения и повторного перемешивания. Растения, загрязненные землей, а также корни растений перед выделением среднего образца следует вымыть под проточной водой, чтобы удалить остатки почвы. При поштучном материале отдельные образцы отобранного материала четвертуют или делят пополам, $3/4$ и $1/2$ материала отбрасывают, а остальную часть включают в образец. Средний образец готовят непосредственно перед началом аналитических работ. Оставшуюся часть средней пробы или исходного образца оставляют для возможного контроля.

Отбор проб воздуха.

Отбор проб воздуха проводят с помощью всасывающих и поглощаю-

щих систем. Воздух (50 л), содержащий пестициды или другие вредные вещества в виде аэрозолей и паров, протягивают через систему поглотителей со скоростью 0,5 – 5,0 л/мин, в течение нескольких минут. Поглотители бывают жидкостные (прибор Зайцева, склянка Дрекслея и др.) и твердые (фильтры, сорбенты и т.д.). Для анализа воздуха помещений систему поглотителей подсоединяют к аспиратору (водоструйный, воздушный или масляный насосы) и прокачивают от 0,5 до 100 л воздуха. Пробы отбирают конвертообразно из 5 точек на уровне 150 см от пола в зоне дыхания людей. Аналогичным образом отбирают пробы воздуха на передвижных лабораториях в городах и других объектах. Пробы лучше анализировать сразу, а если нет такой возможности, хранить их в холодильниках. Срок хранения проб зависит от персистентности пестицида и физико-химических свойств поглотителя.

Отбор проб воды.

Место и сроки отбора проб воды из рек, озер, водохранилищ и других водных объектов выбирают в зависимости от целей исследований, источников возможного загрязнения (стоки сельскохозяйственных угодий, авиаобработки водоемов и т.д.), режима поступления загрязнений, гидрологических характеристик водных объектов и химической природы исследуемого вещества.

Для грунтовых, межпластовых, безнапорных подземных источников (скважин, ключей, колодцев, каптажей) производят исследования не менее девяти проб, взятых по три в весенний, летний и зимний периоды. При наличии нескольких скважин пробы берут из каждой. В первую очередь необходимо забирать воду из колодцев населенных пунктов, расположенных в пойме рек, озер, на полевых станах и т.д.

Для наполненных артезианских скважин на анализ отбирают не менее двух проб, взятых не ранее 24 часов одна после другой.

Чтобы установить влияние на качество воды в водоеме однократных обработок воды пестицидами, берут пробы до начала обработки, затем через 3 часа и на 3-й; 10-й и 20-й день после обработки (при этом учитывают стой-

кость пестицида, применяемого для обработки). Дополнительно берут пробы воды в обследуемом водоеме после сильного и длительного волнения воды.

При многократных обработках одним и тем же препаратом отбор проб производят до обработки, на второй день после первой и последней обработок, через месяц и через два месяца после окончания обработки.

Отбор проб воды из открытых водоемов глубиной до 5 м производят на расстоянии 2 – 5 м от берега с глубины 2,0 – 2,5 м. При ширине водоема до 20 м и глубине 1 м пробу воды лучше брать на середине водоема с глубины 0,5 м. Для водоемов глубиной более 5 м пробу рекомендуется брать батометром с двух сторон на глубине 15 – 50 см от поверхности и от дна.

Наиболее сложно вести отбор средней представительной пробы воды в местах впадения рек, притоков, ручьев в открытые водоемы.

Отбирают пробы воды в стеклянную посуду безукоризненной чистоты. Посуду перед заполнением несколько раз ополаскивают исследуемой водой. Бутылки закрывают притертыми стеклянными или корковыми пробками. Употребление деревянных, резиновых и полиэтиленовых пробок не допускается.

Пробы воды желательно анализировать сразу после отбора. Токсические вещества, устойчивые в водной среде (такие, как пиклорам, дикамба, 2,4-Д и др.), можно хранить в течение нескольких суток в холодильнике или другом прохладном месте, защищенном от света.

Отбор проб почвы.

Отбор проб почвы проводят с помощью специальных инструментов (бур, совок, нож, цилиндр, лопата и т.д.) на площадках размером 100 см².

Для отбора почв на загрязнение промышленными ингредиентами желательно исключить из употребления лопаты, ножи, буры, изготовленные из высококачественной стали. Чем качественнее сталь, тем выше содержание в ней (до 20 – 30% и выше) так называемых легирующих металлов: хрома, никеля, марганца, молибдена, кобальта, ванадия, меди, цинка и др. Лучше пользоваться инструментами из малолегированных сталей с кремнеуглеродистой

закалкой. Однако при очень сильной загрязненности почвы тяжелыми металлами, например, в окрестностях предприятий цветной металлургии, такая строгая предосторожность является излишней.

При наличии на исследуемой территории древостоев пробы почв берут по периметру проекции крон модельных деревьев для получения сопоставимых результатов в пределах фитогенного поля.

Отбор проб почвы для определения микроколичеств пестицидов.

Для отбора почвы выбирают район наиболее интенсивного (по объему) в течение последних 5 – 7 лет применения пестицидов. Отбор проб рекомендуется проводить в весенний и осенний периоды, то есть до обработки пестицидами и после ее прекращения. Если цель исследования – установить динамику миграции пестицидов в звене почва – растение, то отбор проводят не менее 6 раз: фоновые пробы (перед обработкой), затем четырехкратно в период вегетации растений и последний раз в период уборки.

Число исходных образцов зависит от типа почвы, рельефа местности, возделываемых культур, интенсивности применения пестицидов. Отбирают один исходный образец с площади 1 – 3 га в лесной зоне, а также в других районах с волнистым рельефом, с разнообразными почвообразующими породами и неоднородным почвенным покровом. Один исходный образец отбирают также с площади 3 – 6 га в лесостепных и степных районах с расчлененным рельефом и однообразным почвенным покровом. В условиях орошаемого земледелия исходный образец отбирают с учетом размера поливной карты, в среднем один с площади 2 – 3 га.

Для составления исходного образца отбирают по диагонали поля 25 – 30 выемок. При взятии выемок бур погружают в почву на глубину пахотного слоя. Если захвачена часть подпахотного слоя, то эту массу удаляют. Выемка, отобранная тростевым буром, составляет 15 – 20 г почвы. Пробы можно отбирать лопатой. Почвенный образец пахотного слоя, взятый лопатой из одной точки, высыпают на клеенку, перемешивают и из него отбирают пробу строго определенного объема (например, стакан), что представляет выемку,

остальную часть выбрасывают. Все выемки ссыпают вместе, тщательно перемешивают и методом квартования отбирают образец массой 400 – 500 г.

Для взятия исходного образца подпахотного слоя в пяти точках копают прикопки на глубину 50 см. На всю глубину вырезают лопатой образец массой 1,5 – 2,0 кг. После перемешивания из этого образца методом квартования отбирают исходный образец массой 400 – 500 г.

Время от момента отбора почвенных проб до анализа на содержание остаточных количеств пестицидов зависит от группы последних. Если в течение дня анализ не проведен, пробы почвы с содержанием хлорорганических пестицидов (ХОП) высушивают до воздушно-сухого состояния и продолжают анализ. В сухом состоянии образцы с ХОП могут сохраняться довольно продолжительное время. Почвенные пробы с фосфорорганическими пестицидами (ФОП) рекомендуется анализировать сразу или хранить без высушивания в холодильнике не более трех суток. Лучше, если отобранные пробы (по 2-3 навески) экстрагировать сразу. Полученные экстракты (ФОП) при 4°С хранить не более 10 суток, а ХОП – до 30 суток и более.

Отбор образцов почвы на микробиологический анализ проводят с соблюдением правил антисептики. Для этого почвенный нож (бур) протирают спиртом (или одеколоном), обжигают пламенем, после чего отбирают пробы и помещают их в целлофановый пакет, который также предварительно протирают спиртом (или одеколоном).

В лаборатории почву освобождают от крупных примесей (камни, корни и т.д.), измельчают до определенной консистенции, берут несколько навесок для определения влажности и анализа токсикантов.

Для микробиологического анализа эти операции производятся в условиях, близких к стерильным. Для этого тщательно протирают спиртом рабочую поверхность стола, а отбор корешков производится вблизи пламени горелки (см. «Подготовка образцов к анализу»).

Анализ образцов желательно проводить сразу после их отбора, особенно это касается микробиологических исследований.

Если анализ невозможно сделать из свежих образцов почвы (их можно на сутки оставить в холодильнике), образцы высушивают до воздушно-сухого состояния, после чего они могут храниться длительное время. В этом случае перед микробиологическим посевом целесообразно провести «оживление» почвы (см. раздел «Подготовка образцов к анализу»).

Отбор проб растений.

Отбор проб растений в полевых условиях производят в нескольких местах на равном расстоянии по двум диагоналям участка. Средний образец составляют из 20 – 30 индивидуальных образцов растений. Для исследования многолетних кормовых растений берут 1/4 куста у 15 растений. В зависимости от целей и задач исследований анализируют целое растение или отдельные его части (листья, стебли, корни и т.д.).

Для определения токсикантов в отдельных органах растений необходимо использовать только определенные части растений.

Древесные, кустарниковые растения или отдельные органы отбирают специально модифицированным методом. Например, для отбора листьев крону делят на горизонтальные слои, из которых по окружности отбирают несколько листьев. Пробы объединяют, тщательно измельчают и проводят анализ.

Отбор образцов проводят по диагональным участкам не менее чем с 10 деревьев или кустарников методом средней пробы со всей кроны.

Анализ образцов желательно проводить сразу после отбора. Если этого сделать невозможно, то их можно хранить в холодильнике (морозильнике) при температуре от – 10 до – 30°С. Изучение метаболизма, поступления, распределения и накопления поллютантов в растительном организме следует проводить только в свежих пробах.

Отбор проб плодов, овощей и корнеплодов.

Отбор проб плодов, овощей и корнеплодов проводят также по диагоналям.

Средние образцы овощей (томат, перец, баклажаны, огурец, лук, салат)

и корнеплоды отбирают через равные промежутки через 6 – 10 растений. Плоды берут по ярусам (верхний, средний, нижний) не менее, чем с 20 – 25 растений. Картофель или земляную грушу (урожай) делят на две половины, в которые включают в равных количествах крупные, средние и мелкие клубни. Из них составляют средний образец для анализа.

Формирование средних образцов урожая плодовых и ягодных культур для анализа проводят более чем с 10 деревьев или кустарников. Плоды, ягоды и гроздья берут с разных ярусов и сторон. Пробу взвешивают, перемешивают и анализируют.

Отбор проб зерна и других сыпучих продуктов.

Отбор проб зерна и других сыпучих продуктов массой более 20 кг проводят совком или щупом из разных участков партии. Объединенные части проб разделяют (метод квартования) крестообразно и из каждой части формируют средний образец. Перед анализом среднюю пробу измельчают, пропускают через сито с диаметром отверстий 1,0 мм.

Подготовка образцов к анализу.

Особое внимание следует обратить при анализе пестицидов на хранение исследуемого биологического материала. Его обычно помещают в холодильную установку, а температуру устанавливают в зависимости от ассортимента пестицидов и сроков их хранения (обычно – 10 – 20°C). Это связано с различными реакциями, в которые могут вовлекаться пестициды в биологических объектах. На разложение пестицидов большое влияние могут оказать микроорганизмы. Вышеперечисленные и другие факторы могут приводить к изменению химического состава пестицидов. Поэтому экстракцию пестицидов из растительного материала, воды, почвы и других объектов лучше проводить сразу после отбора пробы.

Анализ быстро разлагающихся пестицидов желательно проводить незамедлительно, анализ стойких препаратов, например, хлорорганических, можно проводить позже. Степень деградации пестицидов зависит не только от химического строения, хранения, но и от биологических объектов, в кото-

рых они находятся.

Процесс измельчения является важным моментом при подготовке пробы к анализу. Воздушно-сухие образцы почвы и растительного материала тонко измельчают, свежие образцы растительного материала тщательно гомогенизируют. Целесообразно анализировать свежие растительные образцы. Концентрацию пестицидов в биологических объектах можно выразить как в миллиграммах на килограмм сухого вещества, так и в других единицах: г/га д.в.; кг/га – для почвы; нг/м – для воздушной среды; нг/л – для водных объектов и атмосферных осадков.

Извлечение пестицидов из биологических объектов является весьма кропотливым и ответственным моментом при анализе пестицидов. Оно проводится различными способами, наиболее широко известны экстракция органическими растворителями, перегонка с водяным паром, кодистилляция в токе азота, вакуумная сублимация и другие.

Подготовка образцов к микробиологическому анализу и сам анализ проводится в помещении с соблюдением правил асептики. Для этого помещение стерилизуется. Дезинфекция воздуха лабораторий наиболее часто проводится с помощью облучения ультрафиолетовыми лучами. Эти невидимые глазом лучи (длина волны от 400 до 10 нм) обладают высокой антимикробной активностью и могут вызывать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. Продолжительность стерилизации от 30 мин до нескольких часов (в зависимости от степени загрязненности воздуха).

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются бактерицидные лампы. Следует учитывать, что при длительной непрерывной работе бактерицидной лампы интенсивность излучения снижается, поэтому целесообразно вести облучение с перерывами.

Пол, стены и мебель обрабатывают пылесосом и протирают растворами различных дезинфицирующих веществ. Установлено, что при четырехкратном проведении щеткой пылесоса по поверхности предмета с него удаляется около 47 % микрофлоры, а при двенадцатикратном – до 97 %.

В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего используют 2 – 3%-й раствор соды (бикарбоната натрия), 3 – 5%-й раствор фенола (карболовой кислоты) или лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла), 0,5 – 3%-й раствор хлорамина, 70%-й (по объему) раствор этилового спирта и другие дезинфектанты.

Рабочее место, где непосредственно проводится работа с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Причем рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать общепринятые дезинфектанты. Предпочтение отдается спиртам (70%-му этиловому или изопропиловому), так как они эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты могут использоваться также для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол.

Микробиологические исследования можно проводить также в специальных камерах – боксах.

В образцах почвы, предназначенных для микробиологического анализа, в стерильных условиях должны быть тщательно отобраны все корешки. Параллельно в металлические бюксы отбирают образцы почвы на влажность. Если работа выполняется с сухими образцами почвы, их предварительно целесообразно «оживить». Для этого почва увлажняется стерильной водопроводной водой до 60% от полной влагоемкости и ставится на сутки в термостат при температуре 24 – 26°C.

Перед анализом готовят воду для разведений. Для этого берут водопроводную воду и разливают ее в конические 250 мл колбы Эрленмейера по 90 мл и по 9 мл в пробирки и закрывают ватными пробками. Пробирки закладываются в специальные ведра (сверху их лучше прикрыть бумагой), колбы – в биксы, и все стерилизуется в автоклаве при 0,1 МПа в течение 30 минут.

Параллельно со стерилизацией воды для разведения проводится и сте-

рилизация стеклянной посуды (чашки Петри, пипетки, шпатели). Для этого посуду заворачивают в бумагу. Чашки Петри – по 2 – 3 вместе; пипетки – в длинные полоски бумаги; шпатели – каждый в отдельности, и стерилизуются сухим жаром в специальных печах Пастера или сухожаровых шкафах в течение 2 часов при температуре 165 – 170°C (предварительно в концы пипеток, которые берутся в рот, вставляют ватные тампоны).

Техника безопасности при подготовке и проведении микробиологического анализа.

Работа по подготовке и проведению микробиологического анализа требует соблюдения определенной техники безопасности, что обусловлено, с одной стороны, применением различных средств и способов стерилизации, небезопасных для человека, а с другой, – возможностью заражения микробными токсинами.

Так, нельзя находиться при включенной бактерицидной лампе в небольших помещениях, так как ультрафиолетовое излучение вызывает химические изменения молекул живых клеток, главным образом, молекул нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и белков, что приводит к нарушению деления, возникновению мутаций и гибели клеток. Особенно опасно влияние ультрафиолетового излучения на органы зрения, поэтому при необходимости работы с бактерицидной лампой обязательно нужно избегать попадания в глаза как прямых, так и отраженных ее лучей.

Некоторые дезинфектанты (например, фенол) при попадании на кожу вызывают ожоги, поэтому необходимо тщательно соблюдать меры предосторожности при работе с ними. Следует соблюдать осторожность и при использовании спирта в качестве дезинфектанта: микробиологический анализ проводится с использованием пламени горелки (спиртовки), поэтому во избежание случаев возгорания нельзя проводить стерилизацию кожи рук и рабочей поверхности вблизи горящего пламени.

Кожа рук не должна иметь ссадины и раны. Не рекомендуется подносить открытую засеянную чашку Петри к лицу и тем более вдыхать ее со-

держимое.

Экстракция токсичных веществ.

Результаты анализа токсикантов зависят не только от способа отбора, условий хранения, но и способов их извлечения из анализируемых объектов.

Экстракция органическими растворителями получила наибольшее распространение. Она используется для выделения, концентрирования и очистки пестицидов от коэкстрактивных веществ. Выбор растворителя играет важную роль и должен удовлетворять следующим требованиям: хорошо растворять токсикант, не извлекать других соединений и вызывать слабый сигнал детектора. Вещество извлекают из раствора и твердого вещества одной или несколькими порциями растворителя при комнатной температуре.

Переэкстракцию можно производить между двумя несмешивающимися жидкостями. Распределение поллютантов в этом случае зависит от его концентрации относительно жидких фаз, ассоциации с растворителем и примеси других компонентов. Согласно закону Нернста, отношение концентраций растворенного вещества в двух несмешивающихся жидкостях, находящихся в равновесии, при определенной температуре является величиной постоянной.

В качестве растворителя широко используют ацетонитрил, н-гексан, пентан, бензол, этиловый и метиловый спирты, петролейный и диэтиловые эфиры, хлороформ и другие, а также смеси растворителей.

Полярные соединения извлекают дистиллированной водой, ацетонитрилом, метиловым и этиловым спиртами, ацетоном и другими.

Выбор растворителя для экстракции токсикантов из биологических объектов производится с учетом способности растворителя экстрагировать как можно меньше коэкстрактивных веществ. Если экстрагент хорошо растворяет пигменты, липиды, воскоподобные вещества, которые присутствуют в биологических объектах, то его применение ограничивают или применяют переэкстракцию. Коэкстрактивные вещества меньше переходят в гексан, пентан и петролейный эфир. Кроме того, эти растворители чаще всего ис-

пользуются для извлечения слабополярных соединений.

Экстракты очищают от примесей различными способами. Широко применяется очистка посредством колоночной хроматографии с использованием флоризола, окиси алюминия различной степени активности, активированного угля, силикагеля и других.

Очистку, как уже упоминалось, можно производить перераспределением между двумя несмешивающимися жидкостями, минеральными кислотами, кодистилляцией, вымораживанием, сублимацией, тонкослойной хроматографией и другими способами.

Выбор растворителя для газохроматографического анализа токсиканта перед непосредственным вводом пробы в хроматограф также играет существенную роль. Так, например, растворители, содержащие хлор и другие галлоиды, сероуглерод и ацетонитрил, нельзя вводить в хроматограф при анализе пестицидов посредством электронно-захватного детектора, так как он высокочувствителен к этим веществам.

Систематический контроль за остаточными количествами пестицидов.

Контроль за остаточными количествами пестицидов в сельскохозяйственных продуктах осуществляется систематически в соответствии с разработанным планом. Для этого создаются постоянные пункты отбора проб не менее чем на пятилетний – период. В районе, области организуют сеть из нескольких постоянных пунктов. Численность пунктов зависит от числа и величины хозяйства данной территории, а также от возможностей контроля со стороны санэпидемстанций.

Пробы берут периодически и постоянно с одних и тех же полей, из хранилищ, водоемов, ареалов и других пунктов контроля. Благодаря этому возникает возможность постоянного и непрерывного контроля за уровнем остатков пестицидов. Достоинством постоянных пунктов отбора проб является возможность в динамике систематически контролировать уровень остаточных количеств пестицидов в определенной среде или в продуктах пита-

ния, плавно и оперативно вмешиваться при необходимости, а также выявлять влияние предшествующих химических обработок на формирование уровня загрязнения.

Формирование пунктов отбора проб. К ним относятся пункты, контролируемые на протяжении одного сезона применения пестицидов или не более одного года.

Выборочные пункты отбора проб. На контролируемой территории выборочно отбирают пищевые пробы и пробы из различных объектов окружающей среды. Характерной чертой этой системы является изменчивость ареала отбора проб.

Лица, уполномоченные для отбора проб. Отбирают пробы для систематического контроля квалифицированные работники, уполномоченные соответствующими государственными органами для отбора проб.

Порядок приема проб в лабораторию. Все образцы, поступающие в лабораторию, осматривают, вскрывают, регистрируют в журнале, отмечают 1) дату поступления образца; 2) кто направил образец для исследования; 3) место и дату отбора; 4) наименование пробы; 5) характеристику пробы (данные по объекту исследования из акта отбора проб); 6) основные причины возможного загрязнения; 7) массу образца (число); 8) подпись лица, принявшего образец для исследования; 9) результат.

В лаборатории к исследованию образцов приступают в тот же день. При отсутствии этой возможности образец помещают в холодильник, но не более чем на 3 суток со времени отбора среднего образца.

Сохранность средних образцов. Средние образцы сохраняют на холоде до конца анализа, при обнаружении пестицидов выше нормативов - до вручения результатов исследования и принятия мер. После этого средние образцы уничтожают. Из лаборатории образцы можно выдавать только по требованию следственных органов. Результаты анализа регистрируют в лабораторном журнале.

Оборудование: бур или лопата, плотный лист бумаги, короткие дощеч-

ки со скошенными ребрами, целлофановый пакет, набор сит, пинцет.

Порядок выполнения работы: согласно данной инструкции отобрать пробы почвы для определения микроколичеств пестицидов.

Контрольные вопросы:

1. Из каких этапов складывается отбор проб сельскохозяйственной продукции и продуктов питания, воды, воздуха, почвы?

2. Какие методы лежат в основе составления разовых проб, исходных образцов, средней пробы и среднего образца?

3. Особенности отбора проб воды и воздуха.

4. Особенности хранения проб почвы на микробиологический анализ и для определения микроколичеств пестицидов.

5. Особенности отбора проб растений, плодов, овощей, корнеплодов, зерна и других сыпучих продуктов.

6. В чем заключается подготовка образцов к анализу?

7. Какие правила техники безопасности необходимо соблюдать при подготовке и проведении микробиологического анализа?

8. Способы извлечения токсических веществ из анализируемых объектов.

9. Порядок приема проб в лабораторию.

10. Какова цель систематического контроля за остаточными количествами пестицидов?

Список литературы:

1. ГОСТ 17.4.3.01 – 83. Почвы. Отбор проб для контроля загрязнений.

2. Определение экотоксикантов в воде, воздухе, почве, растениях и продукции растениеводства. – М.: Изд. МСХА, 1995. – 89 с.

Лабораторная работа 2

Методы определения токсического влияния почвенных микроорганизмов на растения

Цель работы: изучить причины фитотоксичности почв, научиться определять общий и микробный токсикоз почвы.

Теоретические сведения

Почвоутомление и токсикоз почв вызываются многими причинами. В качестве наиболее существенных называют следующие:

- односторонний вынос питательных веществ, недостаток микроэлементов, нарушение солевого баланса почвы, в частности «перекармливание» почвы удобрениями;
- нарушение структуры и физико-химических свойств почвы, особенно при длительном возделывании пропашных культур;
- развитие фитопатогенной микрофлоры;
- одностороннее развитие некоторых групп почвенных микроорганизмов в ущерб другим;
- усиленное размножение вредителей;
- чрезмерное размножение злостных сорняков;
- сдвиг pH;
- накопление фитотоксических веществ в почве.

Почвоутомление и токсикоз рассматривается как результат нарушения экологического равновесия в системе почва – растение, являющегося следствием одностороннего воздействия на почвенную среду культурных растений и ксенобиотиков. В качестве определяющего фактора выступает перегруппировка почвенных микроорганизмов в направлении повышения удельного веса агрономически менее ценной и вредной микрофлоры, в частности, увеличения доли микроскопических грибов, актиномицетов и фитотоксичных форм в общем количестве микроорганизмов.

Фитотоксичные формы имеются у всех основных групп почвенных

микроорганизмов, но наибольшее их количество обнаружено среди микроскопических грибов. Наиболее значительное количество фитотоксичных видов найдено среди грибов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, среди бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus*

Распространены фитотоксичные микроорганизмы во всех почвах. Источниками поступления в почву фитотоксических веществ являются послеуборочные остатки сельскохозяйственных культур, а также прижизненные выделения надземных органов растений и корневые выделения.

С продуктами метаболизма корневых систем клевера, люцерны, льна связано сильное утомление этих культур при бессменном возделывании.

Химическая природа фитотоксических веществ (колинов), обуславливающих токсичность почв, весьма разнообразна. Это производные фенолов, хинонов и нафтизина, полипептиды и другие соединения.

Разнообразны и физиологические свойства фитотоксинов. Они могут быть канцерогенами для животных, действовать как антагонисты по отношению к гиббереллинам и ауксинам, подавлять действие некоторых ферментов и нарушать информационную активность РНК, снижать синтез хлорофилла и т.д.

Определение активности водорастворимых колинов, выраженное в условных кумариновых единицах (УКЕ), часто используется как показатель токсичности почвы. Следует, однако, иметь в виду, что содержание колинов в водной вытяжке из почвы не дает полного представления об уровне ее токсичности, так как значительная часть физиологически активных веществ находится в почве в поглощенном состоянии и может поступать в растение в процессе обменных реакций. Поэтому в качестве показателей токсичности целесообразнее использовать действие самой почвы на тест – организмы. Наиболее приемлем для этих целей метод почвенных пластин с применением прямого биотестирования.

Чтобы идентифицировать токсичность почв различного происхождения, определяют общую токсичность почвы методом почвенных пластин, а

микробный токсикоз почвы – методом почвенных пластин с инициированным микробным сообществом, которое получают после обогащения образца почвы крахмалом или глюкозой.

Разница в результатах, полученных этими методами, свидетельствует о наличии микробного токсикоза почвы помимо токсикоза, вызванного техногенным загрязнением.

Для установления токсичности почвы используют в качестве теста реакцию проростков высокочувствительных растений (кресс-салата, редиса, гороха и др.).

1. Определение общего токсикоза почвы

Необходимые материалы: семена испытуемых растений.

Приборы и оборудование: бумага фильтровальная, вата хирургическая, камера для проращивания семян, пинцет, чашки Петри, шпатель металлический.

Порядок выполнения работы

Испытуемую почву с помощью пинцета освобождают от крупных корневых остатков и тщательно перемешивают металлическим шпателем. Навеску 60 г помещают в чашку Петри (опыт проводят нестерильно). Почву увлажняют водой до состояния густой пасты и тщательно размазывают по чашке Петри. На поверхность почвенной пластинки раскладывают от 10 до 50 семян испытуемого растения (в зависимости от их размера), предварительно замоченных в водопроводной воде в течение суток. Обычно используют семена культур, возделываемых на изучаемых почвах. Контрольные семена раскладывают на увлажненной вате, покрытой фильтровальной бумагой. Семена проращивают в течение 5 – 7 дней при постоянной температуре во влажной камере.

Степень токсичности почвы определяют по разнице в количестве проросших семян и длине проростков и корней в опыте и контроле. Токсичными считают почвы, вызывающие угнетение прорастания семян на 20 – 30% и бо-

лее. Определение токсичности почвы рекомендуется проводить на свежих образцах почвы, так как после хранения образцов токсичность их значительно меняется.

2. Определение микробного токсикоза почвы

Реактивы, необходимые материалы: крахмал, семена кресс-салата или редиса.

Приборы: влажная камера для проращивания семян.

Порядок выполнения работы

На поверхность почвенной пластинки в чашке Петри наносят тонкий слой крахмала полоской в 1 см по диаметру чашки. Для этого на почвенную пластинку осторожно накладывают два чистых листа бумаги так, чтобы расстояние между ними было 1 см; чашку с почвой переворачивают и по диаметру чашки прикладывают на 1 секунду к крахмалу. Лишнее количество крахмала сдувают сжатым воздухом так, чтобы осталась тонкая полоска не более 2 – 3 слоев крахмальных зерен. Чашки с почвой помещают в другие чашки большего размера, на дно которых налита дистиллированная вода для поддержания постоянной влажности.

Почву инкубируют во влажной камере в течение месяца при 25°C. Затем на крахмальную полоску раскладывают 15 – 20 семян кресс-салата или редиса. Контролем служат семена растений, помещенные на поверхность почвы без крахмала. Через 3 – 5 суток измеряют длину корешков и проростков у опытных и контрольных растений и по разнице в их длине судят о микробном токсикозе.

Контрольные вопросы:

1. Какими причинами вызывается токсикоз почвы?
2. Назовите источники поступления фитотоксических веществ в почву.
3. К каким группам химических веществ относятся фитотоксины?
4. Какое физиологическое воздействие оказывают колины на растения, животных и человека?

5. В каких единицах выражается активность водорастворимых колинов, почему она не дает полного представления о токсичности почвы?

6. В чем заключается сущность метода почвенных пластин с применением прямого биотестирования? Как с его помощью можно определить общую и микробную токсичность почвы?

Список литературы:

1. Руссель, С. Микроорганизмы и жизнь почвы./ пер. с польского Г.Н. Мирошниченко. – М.: Колос, 1977. – 224 с.

2. Кирюшин, В.И. Экологические основы земледелия. – М.: Колос, 1996. – 367 с.

3. Берестецкий, О. А. Фитотоксины почвенных микроорганизмов и их экологическая роль // Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов. – Л.: Агрометиздат, 1978. – С. 7 – 15.

4. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М. : Изд. МГУ, 1991. – 105 с.

Лабораторная работа 3

Определение в почве активности ферментов

Цель работы: ознакомиться с факторами, влияющими на ферментативную активность почвы, научиться определять активность дегидрогеназ и инвертазы в почве.

Теоретические сведения

В почве постоянно происходит синтез, разложение и преобразование различных химических соединений. Большинство этих процессов осуществляется при участии особых биокатализаторов-ферментов (энзимов). Вообще ферментами мы называем химические соединения, ускоряющие все химические реакции, происходящие при обмене веществ клетки.

В химическом отношении ферменты являются белками. Однако лишь небольшая часть их состоит из чистого белка. Считается, что фермент состо-

ит из двух частей: апофермента – белковой части и кофермента – небелковой части. В большинстве случаев каталитические свойства ферментов обусловлены наличием кофермента. Коферментами могут служить витамин, нуклеотид или просто ион металла (например, железа, молибдена или меди).

Все ферменты обладают ярко выраженной специфичностью, то есть избирательным действием на тот или другой субстрат. Номенклатура их составляется путем прибавления к названию субстрата, на который он действует или к названию процесса, катализируемого ферментом, окончания «аза». Например, фермент, воздействующий на крахмал (*amylum*), называется амилаза, мочевины (*urea*) – уреаза и т.д.

Ферменты, вырабатываемые микроорганизмами, можно разделить на эндо – и экзоферменты. Эндоферменты участвуют в биохимических процессах внутри клетки, а экзоферменты выделяются клеткой наружу, в окружающую среду (почву), где превращают сложные соединения, не усвояемые ею, в более простые и доступные. Например, целлюлозные микроорганизмы способны использовать целлюлозу в качестве источника углерода и энергии. Для этого они выделяют фермент целлюлазу, который в почве гидролизует молекулы целлюлозы на простые сахара, а они могут усваиваться целлюлозными организмами.

Экзоферменты, выделяемые микроорганизмами и корнями высших растений, не единственный источник активности почвы, тем более что они до некоторой степени зависят от выделившей их клетки. Источником свободных ферментов также являются живые организмы, для которых почва является средой обитания: бактерии, грибы, водоросли, дождевые черви, нематоды и другие почвенные животные, а также корни высших растений. Все эти организмы рано или поздно отмирают и их останки остаются в почве. Клетки этих организмов подвергаются автолизу, в результате чего их содержимое вместе с ферментами попадает непосредственно в почву. Данный источник очень обилен. Свободные почвенные ферменты – это конгломерат ферментов весьма различного происхождения. Они являются основой почвенного мета-

болизма, благодаря которому происходит разложение минералов и образование гумусных соединений, разложение органических веществ и синтез новых.

На качественный и количественный составы ферментативных систем, выделяемых в почву прижизненно или после смерти клеток, влияет формирование популяций микроорганизмов, заселяющих определенное почвенное местообитание.

Не каждый фермент может найти в почве условия, подходящие для проявления его активности, и поэтому, подобно тому, как условия внутри живой клетки определяют образование в ней ферментного белка и его активности, так и в почве физико-химические условия определяют состав действующих в ней ферментов. Вот почему, анализируя ферментативную активность различных почв, обнаруживают огромные различия в количестве и активности ферментов.

На ферментативную активность почвы влияют различные факторы среды: температура, влажность, аэрация, механический состав, структура, гумус, минералогический и элементарный составы, засоление, рН, степень загрязнения ксенобиотиками. Например, элементы тяжелых металлов имеют тенденцию к ингибированию определенного фермента или группы ферментов. Так, кадмий имеет тенденцию к инактивированию фосфатазы, свинец – каталазы и т.д.

Предлагается степень загрязнения почв учитывать по ферментативной активности: активность уреазы, инвертазы, дегидрогеназы, нитрат – и нитритредуктазы, составляющая до 30% от активности этих ферментов на контроле, – сильная степень загрязнения, 31 – 70% - средняя степень загрязнения, 70% - слабая степень.

Наиболее просто определить ферментативную активность дегидрогеназ и инвертазы. Для определения активности дегидрогеназ в почве – ферментов класса оксидоредуктаз, катализирующих реакции отщепления водорода от одного субстрата и переносящих его на другой и участвующих в

процессах катаболизма (разрушения) всех типов питательных веществ, – в качестве акцептора водорода применяют бесцветные соли тетразолия (2,3,5-трифенил-тетразолий хлористый, ТТХ), которые восстанавливаются в красные соединения формазанов (трифенил – формазан, ТФФ).

1. Определение активности дегидрогеназ в почве

Реактивы: соль тетразолия (2,3,5 – трифенил – тетразолий хлористый. ТТХ), углекислый кальций, спирт этиловый.

Приборы, оборудование: термостат биологический, вакуумный насос, фотоэлектроколориметр, вакуумная колба на 50 мл с притертой стеклянной пробкой, колбы мерные на 25 мл.

Порядок выполнения работы

Навеску почвы 1 г помещают в 50-миллиметровую вакуумную колбу с притертой стеклянной пробкой, добавляют 10 мг углекислого кальция и тщательно смешивают. Для определения дегидрогеназ лучше использовать свежие образцы почвы, так как при высушивании образцов почвы активность этого фермента падает на 50 – 80%. Затем добавляют 1 мл 1%-го раствора ТТХ. Определение проводят в анаэробных условиях, для этого воздух из колбы эвакуируют при разрежении 10 – 12 мм рт. ст. в течение 2 – 3 мин. Колбу осторожно встряхивают и ставят в термостат при 38°C на 24 часа. Контролем служит стерилизованная почва и субстраты без почвы. После окончания инкубации в колбы добавляют по 25 мл этилового спирта и встряхивают в течение 5 мин. Содержимое колбы фильтруют, и полученный раствор ТФФ колориметрируют на фотоэлектроколориметре, используя кюветы шириной 5 мм и синий светофильтр с длиной волны 500 – 600 мм. Количество формазана в мг рассчитывают по стандартной кривой.

Для составления калибровочной кривой готовят стандартный раствор формазана в этиловом спирте (0,1 мг в 1 мл), затем в мерные колбы на 25 мл берут соответствующее количество стандартного раствора, содержащее от 0,1 до 1,0 мг формазана, этанолом доводят до метки и фотоколориметрируют согласно вышеописанному способу. Активность дегидрогеназ выражают в

миллиграммах ТФФ на 10 г почвы за сутки. Ошибка определения – до 3%.

2. Фотокolorиметрический метод определения инвертазы

Реактивы: ацетатный буфер (рН 4,7), сульфат меди, 5%-й раствор сахарозы, сегнетова соль, толуол.

Приборы, оборудование: термостат биологический, фотоэлектроколориметр, центрифуга на 3 тыс.об./мин, баня водяная, качалка автоматическая, колбы химические мерные на 100 мл, колбы химические на 50 мл (конические), пипетки химические на 10 мл, пробирки центрифужные, резиновые пробки.

Порядок выполнения работы

В колбу емкостью 50 мл помещают 5 г почвы, добавляют 10 мл 5%-го раствора сахарозы, 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 5 – 6 капель толуола. Колбу закрывают пробкой, встряхивают и помещают в термостат при температуре 30°С на 24 часа, периодически встряхивая. Контроль – стерильная почва (3 часа при 180°С) и чистый субстрат.

После инкубации содержимое колб фильтруют в 100-миллилитровые мерные колбы. Из фильтрата берут 6 мл в большие пробирки, добавляют 3 мг сегнетовой соли и 3 мл раствора сульфата меди, хорошо перемешивают и кипятят на водяной бане в течение 10 минут. Затем пробирки с раствором охлаждают в холодной воде, содержимое переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 5 – 7 мин при 3000 об./мин. Прозрачный центрифугат колориметрируют на фотоэлектроколориметре (светофильтр – 630 нм, кювета шириной 1 см).

Контрольные вопросы:

1. Какие вещества называются ферментами?
2. В чем проявляется специфичность действия ферментов?
3. Номенклатура ферментов?
4. Источники ферментативной активности почвы?
5. Какие факторы влияют на ферментативную активность почвы?

Список литературы:

1. Руссель, С. Микроорганизмы и жизнь почвы./ пер. с польского Г.Н. Мирошниченко. – М.: Колос, 1977. – 224 с.
2. Кирюшин, В.И. Экологические основы земледелия. – М.: Колос, 1996. – 367 с.
3. Галстян, А.Ш. Регуляция ферментативных процессов почв./ А.Ш. Галстян, О.А. Абрамян // В кн.: Проблемы почвоведения. М.: Наука, 1982. – С – 167 – 204.

Лабораторная работа 4

Накопление фенольных соединений в органах цветковых растений, мхах, лишайниках, как проявление защитной реакции неблагоприятные условия среды

Цель работы: ознакомиться с функциями фенольных соединений в растениях; научиться определять сумму фенольных соединений в растениях и доказать, что их содержание в растениях зависит от степени удаленности от автомобильной дороги.

Теоретические сведения

Фенольные вещества представляют собой большую и разнообразную группу ароматических соединений, чрезвычайно распространенную в растительном мире. На их долю приходится до 2 – 3% массы органического вещества, а в некоторых случаях – до 10% и более. В отдельных органах растений их количество резко возрастает: в сине-фиолетовых лепестках анютиных глазок их 33%, а у садовых форм василька – 24%. К группе фенольных веществ относятся флавоноиды (физиологически активные вещества многих плодов, ягод, овощей и дикорастущих растений). Они делятся на катехины (основные активные вещества чая), лейкоантоцианы (бесцветные вещества, часто предшественники флавоноидных пигментов), флавоны и флавонолы (желтые красящие вещества многих цветков), а также антоцианы (синие, красные, фиолетовые пигменты). К полимерным фенольным соединениям относятся ду-

бильные вещества (их много в коре дуба, ивы), лигнин (древесина), меланины (черная окраска цветков и их частей, а также поверхностных покровов насекомых). Халконы и ауроны также придают цветкам желтый цвет или оттенок слоновой кости.

Одним из возможных путей образования фенольных веществ является их биосинтез из углеводов, образующихся в процессе фотосинтеза.

В растениях фенольные вещества несут защитную функцию. Они накапливаются в органах растений при неблагоприятных условиях среды. Примером этого может служить накопление антоциана и покраснение побегов, почек и молодых листочков у древесных растений на Севере и в высокогорьях (особенно в период весенних заморозков), а также накопление других групп фенольных соединений у древесных растений осенью и зимой. Фенольные соединения играют большую роль в иммунитете растений к различным заболеваниям и повреждению насекомыми. Нередко защитные фенолы у здоровых растений отсутствуют и образуются только как ответная реакция на поражение возбудителем (фитоалексины). Фенольные соединения играют важную роль при заживлении механических повреждений, в защите клеток от проникающей радиации, при появлении свободных мутагенов, окислителей. Так, в хвое ели повышение содержания фенольных веществ под влиянием сернистого газа наблюдается за месяц до повреждения хвои, то есть является как бы предвестником видимых хлорозов и некрозов.

Флавоноидные пигменты, обуславливающие естественную окраску цветов, плодов, ягод, листьев, коры, кроющих чешуи почек, обеспечивают привлечение животных-опылителей. Эта группа веществ выделяется в естественную среду из отмерших остатков растений и имеет большое значение в аллелопатии.

Многие защитные фенолы, пройдя генетический отбор, стали неотъемлемым свойством растения (например, преобладание красношишечных форм хвойных в условиях севера и горных систем), в других случаях они появляются в ответ на неблагоприятные условия из своих предшественников – лей-

коантоцианов (бесцветных пигментов), которые постоянно содержатся в листьях, коре растений. Так, при недостатке азота листья картофеля начинают продуцировать антоцианы.

Накопление фенольных веществ под влиянием неблагоприятных и стрессовых условий среды обеспечивает устойчивость вида. Эти вещества выполняют роль защитных барьеров на пути механических, химических, термических факторов среды, а также болезнетворных воздействий. Обычно древесная кора, оболочки семян, плодов, ягод, клубней и другие покровные ткани содержат повышенное количество фенольных соединений (дубильные вещества, флавоноиды, фенолокислоты) и образуют защитный покров, предохраняющий делящиеся клетки (меристемы апикальных частей, камбия) и семена (будущие зародыши жизни) от всякого рода повреждений, препятствуют их проникновению в глубь тканей.

Фенольные гликозиды клеток мхов, лишайников предотвращают их гниение, а после отмирания способствуют образованию торфа. Фенольные лишайниковые кислоты угнетают размножение многих бактерий и плесеней, поэтому многие лишайники практически стерильны и применялись в северных госпиталях в период Великой Отечественной войны как прокладочный материал при перевязке ран.

Многие фенольные вещества выполняют фитонцидную роль. Катехины, антоцианы, фенолокислоты и дубильные вещества относятся к антибиотикам растительного происхождения. Фитонцидный (антибиотический) эффект проявляют и простые фенолы (пирокатехин, гидрохинон, пирогаллол и их окисленные хинонные формы). Так, галлаты (метилловые и этиловые эфиры галловой кислоты), выделенные из плодов клена, угнетают рост туберкулезной палочки, ряда плесеней и грибов, некоторых бактерий, патогенных для растений, обладают противовирусным действием. Всем хорошо известно антибиотическое действие фенольных соединений чая, некоторых окрашенных ягод, полыни, календулы и др.

Таким образом, основная функция фенольных веществ – защитная, они

накапливаются в органах растений в неблагоприятных и стрессовых условиях среды и могут служить хорошим биоиндикационным признаком. Ввиду большого разнообразия строения и физико-химических свойств их анализы очень длительны, многоступенчаты. Однако для сравнительного определения содержания фенольных веществ в растительном сырье существуют более простые методы определения суммы фенольных соединений, которые являются лишь приблизительными, полуколичественными. Тем не менее они нашли широкое применение в производственных условиях.

В настоящей практической работе предлагается метод определения суммы фенольных соединений по Левенталю в модификации А.Л. Курсанова (1937), неоднократно апробированный другими исследователями фенольных веществ.

Оборудование, реактивы, материалы:

1) ступки с пестиками; 2) весы торсионные; 3) стаканчики на 100 мл; 4) водяная баня; 5) чашки испарительные на 800 – 1000 мл или стаканы такого же объема; 6) бюретки; 7) колбы на 50 мл; 8) раствор индигокармина (1 г индигокармина растворяют в 50 мл концентрированной серной кислоты и доводят водой до 1 л); 9) 0,1 н раствор KMnO_4 (3,16 г KMnO_4 в 1 л воды); 10) дистиллированная вода; 11) перемолотый растительный материал (листья ильма, клена, березы, тополя), собранный в разных экологических условиях.

Ход работы.

Соберите небольшое количество листьев с деревьев, находящихся на различном расстоянии от автомагистрали. ***Внимание! Сравнить можно только данные, полученные при анализе проб растений одного вида.*** Каждую пробу поместите в отдельный полиэтиленовый пакет и снабдите этикеткой, на которой должно быть указано место сбора, дата и видовое название растения.

Навеску в 1 – 3 г сухого перемолотого или 4 – 10 г свежего растертого в ступке с битым стеклом растительного материала нагревают в стаканчике на 100 мл с 40 мл дистиллированной воды в течение 15 минут на кипящей водя-

ной бане при интенсивном перемешивании. Экстракт охлаждают, фильтруют и доводят до метки в колбе на 50 мл.

Часть полученного экстракта (10 мл) переносят в фарфоровую чашку или стакан объемом 800 – 1000 мл, добавляют 750 мл дистиллированной воды и 25 мл раствора индигокармина. Смесь титруют 0,1 н раствором KMnO_4 при энергичном перемешивании. Окончание титрования устанавливают по появлению в растворе золотисто-желтого оттенка. Результат титрования умножают на пересчетный коэффициент для перевода миллилитров 0,1 н KMnO_4 в миллиграммы фенольных соединений, содержащихся в 10 мл взятого на титрование экстракта.

Для большей точности параллельно проводят контрольное титрование, в котором 10 мл экстракта заменяют 10 мл дистиллированной воды и полученное значение вычитают из основного определения.

В обычной лабораторной практике чаще всего пользуются пересчетным коэффициентом 4,16 (определен для китайского таннина), однако, для анализа чайного листа в нашей стране применяется коэффициент 5,82, а в Индии – 4,62.

Контрольные вопросы:

1. Какие химические соединения относятся к группе фенольных веществ?
2. Какую функцию выполняют фенольные соединения в растениях?
3. Почему по уровню содержания фенолов в растениях можно судить о состоянии окружающей среды?
4. Сравните содержание фенольных соединений в растениях из разных экологических условий и сделайте выводы по работе.

Список литературы:

1. Артамонов, В.И. Растения и чистота природной среды. – М.: Наука 1980. – 173 с.
2. Барабой, В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. – М.: Наука, 1984. – 160 с.

3. Лебедева, Т.С. Пигменты растительного мира / Т.С. Лебедева, К.М. Сытник. – Киев, Наукова думка, 1986. – 85 с.

4. Уфимцева М.Д. Фитоиндикация экологического состояния урбогеосистем Санкт – Петербурга / М.Д. Уфимцева, Н.В. Терехина. – СПб.: Наука, 2005. – 339 с.

Лабораторная работа 5

Влияние солей тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки и коагуляцию растительных и животных белков

Цель работы: выявить действия биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки и коагуляцию животных и растительных белков.

Теоретические сведения

Соли тяжелых металлов в водной среде распадаются на ионы. Все ионы металлов могут быть разделены на две группы: биогенные (Si, Zn, Co, Mn, Fe и др.) и небιοгенные (Pb, Hg, Sn, Ni, Al, Cd, Sr, Cs и др.). Среди последней группы ионы стронция и цезия действуют как биогенные при замене в органических веществах кальция на стронций и калия на цезий. Биогенные ионы входят в состав ферментных систем, которые обеспечивают регуляцию всех процессов в клетке и организме. Поэтому их ПДК значительно выше, чем у небιοгенных. При поступлении в растения воздушным (через устьица) или капельным (роса, туман, слабые осадки) путями определенная доза биогенных тяжелых металлов включается в состав ферментных систем, что стимулирует метаболические процессы. Так, медь входит в состав ферментов, участвующих в процессах темновых реакций фотосинтеза, способствует поглощению других элементов; цинк входит в состав ферментов, расщепляющих белки, увеличивает устойчивость растений к жаре, засухе, болезням. Лишь при более высоких концентрациях они действуют как токсиканты. На рисунке 5 показано биологическое действие биогенной (Cu) и небιοгенной (Cd) солей на живые тест-системы. В малых концентрациях Cu оказывает отрица-

тельное влияние (недостаток микроэлементов). С повышением концентрации появляется стимулирующий эффект, который усиливается, достигая своего оптимума, а затем снижается и, переходя точку ПДК (стрелка), оказывает отрицательное действие. Cd ведет себя иначе. В очень малых концентрациях он оказывает нейтральный эффект, затем его токсическое действие усиливается, достигая точки ПДК (пунктирная стрелка), наступает перелом с усилением токсического эффекта.

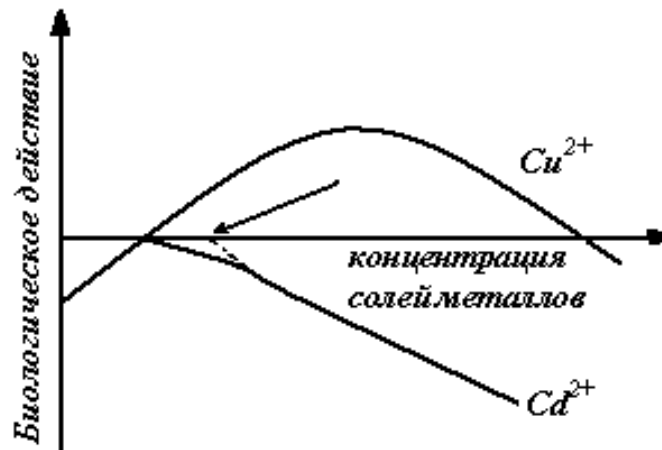


Рис. 1. Схема биологического действия ионов меди (Cu^{2+}) и кадмия (Cd^{2+}) (по Скурлатову с соавт., 1994).

Оборудование, реактивы, материалы:

1) микроскоп; 2) предметные и покровные стекла; 3) препаровальная игла; 4) бритвы; 5) пипетка на 1 – 3 мм; 6) стаканы с дистиллированной водой; 7) кусочки фильтровальной бумаги; 8) 5%-ые растворы солей CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, HgNO_3 и др.; 9) луковица синего лука или фиолетовые листья традесканции; 10) пробирки – 16 шт.; 11) пузырьки из-под пенициллина – 8 шт.; 12) стаканчик – 1 шт.; 13) пипетка на 1 мл – 1 шт.; 14) пипетка аптечная – 2 шт.; 15) стеклограф; 16) животный белок (куриного яйца); 17) растительный белок (зернового гороха).

Приготовление растворов белков.

А. У куриного яйца отделить белок в мерный стаканчик, размешать его стеклянной палочкой в дистиллированной воде в соотношении 1:10. Затем профильтровать.

Б. Зерновой вызревший горох перемолоть в муку в кофемолке, развести в соотношении: 10 г гороховой муки на 50 мл 10%-го раствора на NaCl или KCl. Профильтровать.

Ход работы.

1. Выявить действия биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки.

С поверхности сильноокрашенной синей луковицы сделать несколько срезов эпидермиса, состоящего из 1 – 2 слоев окрашенных клеток, содержащих антоциан. Поместить срезы по отдельности в капли воды на предметные стекла, закрыть покровными стеклами и рассмотреть в микроскоп. Клетки с окрашенным клеточным соком зарисовать; найти и рассмотреть устьица.

А. Определить начало и характер плазмолиза клетки под действием одинаковых концентраций биогенных и небιοгенных солей. Для этого заменить воду в препаратах 5%-ым раствором CuSO_4 на одном предметном стекле и таким же раствором $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ на другом. Эта замена производится способом 4 – 5-кратного накалывания раствора соли с одной стороны покровного стекла и отсасывания кусочком фильтровальной бумаги с другой до полной замены воды раствором соли. Оставить клетки в растворе солей на 15 мин, когда плазмолиз будет хорошо заметен, рассмотреть в микроскоп. Зарисовать и сделать выводы относительно действия солей биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на характер плазмолиза клетки.

Б. Выявить комплексное действие повышенной температуры и одной из наиболее токсичных солей. Для этого препараты, в которых вода заменена на раствор соли, выдерживают 10 мин на водяной бане при температуре 40°C , а потом рассматривают в микроскоп и зарисовывают. При этом часто наблюдается усиление плазмолиза и почернение содержимого некоторых клеток. Очевидно, соли свинца при реакции с сероводородными группами белков дают этот черный цвет.

2. Выявить действия биогенных и небιοгенных тяжелых металлов на

коагуляцию животных и растительных белков.

Приготовить в пузырьках от пенициллина серию растворов сульфата меди CuSO_4 и нитрата свинца $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ из исходного 5%-го раствора (2,5%-й; 1,25%-й; 0,62%-й). В 8 пробирок пипеткой внести по 1 мл животного белка, а в другие 8 – по 1 мл растительного белка (для обеих солей всего 8 растворов). В каждую пробирку добавить по 2 капли одного из указанных растворов испытуемой соли. Все пробирки пометить стеклогграфом. Рассмотреть характер коагуляции на темном фоне (кусочек черной бумаги, доска и др.).

Схема записи результатов

Название соли	Концентрация растворов, %			
	5	2,5	1,25	0,62

Определить концентрацию раствора соли, при которой происходит коагуляция белка (при разном виде солей и при разном типе белков).

Контрольные вопросы:

1. Какие металлы относятся к биогенным, а какие к небιοгенным?
2. Какую роль выполняют биогенные металлы в живых организмах?
3. Чем отличается характер плазмолиза растительной клетки под действием на нее биогенных и небιοгенных металлов?
4. Как изменяется характер плазмолиза при увеличении температуры?
5. На какой из видов белков (животный или растительный) сильнее всего действует а) CuSO_4 и б) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$?
6. Какая соль (свинца или меди) сильнее действует а) на животный белок, б) на растительный белок. Почему?

Список литературы:

Скурлатов, Ю.И. Введение в экологическую химию / Скурлатов Ю.И., Г.Г. Дука, А. Мизити. – М.: Высш. шк., 1994. – 399 с.

Федорова, А.И. Практикум по экологии и охране окружающей среды / А.И. Федорова, А.Н. Никольская. – М.: Владос, 2001. – 287 с.

Лабораторная работа 6

Определение свинца и кадмия в растениях

Цель работы: ознакомиться с возможным негативным влиянием тяжелых металлов на здоровье человека; доказать, что содержание свинца в растениях зависит от удаленности их от автомобильной дороги.

Теоретические сведения

Органические и неорганические соединения тяжелых металлов (ТМ) и мышьяка используются во многих отраслях промышленности в качестве сырья или побочных продуктов, применяются в сельском хозяйстве как гербициды и инсектициды. Мышьяк и некоторые тяжелые металлы входят в состав различных лекарственных средств.

В данную группу входит более 40 элементов с высоким атомным весом, относительной плотностью более 5,0, например, ртуть, медь, кадмий, золото, свинец, мышьяк и др.

Соединения ТМ могут поступать в живой организм пероральным, ингаляционным путём, а также через кожу и слизистые оболочки, через корневую систему в растения. Считается, что из ядов, регулярно попадающих в организм человека, около 70% поступает с пищей, 20% - из воздуха и 10% - с водой.

Циркуляция в живых организмах происходит благодаря тому, что соли ТМ находятся в ионизированном виде, чему способствует кислая реакция желудка животных, а также наличие воды в почве.

ТМ распределяются и депонируются (накапливаются) практически во всех органах как животных, так и растений. Возрастание токсичности происходит с увеличением атомного веса металла, зависит от способности к диссоциации их комплексов с белками, от растворимости соединений в воде и липоидах.

В живых организмах ТМ играют двоякую роль. В малых количествах они входят в состав биологически активных веществ, регулирующих нормальный ход процессов жизнедеятельности. Нарушение в результате техногенного загрязнения сложившихся эволюционно концентраций ТМ приводит к отрицательным и даже катастрофическим последствиям для живых организмов. Поступившие в организм человека ТМ накапливаются первоначально в почках, затем в печени и выводятся крайне медленно.

В России осуществляется контроль за содержанием в пищевых продуктах 14 химических элементов, наиболее опасными и токсичными считаются свинец, кадмий и ртуть.

Свинец (Pb) и большинство его соединений относятся к первому классу опасности. Свинцовые интоксикации занимают первое место среди профессиональных заболеваний, составляя в них 11,6%. Основным источником промышленного загрязнения свинцом служит металлургия (87%). В еще больших, чем промышленность масштабах загрязняет окружающую среду транспорт, использующий этилированный бензин, который содержит тетраэтилсвинец. Наибольшие концентрации свинца обнаружены в воздухе и зеленой массе растений вдоль крупных автострад. В атмосфере крупных городов его содержание достигает $5 - 36 \text{ мкг/м}^3$, что превышает естественный фон в 10^4 раз. Сильно загрязнены также почвы городов, где в 80% случаев наблюдают превышение ПДК свинца. В организм человека свинцовая пыль проникает через органы дыхания и с пищей примерно в равных количествах. Под действием свинца нарушается синтез гемоглобина, возникают заболевания дыхательных путей, мочеполовых органов, нервной системы, сужаются сосуды, происходит его накопление в костях. ПДК свинца является его содержание в крови в пределах $(0,2 - 0,8) \cdot 10^{-4}\%$. При воздействии свинца на растения отмирают листья, тормозится прорастание семян, угнетается корневая система, снижается фотосинтез и урожайность. Для уменьшения выбросов свинца предлагают прекращение производства и использования этилированного бензина, свинецсодержащих красок и покрытий жестяных банок,

свинцовой дроби (с заменой на стальную), переработку и утилизацию свинецсодержащих аккумуляторов, пылей с получением товарного металла.

Кадмий (Cd) – спутник цинка, относится ко второму классу опасности. Среднесуточное ПДК оксида кадмия в пересчете на кадмий составляет $1\text{ мг}/1000\text{ м}^3$. Период полувыведения кадмия – 10 лет.

Он поступает в атмосферу при добыче и переработке цинка, из гальванических и красильных цехов, при сжигании пластмассовых отходов и мусора, при работе автотранспорта. Соединения кадмия весьма ядовиты, действуют на органы дыхания, желудочно-кишечный тракт, поражают сердце, почки, печень, костную и мышечную ткани. Известны случаи хронического массового отравления кадмием (болезнь «Итай-Итай»). Она развивалась у людей, употреблявших в пищу рис, загрязненный кадмием, поступавшим с водами из ирригационных систем (Япония). Установлена тесная корреляционная связь между количеством обнаруженных в воде и почве кадмия, свинца и мышьяка и уровнем заболеваемости злокачественными новообразованиями различных форм среди населения экологически неблагополучных районов.

Объекты и оборудование: листья деревьев, кустарников, травянистых растений, находящиеся на расстоянии от автомагистрали в 2 – 3, 100, 300 и 800 м, полиэтиленовые пакеты, тигли, раствор бихромата калия (K_2CrO_4), раствор сернистого натрия (Na_2SO_3), спирт, тигли, муфельная печь, эксикатор, дистиллированная вода, пробирки, керамические ступки, технические весы.

Ход работы

Соберите небольшое количество растительности: листья деревьев, кустарников, травянистых растений, находящихся на расстоянии от автомагистрали в 2 – 3; 100; 300 и 800 м. **Внимание! Сравнивать можно только данные анализа проб растений одного вида.** Каждую пробу поместите в отдельный полиэтиленовый пакет и снабдите этикеткой, на которой должно быть указано место сбора, дата и видовое название растения.

Свинец в растениях можно определить двумя методами.

Метод озоления. Пробы сухих растений одного вида взвешивают на технических весах (по 1 – 2 г), помещают в пронумерованные предварительно прокаленные и взвешенные тигли. Тигли с навеской прокаливают на плитке до прекращения выделения дыма и ставят на озоление в муфельную печь. После озоления взвешивают тигль с золой и рассчитывают ее количество, затем к золе добавляют 50 мл дистиллированной воды. К водному раствору золы добавляют избыток раствора бихромата калия. Образовавшийся осадок отфильтровывают на взвешенный фильтр и высушивают. Рассчитывают процентное соотношение содержания образующихся осадков к массе золы. На основании полученных результатов делают вывод о содержании свинца в листьях растений, находящихся в разных условиях загрязнений.

Метод извлечения свинца при помощи раствора спирта. С каждой пробы растений возьмите одинаковые навески и разотрите в керамических ступках. Во все навески добавьте по 50 мл спиртового раствора и прокипятите на плитке, для того, чтобы свинец перешел в раствор, охладите его и отфильтруйте. Добавьте в пробы с растительным экстрактом по 1 – 2 капли раствора сернистого натрия. В результате выпадет черный осадок разной степени концентрации, соответственно более или менее темный у разных проб растительности.

Определение содержания кадмия в растениях

Кроме свинца в растениях, произрастающих около дорог, можно определить кадмий аналогично определению свинца (методом озоления). Для обнаружения кадмия в водный раствор золы добавляют избыток концентрированного раствора щелочи (NaOH), при этом выпадает белый студенистый осадок. Пробы сравните по количеству осадка.

Контрольные вопросы:

1. Какое значение имеют ТМ для живых организмов?
2. Назовите основные источники свинцового и кадмиевого загрязнения.

3. Какое влияние на здоровье человека оказывает избыточное поступление в организм свинца и кадмия?
4. Сделайте выводы по результатам исследований.

Список литературы:

1. Агрэкология /под ред. В.А.Черникова, А.И. Черкеса. – М.: Колос, 2000. – 536 с.
2. Лотош, В.Е. Экология природопользования. – Екатеринбург: 2001. - Полиграфист, 2001. – 540 с.
3. Протасов, В.Ф. Экология, здоровье и охрана окружающей среды в России. М.:, Финансы и статистика, 2000. – 672 с.
4. Харина, С.Г., Димиденок Ж.М. Тяжелые металлы в агроэкосистемах Среднего Приамурья: монография/ С.Г. Харина, Ж.М. Димиденок. – Благовещенск: ДальГАУ, 2009. – 154 с.

Лабораторная работа 7

Определение ртути в мясе, мясных и молочных продуктах методом визуального колориметрирования

Цель работы: научиться определять ионы ртути в продуктах питания белкового происхождения.

Теоретические сведения

Ртуть (Hydrargyrum) – единственный в природе жидкий металл (а.в. 200,61), который испаряется даже при комнатной температуре, поэтому действие его всеобъемлюще. Оно захватывает и почву, и воздух, и воду.

Соединения ртути обладают неодинаковой степенью токсичности. Она определяется двумя факторами: растворимостью и степенью диссоциации. Из растворимых соединений наибольшей токсичностью обладает двуххлористая ртуть HgCl_2 – сулема – белый кристаллический порошок, цианистая ртуть $\text{Hg}(\text{CN})_2$ менее токсична, чем сулема, вследствие меньшей степени

диссоциации.

Значительный интерес вызывают протравители семенного материала. Выпускаются в большом ассортименте. Вследствие небрежного обращения и неправильного хранения встречаются случаи отравления животных и птиц.

Установлено, что ртуть является сильнейшим ядом, так как она обладает весьма активным сродством к белку. Общее влияние ртутных препаратов на теплокровных проявляется в изменении обмена веществ, резком уменьшении количества эритроцитов в крови. Особенно поражаются печень, почки и железы, то есть органы, через которые ртуть выводится из организма, при этом большей частью накапливаясь в них. В зависимости от степени отравления наблюдаются также паралитические явления со стороны центральной нервной системы и сердца. При хроническом отравлении ртуть обнаруживается во всех органах, даже костях.

ПДК содержания ртути в некоторых продуктах питания (мг/ кг)

Зернобобовые – 0,02	Масло растительное – 0,03
Крупы – 0,03	Овощи – 0,02
Молоко – 0,005	Грибы свежие – 0,05
Масло сливочное – 0,03	Птица и мясо – 0,03

Реактивы: ацетон, 20%-й раствор хлористого бария, вода дистиллированная, 3%-й раствор йодистого калия, раствор йода в калий йоде 2,5 г/л и 3,5 г/л, 1%-й раствор калия надсерноокислого, 10%-й и 20%-й растворы меди серноокислой, 20%-й раствор мочевины, натрий серноокислый 10%-й и насыщенный, натрий сернистоокислый 1,25М, ртуть двуххлористая, кислота азотная, кислота серная, спирт этиловый.

Оборудование: аппарат для встряхивания колб, весы аналитические ВЛР-200, весы технические ВЖТ-500, воронки стеклянные диаметром 30, 40, 50, 100 мм, колбы конические 500, 100 мл, колбы мерные 1000, 500, 250, 100 мл, палочки стеклянные, пипетки различные, пробирки мерные для ко-

лориметрирования из бесцветного стекла с узким носиком, стаканы химические, цилиндры мерные на 25, 100, 500 и 1000 мл, баня водяная, бумага фильтровальная.

Подготовка к испытаниям

1. Приготовление взвеси йодида меди.

Для получения 100 мл взвеси 21 г йодистого калия растворяют в 200 мл воды, смешивают с 80 мл раствора меди сернокислой 20%-ой, в стеклянной посуде емкостью не менее 0,5 л и оставляют до полного осаждения осадка (30 – 50 мин). С образовавшегося осадка жидкость декантируют. Осадок несколько раз промывают водой (по 200 – 300 мл), до светло-желтого цвета надосадочной жидкости. (При появлении розового оттенка осадок отбеливают, для этого в сосуд со взвесью добавляют сначала 1 – 2 мл раствора сульфита натрия с концентрацией 1,25М, а затем насыщенный раствор сульфата натрия от 1 – 2 мл для коагуляции осадка. Если взвесь отбеливается недостаточно, повторяют добавки). Надосадочную жидкость сливают, а осадок переносят на двойной фильтр, плотно уложенный в воронку диаметром 250 мм, и промывают водой на фильтре до почти отрицательной реакции на ион SO_4 (проба с хлористым барием не должна давать осадка). После этого фильтр прокалывают стеклянной палочкой, осадок смывают водой в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки.

2. Приготовление стандартного раствора ртути.

А) приготовление основного раствора ртути: 0,135 г ртути двуххлористой помещают в мерную колбу на 1 л и доводят до метки (при постоянном помешивании) раствором йода в йодистом калии (2,5 г/л йода в 30 г/л калия йодистого). Раствор хранят один месяц. Основной раствор содержит 100 мкг/мл ртути;

Б) приготовление рабочего раствора ртути: непосредственно перед определением 1 мл основного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки раствором йода в йодистом калии. Рабочий раствор содержит 10 мкг/мл ртути.

3. Приготовление составного окрашивающего раствора (готовится перед анализом).

Смешать в соотношении 1:5 раствор сернокислой меди 10%-ый и раствор натрия сернистоокислого Na_2SO_4 концентрацией 1,25М. Смесь перемешать до исчезновения окраски и использовать немедленно. При появлении мути пользоваться раствором нельзя!

Деструкция пробы

1. Подготовка пробы к деструкции.

Навеску пробы 200 – 350 г тщательно измельчают и перемешивают. Из этой пробы берут аналитическую навеску в зависимости от вида продукта (таблица 1).

2. Деструкция пробы.

Аналитическую навеску продукта помещают в термостойкую колбу на 750 мл (500 мл). Пробу равномерно распределяют по дну колбы и добавляют реагенты в количестве, указанном в таблице 1. Последовательно вносят этиловый спирт, воду и азотную кислоту. Колбу закрывают воронкой диаметром 25 мм, содержимое перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 20 – 30 минут или оставляют на ночь (зерно).

Серную кислоту 50 мл наливают в стакан и осторожно по каплям добавляют в колбу с пробой через воронку. Скорость внесения серной кислоты должна постоянно поддерживать реакцию разложения белка, но чтобы не происходило бурного выделения окислов азота, так как это ведет к потере ртути. При бурном течении реакции в колбу добавляют порциями по 5 – 10 мл кипящей воды так, чтобы общее количество её было не более 30 – 50 мл, или снимают с водяной бани. Деструкцию проводят до полного посветления придонного слоя жидкости, но не менее 45 мин.

Колбу снимают с бани и горячий деструктат фильтруют в колбу 0,5 л, в которую предварительно наливают 20 мл раствора мочевины (или 2,5Н раствора сульфита натрия) через увлажненный водой двойной бумажный фильтр, уложенный в воронку (100 – 150 мм). Колбу из-под деструктата и фильтр несколько раз промывают кипящей водой. Общий объем деструктата и промывных вод доводят до 300 мл.

Деструкция открытым способом.

Операция и вид продукта	Навеска (г)	Предварительная обработка перед деструкцией	Добавление C_2H_5OH (мл)	Добавление H_2O (мл)	Добавление HNO_3 (мл)	Выдержать при $t+20^\circ$ (мин)	Добавить H_2SO_4 (мл)	Выдержать при $t+20^\circ$	Температура и выдержка на водяной бане	Примечания
Контроль на реактивы	-	-	1,0	15,0	15,0 по 2 – 3мл	20	20 по капле	до прекращения выделения.	100 – 45 мин	Количество реактивов как и в анализе продукта
Мясо и мясосопродукты	40	-	1,0	то же	20	то же	то же	то же	то же	При наличии жира более 30% перед деструкцией внести в колбу 10М калия надсернистого 25-30мл
Молоко и молочные продукты	40	-	1,0	-	5,0 по 0,5	30	7 капель	то же	70 – 15 мин	-
Сливки, сметана, творог, масло, сыр	40	10 мл калия надсернистого при перемешивании масло $40^\circ C$	1,0	-	15,0	20	15	то же	70 – 15 мин	При сильном пенообразовании колбу снять с бани на 3 – 5 мин.

Проведение анализа

1. Выделение ртути из деструктата.

В колбу с охлажденным деструктатом добавляют 15 мл взвеси иодида меди. Перемешивают три раза с интервалом 5 мин и оставляют до полного выпадения осадка. Если образовавшийся осадок имеет ярко-розовый или кирпично-красный цвет, что свидетельствует о содержании ртути в образце более 25 мкг, анализ повторяют, уменьшив навеску образца и соответственно уменьшив количество реактивов для деструкции.

Через 1 час максимально возможную часть надосадочной жидкости сливают, стараясь не взмутить осадок, и отбрасывают. К осадку добавляют 15 мл раствора натрия сернокислового 10%-го, взбалтывают и переносят на увлажненный водой однослойный бумажный фильтр «синяя лента», плотно уложенный в воронку (35 мм). Края фильтра должны выступать из воронки не более 5 мм. Колбу из-под осадка ополаскивают несколько раз раствором натрия сернокислового 10% и сливают на тот же фильтр. Когда вся жидкость отфильтруется, осадок на фильтре промывают смесью ацетона с раствором натрия сернокислового 10%-го в соотношении 1:1, смеси берется около 50 мл, а затем раствором натрия сернокислового 10%-го. Отмывание осадка проводят до исчезновения желтой окраски промывных вод и до pH не менее 5 (по универсальной индикаторной бумаге).

Промывные воды отбрасывают. Полоской фильтровальной бумаги удаляют остаток жидкости из узкой части воронки и осадок подсушивают на фильтре в течение 5 мин. Затем его обрабатывают на фильтре раствором йода в калий йоде (3,5 г/л J в 30г/л KJ). В зависимости от цвета осадка количество раствора йода меняется (см. табл. 2). Раствор йода, отмеренный в мерный цилиндр, наносят небольшими порциями по краю фильтра. Полученный фильтрат доводят в пробирке до выбранного объема.

2. Приготовление градуировочной шкалы.

В пробирки для колориметрирования вносят точные объемы стандартного (рабочего) раствора ртути и раствора J в KJ (2,5 г/л J в 30 г/л KJ) в коли-

честве, указанном в таблице 3. Затем добавляют из бюретки по 3 мл составного раствора, закрывают пробками и тщательно перемешивают. Выдерживают в затемненном месте не менее 15 мин, до полного осаждения тетраидомеркурата меди.

Таблица 2

Ориентировочная схема проведения анализа осадков при калориметрическом методе определения ртути.

Цвет осадка	Примерное содержание ртути в образце, мкг	Объем 0,35% раствора йода для обработки осадка, мл	Объем раствора ртути для колориметрирования, мл
Белый	0 – 5	10	6 – 3
С розовым оттенком	5 – 15	15	3 – 1
Бледно-розовый	15 – 25	25	1
Ярко-розовый	более 25	повторить деструкцию	

Таблица 3

Схема подготовки шкалы

Количество рабочего раствора ртути, мл	Количество 0,25% раствора йода, мл	Содержание ртути, мкг
0	6,00	0
0,25	5,75	0,25
0,50	5,50	0,50
0,75	5,25	0,75
1,00	5,00	1,00
1,25	4,75	1,25
1,50	4,50	1,50
1,75	4,25	1,75
2,00	4,00	2,00
5,00	1,00	5,00

3. Визуально-колориметрическое определение ртути.

Аликвотный объем раствора анализируемой пробы в соответствии с таблицей 2 помещают в пробирки для колориметрирования. Доводят объем до 6 мл раствором J в KJ, затем прибавляют из бюретки по 3 мл составного раствора и далее поступают как с пробирками со стандартным раствором.

Колориметрическое определение ртути проводят путем визуального сравнения цвета осадка в пробирках с пробой с цветом осадка в пробирках градуировочной шкалы. Для этого пробирки располагают под углом 25 – 30 градусов таким образом, чтобы осадок оставался на дне пробирки, а надосадочная жидкость перемещалась к пробке.

4. Обработка результатов.

Массовую долю ртути (X) мг⁻¹ вычисляют по формуле

$$X = \frac{(M_2 - M_1) \times U}{U_1 \times M}$$

где: M_2 – масса ртути в аликвотном объеме, взятом для колориметрирования (мкг), определенное по градуировочной шкале;

M_1 – масса ртути в контрольном опыте, определенная по градуировочной шкале (мкг). Контрольный опыт проводят со всеми реактивами, но без навески пробы;

U – объем раствора йода, концентрации 3,5 г/л, использованный для растворения ртути (мл);

U_1 – аликвотный объем (мл);

M – масса образца, взятого для деструкции.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака, а при анализе молочных продуктов – до четвертого.

Контрольные вопросы:

1. Назовите источники поступления ртути в окружающую среду.
2. От чего зависит токсичность соединений ртути?
3. Какое влияние оказывает ртуть и ее соединения на организм человека?

Список литературы:

1. Витол, И.С. Экологические проблемы производства и потребления пищевых продуктов. – М.: Издат. Комплекс МГУПП, 2000. – 93 с.
2. Соколов, О.А. Атлас распределения тяжелых металлов в объектах окружающей среды. – Пушкино, ОНТИ ПНЦ РАН, 1999. – 194 с.
3. Харина, С.Г. Ртуть в окружающей среде. – Благовещенск: ДальГАУ, 2001. – 40 с.

Лабораторная работа 8***Метод определения общего железа в питьевой воде (Гост 4011 – 72)***

Цель работы: ознакомиться с биологической ролью железа в живых организмах, научиться определять железо в воде.

Теоретические сведения

Железо (Ferrum) – металл с атомной массой 55,85 а.е. Железо присутствует во всех клетках организма и играет ключевую роль в некоторых биохимических реакциях. Будучи важным компонентом гемоглобина и ряда ферментов, железо участвует в переносе кислорода. Для всех форм жизни существует проблема ассимиляции достаточного количества железа, необходимого для нормального существования. У людей недостаток его проявляется железодефицитными анемиями. У растений дефицит железа называют хлорозом, который выражается в желтизне растений. Но избыток солей, железа подавляет биохимические процессы в обмене веществ растений. А поскольку человек и теплокровные животные усваивают только некоторые формы органически связанного железа (гемовое железо), то соли железа для них являются токсичными.

Различные соединения железа могут проявлять токсичность в зависимости от дозы, растворимости, способности к комплексообразованию. Известно, что ЛД₁₀₀ для крыс при пероральном введении сульфата железа составляет 418 мг/кг. У детей состояние шока наблюдается через 1 – 2 часа по-

сле случайного приёма 0,5 г железа. Механизм токсичности такой же, как у всех ТМ. Абсорбция железа из мышечной ткани и органов дыхания происходит в соответствии с кинетикой растворимости. Значительно лучше абсорбируются простые и комплексные соли закисного железа (II). Следовательно, соли закисного железа являются более токсичными.

Клиническая картина перорального отравления солями железа характеризуется рвотой, отёчностью, гепатитом, параличом, судорогами. При хроническом отравлении солями железа возникают заболевания печени, почек, ЖКТ и нервной системы.

Наиболее вероятный путь отравления солями железа – употребление некачественной питьевой воды. Особенно это актуально для Амурской области, отдельные районы которой по низкому качеству питьевой воды приравнены к районам экологического бедствия.

Наиболее высокое содержание железа характерно для Благовещенского, Ивановского, Архаринского, Михайловского районов, где при практически повсеместном присутствии железа содержание его в питьевых водах колеблется от 1,5 до 100 мг/л при норме 1 мг/л.

ПДК по железу превышает в 81% водопунктов, из них наиболее высокие концентрации в селах Асташиха, Успеновка, Старая Райчиха и в г. Райчихинске (ПДК превышает в 10 – 20 раз).

Аномалии содержания железа, как и марганца, приурочены к долинам рек Буреи и Архары, что обуславливается структурно-тектоническими разломами. Формирующиеся здесь железо-марганцевые воды создают серьезные экологическую и техническую проблемы, приводя к урологическим и онкологическим заболеваниям.

Сущность метода: метод основан на взаимодействии в сильноокислой среде окисного железа и роданида с образованием окрашенного в красный цвет комплексного соединения роданового железа. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации железа. Чувствительность метода 0,05 мг/г железа.

Аппаратура: ФЭК; колбы мерные на 50, 100, 1 000 мл; пипетки мерные различные; микробюретки; пробирки; стеклянные палочки.

Реактивы: квасцы железоаммонийные, аммоний надсерноокислый /персульфат/, аммоний роданистый /роданид/ или калий роданистый, кислота соляная, перекись водорода, вода дистиллированная.

1. Подготовка к анализу.

1.1 Перекристаллизация железоаммонийных квасцов. 120 г железоаммонийных квасцов растворяют при нагревании в 100 мл воды, подкисленной серной кислотой и содержащей 1 мл перекиси водорода. После растворения квасцов раствор фильтруют и охлаждают при помешивании. Если выпадение кристаллов задерживается, то прибавляют «затравку» в виде кристаллика чистых квасцов. Кристаллы отфильтровывают и сушат между листами фильтровальной бумаги. Кристаллы должны иметь аметистовый цвет. Хранят их в банке с притертой крышкой.

1.2 Приготовление основного стандартного раствора железоаммонийных квасцов. 0,8836 г свежеперекристаллизованных железоаммонийных квасцов растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в небольшом количестве воды, добавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты и доводят до метки дистиллированной водой. *1 мл раствора содержит 0,01 мг железа.*

1.3 Приготовление рабочего стандартного раствора железоаммонийных квасцов. Рабочий раствор готовят в день проведения анализа, разбавлением основного раствора в 10 раз водой. *1 мл рабочего раствора содержит 0,01 мг железа.*

1.4 Приготовление раствора роданистого аммония или роданистого калия. 50 г роданида растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

1.5 Приготовление раствора соляной кислоты плотностью 1,12 г/мл. К 65 мл воды приливают 100 мл соляной кислоты плотностью 1,19 г/мл.

2. Проведение анализа.

2.1 Качественное определение с приближенной количественной оцен-

кой.

В пробирку наливают 10 мл исследуемой воды, вносят две капли концентрированной соляной кислоты и несколько кристаллов персульфата аммония и 0,2 мл роданида аммония или калия. После внесения каждого реактива содержимое пробирки перемешивают.

Приблизительно массовую концентрацию железа определяют в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4

Ориентировочная шкала оценки концентрации железа

Окрашивание при рассмотрении сбоку	Окрашивание при рассмотрении сверху вниз	Массовая концентрация железа, мг/л
Окрашивания нет	Окрашивания нет	Менее 0,05
Едва заметное желто-розовое	Чрезвычайно слабое желтовато-розовое	0,1
Очень слабое желтовато-розоватое	Светло желтовато-розоватое	0,5
Слабое желтовато-розоватое	Светло желтовато-розоватое	0,5
Светло-желтовато-розовое	Желтовато-розовое	1,0
Сильно желтовато-розовое	Желтовато-красное	2,0
Светло-желтовато-красное	Ярко-красное	Более 2,0

2.2. Количественное определение.

В мерную колбу вместимостью 50 мл отбирают 5 мл тщательно перемешанной исследуемой воды или меньшим объемом, содержащей по качественной пробе не более 1,0 мг/мл железа и доводят объем до метки дистиллированной водой. Затем добавляют 1 мл соляной кислоты (плотностью

1,12г/мл), несколько кристаллов персульфата аммония перемешивают и добавляют 1 мл роданида калия. После перемешивания сразу же измеряют оптическую плотность на ФЭК, применяя сине-зеленый светофильтр с длиной волны (490 – 500 нм) в кюветах с толщиной оптического слоя 2,3 или 5 см по отношению к дистиллированной воде, в которую добавлены те же реактивы.

Массовую концентрацию общего железа находят по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика в мерные колбы вместимостью 50 мл вносят 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл рабочего стандартного раствора железоаммонийных квасцов (в 1 мл 0,01 мг железа) и доводят дистиллированной водой до метки. Получают серию растворов с массовой концентрацией железа 0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мг/дм. К стандартным растворам и раствору сравнения прибавляют 1 мл соляной кислоты (плотностью 1,12 г/мл), несколько кристаллов персульфата аммония и перемешивают. Затем в раствор сравнения и стандартный раствор с массовой концентрацией железа 0,1 мг/дм прибавляют по 1 мл раствора роданида калия, содержимое перемешивают и сразу же измеряют оптическую плотность в тех же условиях, что и исследуемой воды. Затем добавляют роданид калия в следующий стандартный раствор и опять определяют оптическую плотность и т.д.

По полученным данным строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс массовую концентрацию железа в мг/дм, а по оси ординат – соответствующие значения оптической плотности.

3. Обработка результатов.

Массовую концентрацию общего железа (X) в мг/дм³ вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \times 50}{V},$$

где: C – концентрация железа, найденная по калибровочному графику, мг/дм³;

V – объем пробы, взятый для определения, мл.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 25%.

Контрольные вопросы:

1. В чем заключается биологическая роль железа в организме человека и растений?
2. Назовите источники поступления железа в организм человека.
3. В чем заключается опасность повышенного содержания железа в питьевой воде?
4. Какие соединения железа являются более токсичными?
5. В каких районах Амурской области отмечается повышенное содержание железа в питьевой воде?

Список литературы:

1. Тинсли, И. Поведение химических загрязнителей в окружающей среде. Перевод с английского. – М.: Мир, 1982, – 279 с.
2. Шустов, С.Б. Химические основы экологии/ С.Б. Шустов, Л.В. Шустова. – М.: Просвещение, 1995, - 106 с.
3. Трахтенберг, И.М. Тяжелые металлы во внешней среде/И.М. Трахтенберг, В.С. Колесникова, В.П. Луковенко. – М.: Наука и техника, 1994. – 285 с.
4. Мур, Дж. Тяжелые металлы в природных водах/ Дж. Мур, С. Рамамурти. – М.: Мир, 1987. – 286 с.

Лабораторная работа 9

Хроматографические методы исследования

Цель работы: ознакомиться с методикой хроматографии в тонком слое сорбента для определения микропримесей токсичных веществ в почве, воде, сельскохозяйственной продукции.

Теоретические сведения

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – один из наиболее широко используемых хроматографических методов – имеет огромное значение для быстрого качественного анализа смесей. Разделение проводят на плоской пластинке, покрытой тонким слоем сорбента – силикагелем или оксидом алюминия (рис.2а). Разделяемую смесь, растворенную в соответствующем растворителе, наносят в виде капель на пластинку (рис. 2б) и после испарения растворителя помещают пластинку в проявительную камеру (рис. 2в), в которую налито немного растворителя. Растворитель поднимается по слою сорбента под действием капиллярных сил. При этом различные соединения, находящиеся в смеси, поднимаются с разными скоростями в зависимости от их сродства к сорбенту. По достижении растворителем верхнего фронта сорбента соединения в идеальном случае должны полностью разделиться (рис. 2г).

ТСХ пластинки и сорбенты

Пластинки для ТСХ состоят из подложки, обычно стекла, а иногда пластмассы или толстой алюминиевой фольги, на которую нанесен тонкий слой сорбента толщиной примерно 0,25 мм (рис. 2а). Сорбентом обычно служит либо силикагель, либо оксид алюминия с размером частиц до 10 – 30 мкм, к которым добавлено связующее вещество (до 10% гипса или крахмала), обеспечивающее прочность слоя. Пластинки бывают двух основных типов: многократного использования и одноразовые.

Пластинки многократного использования изготавливают из толстого стекла, на которое при помощи специального оборудования наносят сорбент, а затем после использования пластинки счищают его для повторного покрытия.

Одноразовые пластинки поставляются различными изготовителями с готовым слоем сорбента, нанесенным на основу из тонкого стекла, пластмассовую пластинку или алюминиевую фольгу. Особенно удобны пластинки последних двух типов, так как большие листы легко разрезать ножницами на

Нанесение образца

Образец обычно наносят с помощью капилляра или микропипетки в виде 1 – 2 %-го раствора в летучем растворителе типа дихлорметана, эфира, ацетона. Место нанесения капель должно быть на расстоянии 1 см от внешнего края. Важно наносить капли достаточно далеко от нижнего края (рис.2б и 2в), чтобы они не погружались в проявляющий растворитель.

Перед нанесением образца заполните капилляр, погрузив его конец в раствор (капилляр заполняется раствором под действием капиллярных сил), затем слегка прикоснитесь заполненным кончиком к сорбенту, стараясь при этом не повредить его поверхности, чтобы не вызвать некоторые искажения капли при проявлении хроматограммы. Важно наносить как можно более маленькую каплю, не больше 1 см в диаметре. Перед проявлением хроматограммы дайте капле полностью высохнуть.

Проявление хроматограммы

(Все работы проводятся в вытяжном шкафу!)

Хроматограмму проявляют погружением нижнего края пластинки в растворитель в сосуде соответствующего размера (рис.2в). Большие пластинки проявляют в специальных камерах, а маленькие – в широкогорлых бутылках с завинчивающимися крышками.

Высота, на которую поднимается по пластинке "пятно" соединения, зависит от сродства нанесенного вещества к сорбенту и силы (полярности) растворителя. Полярные соединения (спирты, кетоны и т.д.) сорбируются сильно и поэтому плохо продвигаются при использовании слабых растворителей типа гексана, тогда как полярный углеводород типа нафталина хорошо подымается по пластинке. Силу растворителя легче всего регулировать, используя смеси сильного и слабого растворителей. Обычно начинают с 1 : 1 – смеси эфира (сильный растворитель) с гексаном (или 60/80 петролейным эфиром – слабый растворитель) и затем соответственно меняют соотношение. Очевидно, что, если чистый эфир не способен поднять "пятна" вверх по пластинке, необходимо перейти к сильному растворителю.

Камеру изнутри следует частично выложить фильтровальной бумагой, которая погружается в растворитель для создания атмосферы, насыщенной парами растворителя, и сводит к минимуму испарение с пластинки. При проявлении хроматограммы вначале наливают подвижную фазу (смесь растворителей) на дно хроматографической камеры, так чтобы пятно образца оказалось над поверхностью растворителя. Затем дают камере время для насыщения. Каждая подвижная фаза имеет свое время испарения до насыщения камеры. Затем опустите в хроматографическую камеру пластинку, стараясь расположить ее вертикально. На время прохождения растворителя от старта до финиша камера должна быть плотно закрыта. Нельзя открывать крышку камеры до полного подъема растворителя! Когда фронт растворителя подымится до верха пластинки, выньте ее из камеры и сразу же карандашом или иголкой отметьте положение фронта растворителя. Высушите пластинку в вытяжном шкафу.

Просмотр хроматограммы

Характеристикой соединения является величина R_f , которая показывает отношение расстояния от стартовой линии до его положения на пластинке после прохождения растворителя (d_B) к расстоянию от стартовой линии до верхнего фронта растворителя (d_S) (рис.2г).

$$R_f (B) = \frac{d_B}{d_S} .$$

Каждое вещество при данных условиях разделения (сорбент + подвижная фаза) имеет свою величину R_f .

Если соединения в образце окрашены, то после подъема растворителя их легко различить визуально, однако для бесцветных соединений требуется проявление пластинок. Часто применяют введение в слой сорбента неорганического флуоресцентного агента (0,5%). Имеются готовые пластинки "Силуфол – 254". При освещении такой пластины УФ – лампой (254 нм) сорбент начинает светиться бледно-зеленым или голубым светом, а органические соединения, которые гасят флуоресценцию, выделяются в виде темных пятен.

При работе с УФ – лампой необходимо защищать глаза!

Еще один распространенный метод состоит в использовании камеры (эксикатора с притертой крышкой), насыщенной парами йода. В камеру помещают несколько кристалликов йода. Если сухую пластинку поместить в такую камеру на несколько минут, пары йода растворяются в органических "пятнах", окрашивая их в коричневый цвет до тех пор, пока вся пластинка не потемнеет.

Можно проявлять хроматографические пластинки опрыскиванием из пульверизатора проявляющими реактивами. Например, хлорорганические вещества проявляются опрыскиванием пластинки 2%-ым раствором дифениламина в ацетоне. Вещество проявляется в виде синих пятен. Возможен следующий проявляющий реактив: в мерную колбу на 100 мл помещают 0,5 г азотнокислого серебра, 5 мл дистиллированной воды, 7 мл аммиака (25%-ый водный раствор) и доводят до метки ацетоном. Небольшой объем свежеприготовленного проявляющего реактива помещают в пробирку опрыскивателя и обрабатывают пластинку. Соединения проявляются в виде черных пятен.

Контрольные вопросы:

1. Где применяется тонкослойная хроматография?
2. Расскажите о приемах нанесения вещества на хроматографическую пластинку.
3. Какие сорбенты и растворители применяются в ТСХ?
4. Каким образом происходит идентификация веществ на хроматографической пластинке?

Список литературы:

1. Лабораторная техника органической химии. Под ред. Б. Кейла. – М.: Мир, 1966. – 751 с.
2. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. Под ред. Й.А. Клисенко. – М.: Колос, 1983. – 304 с.
3. Шарп, Дж., Госни И., Роули А. Практикум по органической химии/ Дж. Шарп, И. Госни, А. Роули. – М.: Мир, 1993. – 240 с.

Лабораторная работа 10

Определение остаточных количеств хлорорганических пестицидов (ГОСТ 23452-79)

Цель работы: ознакомиться с хлорорганическими пестицидами как загрязнителями окружающей среды. Научиться определять хлорорганические пестициды в молоке и молочных продуктах методом тонкослойной хроматографии.

Теоретические сведения

Человечество явно недооценивало опасность производства хлорорганической продукции. Она выпускалась в значительных количествах прежде всего в виде средств защиты растений. Кроме того, многие хлорорганические соединения (ХОС) получают в виде побочных веществ в различных производствах, использующих хлор и его производные (например, при отбеливании бумажной пульпы хлором на целлюлозно-бумажных комбинатах).

Почти все ХОС чрезвычайно опасны для теплокровных в силу того, что они

- высокотоксичные;
- обладают большой биологической активностью полифункционального характера;
- необычайно устойчивы в окружающей среде и живых организмах;
- способны к накапливанию в пищевых цепях;
- характеризуются большим временем удерживания;
- образуют стабильные и токсичные продукты распада или трансформации.

Так, например, наиболее широко распространенный в недавнем прошлом инсектицид ДДТ обнаружен сейчас на всех уровнях биосферы (даже в жировых тканях пингвинов в Антарктике). Его период полураспада несколь-

ко лет. LD_{50} этого инсектицида для мышей 200 мг/кг массы, ПДК в воде 0,1 мг/л. Производство и применение ДДТ в нашей стране запрещено с 1972 г, однако последствия его вредоносного действия будут еще очень долго проявляться.

Метод тонкослойной хроматографии основан на выделении хлорорганических пестицидов из молока и молочных продуктов, очистке экстрактов и определении их на стеклянных пластинках, покрытых слоем адсорбента или пластинках «Силуфол», разгонке хроматограммы в подвижном растворителе и проявлении хроматограммы азотнокислым серебром.

Минимальная концентрация остаточных количеств хлорорганических пестицидов, определяемая указанным методом, составляет 0,05 мг/кг ($мг/дм^3$) с абсолютной суммарной погрешностью 0,017 мг/кг (мг/л).

Оборудование: пластинки «Силуфол»; пульверизатор стеклянный; хроматографическая камера; микропипетки; лампа ртутно-кварцевая ПРК; баня с термopарой; часы; весы лабораторные; сушильный шкаф; роторный испаритель; эксикатор; термометр жидкостный (не ртутный) от 0 до 100° С; груша резиновая; колбы мерные на 100 мл; стаканы на 50 мл; цилиндры на 50, 100, 250, 1000 мл; воронки; пробирки мерные на 10 мл; колонки хроматографические; пипетки на 5 и 10 мл.

Реактивы: н-гексан, хлороформ, ацетон, калий щавелевокислый, натрий хлористый, насыщенный раствор безводного сульфата натрия в серной кислоте (100г в 1 л), силикагель АСК и КСК, эфир диэтиловый, калий хромовокислый, ст. растворы хлорорганических пестицидов, серебро азотнокислое, вода дистиллированная, аммиак водный, спирт этиловый, кислоты серная, азотная и соляная, натрий серноокислый, кальций серноокислый 2-водный.

1. Подготовка к анализу

1.1 Приготовление проявляющего реактива.

В стакан вместимостью 150 мл отвешивают 0,5 г азотнокислого се-

ребра, растворяют в 5 мл воды, приливают 7 мл водного раствора аммиака и доводят объем раствора ацетоном до 100 мл.

Готовят проявляющий реактив в день употребления.

На пластинку 90 на 120 мм расходуют 8 – 10 мл реактива.

1.2 Подготовка стандартных растворов пестицидов.

(ДДТ, ДДД, ДДЭ, и изомеров ГХЦГ и гептахлора)

Стандартный раствор пестицидов в гексане готовят следующей массовой концентрации: 0,2 мкг/мл ГХЦГ, 0,5 мкг/мл гептахлора, 0,4 мкг/мл ДДЭ, 0,5 мкг/мл ДДД и 0,5 мкг/мл ДДТ. Растворы хранят в сосуде с притертой пробкой при T 10 – 13 °С, не более 1 месяца со дня приготовления.

1.3. Приготовление насыщенного раствора хлористого натрия.

К 1 л воды добавляют хлористый натрий до тех пор, пока кристаллы хлористого натрия при комнатной температуре не перестанут растворяться. Хранить раствор в склянке с притертой крышкой при комнатной температуре.

1.4. Приготовление раствора щавелевокислого калия.

50 г щавелевокислого калия растворяют в 950 мл воды. Хранят в склянке с притертой крышкой при комнатной температуре.

2. Экстракция хлорорганических пестицидов

Молоко, кефир, простокваша и другие кисломолочные продукты.

25 мл продукта помещают в делительную воронку 250 – 300 мл. Приливают 5 мл водного раствора щавелевокислого калия и 5 мл насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают, приливают 100 мл ацетона и энергично встряхивают в течение 2 мин. Приливают 100 мл хлороформа и вновь встряхивают 2 мин, после чего воронку оставляют на 5 мин до полного разделения слоев. Нижнюю фазу выливают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 500 мл и испаряют на роторном испарителе досуха, а верхнюю фазу отбрасывают. Экстракт смывают со стенок колбы 30 мл

н-гексана.

3. Очистка экстрактов

Очистка на хроматографической колонке с силикагелем АСК.

Для подготовки колонки в нижнюю часть бюретки помещают стекловату, насыпают 70 мл силикагеля АСК, уплотняют его постукиванием и промывают 50 мл н-гексана. На подготовленную колонку наносят 30 мл экстракта. После того, как экстракт впитывается в сорбент, пестициды вымывают 110 мл смеси бензол-н-гексан (3:8) порциями по 25 – 30 мл.

Собирают экстракт в круглодонную колбу со шлифом 250 – 300 мл. После впитывания последней порции растворителя сорбент отжимают резиновой грушей.

Содержимое упаривают досуха на роторном испарителе (температура бани 40 – 50°C) и смывают со стенок колбы 5 мл н-гексана.

4. Проведение анализа

5 мл очищенного экстракта переносят в градуированную пробирку и выпаривают на водяной бане (50°C) до объема 0,2 мл. Этот объем с помощью микропипетки наносят на хроматографическую пластинку на расстоянии 15 мм от края в одну точку так, чтобы диаметр пятна не превышал 10 мм. Колбу ополаскивают 5 мл диэтилового эфира, который переносят в ту же градуированную пробирку, упаривают до 0,2 мл (35 – 40°C) и наносят в центр первого пятна. Справа и слева от места нанесения пробы на расстоянии 20 мм наносят стандартные растворы смеси пестицидов, содержащие 1,0 и 10,0 мкг препарата. Для этого стандартный раствор разбавляют в 10 – 100 раз.

Пластинку с нанесенными растворами помещают в камеру для хроматографирования, на дно которой за 30 мин до анализа наливают н-гексан. Край пластинки с нанесенными растворами может быть погружен в растворитель не более чем на 5 мм.

После того, как фронт растворителя поднимется на 100 мм, пластинку вынимают из камеры и оставляют на 2 – 3 мин высохнуть.

Пластинку опрыскивают из пульверизатора проявляющим реактивом, облучают 10 – 15 мин ультрафиолетом, держа пластинки на расстоянии 200 мм от ртутно-кварцевой лампы ПРК-4.

При наличии хлорорганических пестицидов на пластинке появляются пятна серо-черного цвета.

5. Обработка результатов.

Количественное определение пестицидов производят сравнением размера пятна пробы с размером пятна стандартного раствора.

Сравнение размеров пятен производят измерением их площадей.

Массовую долю (X) в мг/кг, массовую концентрацию (X_1) в мг/л пестицидов в пробе вычисляют по формулам

$$X = \frac{A}{m} \quad \text{или} \quad X = \frac{A_1 \times S_2}{m \times S_1};$$

$$X = \frac{A}{V} \quad \text{или} \quad X = \frac{A_1 \times S_2}{V \times S_1},$$

где: A – масса пестицидов, определенная визуальным сравнением со стандартным раствором, мкг;

A_1 – масса пестицидов в стандартном растворе, мг;

S_2 – площадь пятна исследуемой пробы, мм²;

m – масса исследуемой пробы, г;

V – объем исследуемой пробы, л;

S_1 – площадь пятна стандартного раствора, мм².

Вычисление производят до третьего десятичного знака.

Контрольные вопросы:

1. Каковы источники поступления хлорорганических веществ в окружающую среду?

2. В чем заключается опасность хлорсодержащих органических веществ?

3. Какие вы знаете хлорсодержащие пестициды? В чем заключается опасность их нерационального применения?

Список литература:

1. Харина, С.Г. Агроэкологический подход к использованию гербицидов на сезонно-мерзлотных почвах Среднего Приамурья. – Благовещенск: ДальГАУ, 2004. – 164 с.

2. Майстренко, В.Н. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов/ В.Н. Майстренко, Р.З. Хамитов, Г.К. Будников. – М.: Химия, 1996. – 452 с.

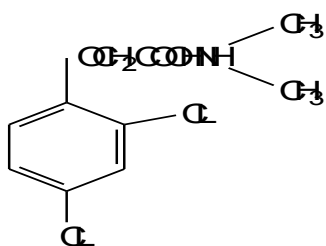
Лабораторная работа 11

Определение остаточных количеств аминной соли 2,4-Д дихлорфеноксиуксусной кислоты в воде методом тонкослойной хроматографии

Цель работы: ознакомиться с гербицидом 2,4-Д как загрязнителем воды. Научиться определять токсикант методом тонкослойной хроматографии.

Теоретические сведения

Аминная соль 2,4-Д - (диметиламмониевая соль 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты:



Препарат представляет собой белое кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде. Выпускаемый промышленностью гербицид – темно-бурая жидкость, содержащая 40 и 50% 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты, хорошо растворимая в воде. При 20°C в воде растворяется 540 мг/л 2,4-Д. Растворимость в 100 г этилового спирта при 25°C – 130 г, эфира – 243 г, толуола – 0,67 г, н-гексана – 0,11 г. 2,4-Д также хорошо растворима в бензоле, ацетоне, четы-

рехлористом углероде. Препарат устойчив при хранении. Под действием ультрафиолетового света может разлагаться.

Аминная соль 2,4-Д применяется для подавления двудольных сорняков в посевах зерновых культур, кукурузы, многолетних злаковых трав. В почву и водоемы гербицид попадает при обработке по вегетирующим растениям, при сносе и смыве осадками. В растениях и почве гербициды 2,4-Д подвергаются сложным превращениям и разложению. Однако хорошо растворимые в воде соли 2,4-Д могут вымываться в более глубокие слои почвы и попадать в грунтовые воды. Препарат может оказывать токсичное действие на объекты биосферы.

Исследования показывают, что токсическое действие 2,4-Д в почве проявляется в течение 4 – 6 недель после обработки. Но иногда наблюдается сохранение остаточных количеств гербицида в почве до конца вегетации. Следовательно, возможно и загрязнение воды в результате просачивания или вымывания с полей. В Амурской области возможно попадание больших количеств препарата в почву, если после обработок пройдут дожди. В этом случае возможно сохранение остаточных количеств 2,4-Д в пахотном слое почвы в течение всей вегетации зерновых культур.

Принцип метода. Метод основан на извлечении 2,4-Д из анализируемой пробы путем экстракции органическим растворителем (хлороформом или эфиром), очистке на хроматографической колонке. Дальнейшее определение производят при помощи метода хроматографии в тонком слое. В качестве адсорбента используют силикагель (пластинки «Силуфол»).

Подвижным растворителем служит смесь петролейного эфира, диэтилового эфира и муравьиной кислоты 25:25:0,6 мл. Или смесь ацетона и аммиака (8:1).

Проявление пятен 2,4-Д осуществляют с помощью 2%-го раствора дифениламина в ацетоне либо применяют «Силуфол» с люминесцентным индикатором.

Оборудование. Весы аналитические, ВЛР-200, роторный испаритель ИР-1М, воронка делительная емк. 1 л, колонка хроматографическая, цилиндр емкостью 500 мл, колба коническая емкостью 500 мл, камера для хромато-

графирования, вата обезжиренная, лампа кварцевая ПРК-4, пластинки для тонкослойной хроматографии «Силуфол» с люминесцентным индикатором, микропипетки.

Реактивы. Кислота соляная концентрированная, диэтиловый эфир или хлороформ, сульфат натрия безводный, реактив для проявления: 2 %-го раствор дифениламина в ацетоне, стандартный раствор 2,4-Д (100 мкг/мл в этиловом спирте), спирт этиловый, петролейный эфир (ч), диэтиловый эфир (ч), муравьиная кислота, универсальный индикатор.

Ход анализа

Пробу воды 500 мл помещают в делительную воронку емкостью 1 л, прибавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты до рН 3 и экстрагируют тремя порциями диэтилового эфира или хлороформа (100, 50 и 50 мл). Объединенный экстракт сушат, пропуская через колонку, заполненную безводным сульфатом натрия (20 г). Растворитель удаляют на вакуумном ротационном испарителе до нескольких капель. Температура водяной бани 40 – 50°C. Последние капли удаляют током воздуха (при помощи резиновой груши).

Хроматографирование

Сухой остаток в колбе растворяют в минимальном количестве холодного ацетона и наносят на хроматографическую пластинку «Силуфол». Рядом наносят стандартный раствор 2,4-Д (3 мкг, 5 мкг, 10 мкг).

Пластинку помещают в камеру для хроматографирования (эксикатор), в которую за 5 – 10 мин до начала хроматографирования помещают подвижный растворитель: смесь петролейного эфира с диэтиловым эфиром и муравьиной кислотой в соотношении 25 : 25 : 0,6 мл.

После подъема растворителя на 10 см (25 – 40 мин) пластинку вынимают, сушат на воздухе и опрыскивают проявляющим реактивом – 2%-ым раствором дифениламина в ацетоне. Пластинку сразу после опрыскивания облучают УФ – лучами 25 мин (лампа ПРК-4).

Пластинки «Силуфол» с люминесцентным индикатором. Камера та же. После подъема растворителя на 10 см высушивают хроматограмму и облучают УФ – лучами 40 – 50 мин.

Мелкокристаллический порошок желтовато-серого цвета, температура плавления 155 – 156°C. Практически нерастворим в воде, но растворим в большинстве органических растворителей. Соединение химически стойкое, не разрушается в кислой и щелочной средах. Устойчиво к воздействию высоких температур. Разрушается сильными окислителями с образованием серной кислоты и углекислого газа, восстановители в щелочной среде переводят тетраметилтиурамсульфид в соли диметилдитиокарбаминовой кислоты. Нелетуч, поэтому при работе с ним можно использовать противопылевые респираторы. ТМТД выпускается в форме 80%-го смачивающегося порошка. Препарат устойчив при хранении. В виде тонкой взвешенной пыли создает взрывоопасные смеси с воздухом.

ТМТД устойчив к воздействию факторов внешней среды и относится к стойким пестицидам, которые разлагаются в биологических средах до нетоксичных компонентов в течение 0,2 – 2 лет. Поэтому очень опасно применять препарат в высоких дозах, возможно его накопление в окружающей природе и уничтожение или нарушение экосистем в результате токсического действия.

На растениях сохраняется 1 – 1,5 месяца после обработки. В связи с опасностью накопления остатков препарата в урожае применять ТМТД разрешается только для обработки семян и обеззараживания посадочного материала.

ТМТД среднетоксичен для теплокровных животных и человека, $СД_{50}$ для крыс 865 мг/кг. Обладает выраженным кумулятивным действием, при нанесении на кожу вызывает дерматиты, при попадании в глаза – конъюнктивит, повышает чувствительность к алкоголю, в больших дозах оказывает мутагенное и канцерогенное действия.

Остатки ТМТД во всех пищевых продуктах не допускаются, ПДК в воздухе рабочей зоны 0,5 мг/г³.

Принцип метода. Метод основан на образовании комплексного соединения – тиурамата меди, окрашенного в салатный цвет, при взаимодействии катиона меди с тетраметилтиурамдисульфитом в спиртовом растворе. При содержании тетраметилтиурамдисульфида от 5 до 40 мкг в 1 мл раствора окраска подчиняется закону Ламберта-Бера. Чувствительность метода – 5 мкг

в 1 кг анализируемого продукта.

Оборудование: весы аналитические ВЛР-200, весы ВЛКТ-500, фотоэлектроколориметр ФЭК – 56, колбы конические емк. 100 мл, цилиндр, микропипетки, пробирки.

Реактивы: спирт этиловый 96%-ый, спиртовой раствор хлорида меди 10%-ый, тетраметилтиурамдисульфид чистый, перекристаллизованный. 2–5 г ТМТД растворяют в 5 мл хлороформа, добавляют 5 мл этанола при помешивании, образующийся осадок отфильтровывают, промывают спиртом и сушат при 100°C. Стандартный спиртовой раствор ТМТД 50 мкг/мл.

Ход анализа.

Исследуемый образец весом 20 г помещают в колбу и заливают равным или двойным количеством этилового спирта, в зависимости от характера объекта, и экстрагируют в течение 30 мин, при периодическом встряхивании. Можно экстрагировать на встряхивателе АВУ.

Экстракт фильтруют и измеряют объем фильтрата. К 5 мл экстракта добавляют 0,1 мл 1%-го спиртового раствора хлорида меди, подогревают до 50 – 60°C и фотометрируют через 20 – 30 минут при 440 нм (синий светофильтр № 4), пользуясь кюветами шириной 10 мм. В качестве контроля используют экстракт, не обработанный хлоридом меди.

Для построения калибровочного графика в ряд пробирок вносят последовательно 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора, что соответствует 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50 мкг ТМТД, доводят этиловым спиртом объем жидкости до 5 мл, затем добавляют в каждую пробирку 0,1 мл 1%-го спиртового раствора хлорида меди, нагревают на водяной бане (50 – 60°C) в течение 20 минут. Далее раствор фотометрируют в кювете с рабочей длиной 10 мм в сравнении с этиловым спиртом, к которому добавлен 0,1 мл 1%-го спиртового раствора хлорида меди.

Расчет результатов анализа

Содержание препарата в пробе находят по формуле:

$$X = \frac{\sigma \times V}{P \times V_1},$$

где X – количество ТМТД в анализируемом продукте, мг/кг;

σ – количество ТМТД, найденное по калибровочному графику, мкг;

P – навеска продукта, взятая для анализа, г;

U – общий объем экстракта, мл;

U_1 – объем экстракта, взятый для анализа, мл.

Контрольные вопросы:

1. Химическая природа ТМТД и его устойчивость в окружающей среде?
2. Возможность попадания ТМТД в объекты окружающей природы?
3. Почему обработки ТМТД могут оказаться опасными для биоценозов?

Список литературы:

1. Позняковский, В.М. Гигиенические основы питания, безопасность и экспертиза продовольственных товаров. – Новосибирск: Изд. Новосибирского университета, 1999. – 448 с.
2. Донченко, Л.В., Надыкта В.Н. Безопасность пищевой продукции/ Л.В. Донченко, В.Н. Надыкта. – М.: Пищпромиздат, 2001. – 528 с.

Лабораторная работа 13

Определение афлатоксина M_1 в молоке и молочных продуктах

Цель работы: ознакомиться с продуктами жизнедеятельности микроскопических грибов – микотоксинами и их влиянием на живые организмы. Научиться определять микотоксины в продуктах питания методом тонкослойной хроматографии.

Теоретические сведения

Микотоксины – это ядовитые продукты обмена плесневых грибов, образующихся на поверхности пищевых продуктов и кормов. Плесневые грибы – повсеместно распространенные микроорганизмы, известна их роль не только в порче продуктов при хранении, но и участие в ферментативных процессах при изготовлении отдельных видов сырья, лимонной кислоты, пенициллина.

Плесневые грибы, поражая пищевые продукты, ухудшают не только их органолептические свойства, снижают пищевую ценность, но и, загрязняя их токсичными метаболитами, могут вызвать опасные заболевания. Исследование изолированных микотоксинов показало, что они способны оказывать общетоксическое и иммунодепрессивное действие, избирательно нарушать функцию отдельных органов и систем организма (гепато – , нефро – и нейротоксический эффекты и др.). Ряд микотоксинов обладает гонадотоксическим, эмбриотоксическим, мутагенным и канцерогенным свойствами.

Наиболее распространенные в продуктах питания, высокотоксичные и представляющие реальную опасность среди всех микотоксинов – афлатоксины, стеригматоцистин, охратоксин, рихотецены, зеараленон, патулин, цитринин, дезоксиниваленол и др.

Микотоксины могут попадать в организм человека через пищевые цепи, с молоком, мясом и рыбой, в случае, когда использовались загрязненные микрофлорой корма. Микотоксины могут поражать и растительные продукты. Отсутствие на поверхности продукта видимой пленки еще не говорит об отсутствии в нем микотоксинов и о его безвредности и, наоборот, поражение грибами не всегда означает, что продукт поражен микотоксинами.

Афлатоксины могут вызывать хронический афлатоксикоз, характеризующийся повреждением печени. При этом образуются гепатомы, аденокарциномы в печени и желудке, иногда с метастазами в легких и почках, а также фибросаркомы. На канцерогенное действие афлатоксина значительно влияют различные физиологические воздействия – гормоны, кастрация, гипофизэктомия. Наличие в рационе липотропных веществ, жиров, белков, витамина А и других ингредиентов существенно влияет на канцерогенез, вызванный афлатоксинами.

Споры плесневых грибов – продуцентов афлатоксина – обычно находятся в почве и могут с почвенной пылью загрязнять все произрастающие на ней продовольственные культуры. Присутствие афлатоксина в продуктах животного происхождения (молоко, мясо, яйца) может быть обусловлено на-

личием микотоксинов в кормах, либо загрязнением микромицетами различных изделий (сыров) в процессе их производства.

С учетом сильнейшей канцерогенности афлатоксина M_1 рассчитана максимальная не действующая на человека его доза. Предельно допустимая концентрация афлатоксина в молоке и молочных продуктах (ПДК) 0,0005 мг/кг (л). Предельно допустимая концентрация дезоксиниваленона в продовольственном зерне и зерновых продуктах 1,0 мг/кг.

Принцип метода. Методы определения микотоксинов основаны на экстракции их из продуктов питания органическими растворителями, очистке экстрактов на хроматографической колонке или рекстракцией в более полярный растворитель. Дальнейшее определение проводят с помощью тонкослойной хроматографии, используя характерную особенность афлатоксинов флуоресцировать в УФ лучах.

Факторы, влияющие на результат анализа. Ряд факторов могут влиять на результат анализа. К ним относится чистота растворителя и посуды, тщательность калибровки и соблюдение условий хранения, характер освещенности в лабораторной комнате и др.

Для получения точных результатов необходимо использовать органические растворители и реактивы самой высокой чистоты. Растворители, длительное время хранившиеся в пластмассовых емкостях, нельзя использовать ввиду возможного их загрязнения.

Посуда, находящаяся в контакте с афлатоксином, подлежит тщательной обработке путем погружения на 12 часов в специальный дезинтоксикационный раствор следующего состава: 2,5 кг NaOH, 1 кг хлорамина, 100 г стирального порошка, 50 л воды. После такой дезинтоксикации посуду моют общепринятым способом.

Общие условия и правила работы

Афлатоксины – сильные токсичные и канцерогенные вещества. Поэтому для работы с ними необходимы определенные условия и строгое соблюдение ряда правил.

Исследования, связанные с афлатоксинами, следует проводить в отдельной комнате или в обычной химической лаборатории, имеющей боксовое отделение или настольный бокс. Афлатоксины следует хранить в местах, не доступных для посторонних (в закрывающихся на замок холодильниках или морозильных камерах, вне работы подлежащих опечатыванию).

Сосуды, содержащие афлатоксины, подлежат обозначению "Яд" и в целях предупреждения загрязнения рабочего места должны находиться в стаканах или других емкостях. Рабочее место с той же целью нужно покрыть листом фильтровальной бумаги, которая после работы переносится в герметичный мешок или контейнер для последующего сжигания.

В случае попадания афлатоксина на лабораторное оборудование и предметы, их детоксикацию следует проводить тщательной обработкой 5 - или 10%-ым раствором хлорамина, а затем 1%-ым раствором NaHCO_3 .

Работать с афлатоксинами следует в халате, марлевой маске, клеенчатом фартуке и резиновых перчатках. Перчатки и фартук после работы необходимо обработать раствором хлорамина и тщательно промыть в проточной воде.

В случае попадания афлатоксинов на открытые участки тела, в глаза, на слизистую рта и носа, необходимо их немедленно и тщательно смыть 1%-ым раствором борной кислоты, а затем проточной водой.

Оборудование: мельница лабораторная (типа ЭМ - 3А) или кофемолка ЭКМ - 3У, весы технические ВЛКТ-500, аппарат для встряхивания проб АБУ-6С, ротационный испаритель, насос водоструйный, баня водяная с электронагревателем, диагностическая лампа ОЛД-41 или прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833), микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванными стеклянные капилляры, камеры для ТСХ с притертыми крышками, пластины для ТСХ "Силуфол" размером 15 x 15 см, ЧССР, силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 100 – 250 микрон, распылитель, цилиндры мерные на 100; 250 и 500 мл, колбы плоскодонные конические на 500 и 1000 мл и круглодонные на 250 мл с МШ

29 и притертой пробкой, микропипетки на 0,1 мл, бумага фильтровальная, колбы мерные на 100 мл, воронки химические диаметром 150 мм, делительные воронки на 250 или 500 мл, колбы плоскодонные на 100 и 250 мл, колонка стеклянная хроматографическая.

Реактивы: афлатоксин М₁, ацетон, гексан, бензол, ацетонитрил, хлороформ медицинский, эфир диэтиловый медицинский, вода дистиллированная, кислота серная, кислота лимонная, кислота азотная, натрий серноокислый безводный, натрий хлористый, свинец уксуснокислый, йод кристаллический, изопропиловый спирт.

Экстракция: для анализа берут 100 мл жидкого молока или 10 г сухого молока, или 50 г масла, или 50 г сыра. Навеску масла растапливают и переносят в колбу для экстракции, сыр перед взятием навески измельчают с помощью терки. Анализируемый образец помещают в плоскодонную коническую колбу на 500 мл с притертой пробкой и добавляют водный раствор лимонной кислоты и хлористого натрия согласно схемы:

Продукт	Масса образца, г или объем, мл	Добавляемое количество воды, мл	Добавляемое количество лимонной кислоты и хлористого натрия, г
Молоко жидкое	100	10	0,48 г лимонной кислоты и 4,0 г хлористого натрия во всех случаях предварительно растворяют в воде, добавляемой к анализируемому продукту
Молоко сухое	10	100	
Сыр	50	80	
Масло	50	90	

К полученной смеси добавляют 300 мл ацетона и встряхивают в течение 30 минут на аппарате для встряхивания. Смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр на 500 мл, отбирают 275 мл фильтрата.

Очистка экстракта. Экстракт переносят в плоскодонную коническую колбу на 1000 мл, добавляют 20 мл 15%-го водного раствора уксуснокислого

свинца и 200 мл воды, встряхивают и оставляют в темноте на 10 – 15 минут. Затем добавляют 10 мл насыщенного раствора сернокислого натрия, встряхивают и фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр на 500 мл. Отбирают 350 мл фильтрата и переносят в делительную воронку на 500 мл, добавляют 100 мл гексана и встряхивают. После разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают, к нижнему водно-ацетоновому слою добавляют 50 мл гексана, встряхивают в делительной воронке. После разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают, к нижнему водно-ацетоновому слою добавляют 100 мл хлороформа, встряхивают в делительной воронке. Нижний хлороформный слой отделяют, водно-ацетоновый слой повторно экстрагируют 50 мл хлороформа в делительной воронке. Объединенные хлороформные экстракты сушат безводным сернокислым натрием (5 – 10 г) в течение 30 мин. Высушенный экстракт фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 250 мл с МШ 29. Упаривают на ротационном испарителе до объема 10 – 20 мл. Содержимое колбы переносят в грушевидную колбу на 100 мл и упаривают досуха на ротационном испарителе. Вещество смывают со стенок колбы 100 мкл хлороформа.

Обнаружение афлатоксина М.

Приготовление рабочего раствора стандарта. Афлатоксин М₁ поставляется в ампулах по 0,01 мг. Ампулу вскрывают и растворяют содержимое ампулы в 2 мл смеси бензол-ацетонитрил (9 : 1), переносят в мерную колбу на 10 мл, трижды промывают ампулу по 1 мл той же смеси, промывные растворы переносят в ту же мерную колбу. Доводят объем раствора в мерной колбе до метки смесью бензол-ацетонитрил (9 : 1). Полученный раствор содержит 1мкг афлатоксина М₁ в 1 мл и используется для ТСХ как рабочий раствор. Все растворы стандартов хранят в холодильнике при температуре ниже 0°C. Срок годности раствора 4 – 5 месяцев.

Очистка и обнаружение афлатоксина М₁

Пластинку "Силуфол" размером 15 x 15 см размечают тонкими каран-

дашными линиями. В правом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца или стеклянного калиброванного капилляра 20 мкл раствора экстракта. Наносить раствор следует постепенно, не допуская размывания стартового пятна более 4 – 5 мм. В правом верхнем и левом нижнем углах на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят по 2 мкл рабочего раствора стандартов. Пластинку помещают в камеру для ТСХ, в которую предварительно наливают смесь бензол-эфир-гексан (1:2:1), уровень растворителя должен быть на 1 см ниже нанесенных пятен. Развитие хроматограммы проводят в первом направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки, затем пластинку извлекают из камеры и сушат 5 минут в темноте. Высушенную пластинку поворачивают на 90° по часовой стрелке и помещают в камеру для ТСХ, в которую предварительно наливают смесь хлороформ-ацетон-бензол (9:1:1). Проводят развитие пластинки во 2-ом направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки, затем пластинку извлекают и сушат 5 мин в темноте. Рассматривают пластинку в длинноволновом УФ – свете. Обнаружение на пластинке пятен, соответствующих по хроматографической подвижности и цвету флуоресценции пятнам стандартов афлатоксинов, свидетельствует о возможности присутствия афлатоксинов в пищевом продукте.

Для афлатоксина M_1 в качестве растворителей для развития хроматограмм используют в 1-ом направлении: гексан – эфир (1 : 2), во 2-ом направлении: смесь хлороформ – ацетон – изопропиловый спирт (85:10:5).

Тесты, подтверждающие наличие афлатоксина M_1 в продукте.

1-й тест. Стеклопластинку 20 x 20 см заливают 5 – 10% раствором йода в эфире, после испарения эфира пластинку с тонким слоем йода помещают над ТСХ – пластинкой на расстоянии 0,5 – 10 см и подвергают ее воздействию паров йода в течение 20 – 30 секунд. Затем пластинку рассматривают в длинноволновых УФ лучах. Сохранение цвета и интенсивности флуоресценции пятен стандартов и соответствующих им пятен экстракта

подтверждает возможное наличие афлатоксинов в пищевом продукте.

2-й тест. ТСХ – пластинку опрыскивают раствором азотной кислоты в воде (1:2) и рассматривают ее в длинноволновых УФ лучах. Если цвет флуоресценции стандартов афлатоксинов изменяется с синего или синезеленого на желтый, а цвет флуоресценции пятен экстракта не меняется на желтый, то афлатоксины в пробе отсутствуют. Если же цвет флуоресценции пятен экстракта также меняется на желтый, то это служит подтверждением возможного наличия афлатоксинов в пищевом продукте.

При проведении операций подтверждения ориентировочно оценивают количество афлатоксина в пятне экстракта путем сравнения интенсивности его флуоресценции со стандартом.

Количественное определение афлатоксина M_1 . ТСХ – определение содержания афлатоксина M_1 проводят двумерной разгонкой в разных направлениях. Пластинку "Силуфол" размером 15 x 15 см размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца 20 мкл экстракта. В левом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев наносят 2 мкл рабочего раствора стандартов афлатоксина. В правом верхнем углу на расстоянии 1,2 и 3 см от верхнего края пластинки и 1,5 см от правого края пластинки наносят соответственно 2,0; 4,0; и 6,0 мкл раствора стандартов афлатоксина.

В качестве растворителей для развития хроматограмм используют: в 1-ом направлении смесь гексан – эфир (1 : 2); во 2-ом направлении: хлороформ – ацетон – изопропиловый спирт (85 : 10 : 5). После развития пластинки в обоих направлениях ее рассматривают в длинноволновом УФ излучении и сравнивают интенсивность флуоресценции афлатоксина M_1 в экстракте с интенсивностью флуоресценции пятен стандарта, определяя количество (нг) афлатоксина M_1 в пятне экстракта.

Содержание афлатоксина M_1 в продукте рассчитывают по формуле

$$C = \frac{Y_1 \times Y_3 \times Y_5 \times m}{Y_2 \times Y_4 \times Y_6 \times M} ,$$

- где C – концентрация афлатоксина M_1 в мкг/кг или мкг/л;
- U_1 – объем водно-ацетоновой смеси, в мл;
- U_2 – объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа, в мл;
- U_3 – объем водно-ацетонового фильтрата, раствора уксуснокислого свинца, раствора сернокислого натрия и воды;
- U_4 – объем фильтрата после очистки уксуснокислым свинцом, в мл;
- U_5 – объем раствора экстракта перед ТСХ, в мкл; (100 мкл).
- U_6 – объем экстракта, наносимый на ТСХ - пластинку, в мкл (20 мкл);
- m – количество афлатоксина M_1 в пятне экстракта, в нг;
- M – навеска продукта, взятого для анализа в г или мл (100 мл для жидкого молока, 10 г для сухого молока, 50 г для масла, 50 г для сыра).

Контрольные вопросы:

1. К какой группе химических веществ относятся микотоксины?
2. Как воздействуют микотоксины на животных и человека?
3. Расскажите о возможных путях попадания микотоксин в пищевые продукты растительного и животного происхождения.
4. Методы профилактики микотоксикозов.
5. Техника безопасности при работе с микотоксинами.

Список литературы:

1. Кузубова, Л. И. Токсиканты в пищевых продуктах: Аналитический обзор/ АН СССР Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1990. – 127 с.
2. Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в пищевых продуктах, утв. МЗ СССР 10.12.80 г. № 2273 – 80.
3. Тутельян, В.А. Микотоксины / В.А. Тутельян, Л.В. Кравченко. – М.: Медицина, 1985. – 385 с.
4. Саркисов, А.Х. Микотоксикозы. – М.: Сельхозиздат, 1980. – 184 с.

Лабораторная работа 14

Определение токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов

Цель работы: определить общую токсичность и наличие микотоксинов в фуражном зерне, продуктах его переработки и комбикормах.

Теоретические сведения

При санитарной оценке концентрированных кормов их необходимо исследовать на токсичность, которая может быть обусловлена за счет наличия в кормах химических соединений и микотоксинов. Определение микотоксинов методом тонкослойной хроматографии затруднительно, так как требует специально оборудованной лаборатории, дорогих материалов и продолжительно по времени. Поэтому на производстве (фермах, животноводческих комплексах) чаще используют метод биоиндикации. В качестве биотестов используют аквариумных рыб гуппи.

Живородящая рыба гуппи (*Zebistis uticulatus*) как объект для определения токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов имеет ряд преимуществ перед другими аквариумными рыбами. Положительные свойства гуппи: малые размеры, неприхотливость к условиям обитания, короткий цикл развития, почти полная выживаемость мальков, легкость разведения и кормления.

Для получения нужного количества гуппи необходимо иметь крупных половозрелых самок (8 – 12) и самцов (3 – 4). Размножаются они при температуре воды не ниже 18 – 20°C (оптимальная температура 22 – 24°C). Самки гуппи достигают половозрелости в возрасте 180 – 200 дней и в дальнейшем в зависимости от условий содержания и кормления мечут мальков через каждые 28 – 35 дней, в начале до 20, а с развитием до 80 экземпляров за 1 помет. Аквариум для гуппи желательно иметь каркасный, объемом 80 л воды, которую лучше брать из природного водоема (можно и водопровода). Воду перед

залитием в аквариум следует хорошо отстоять (в эмалированных ведрах или в стеклянной емкости), а при наличии мути профильтровать через гигроскопичную вату. Дно аквариума должно быть засыпано хорошо промытым речным песком слоем 2,5 – 8 см.

В аквариум помещают высшие водные растения, образующие густые заросли, в которых мальки могли бы укрываться от взрослых рыб. Рекомендуется зубчатая элодея, кабомба, валлиснерия, карликовая амазонка. На поверхность аквариума можно поместить риччию и водяную капусту. В качестве убежища для мальков берут также пузырчатку, которая плавает почти на поверхности воды.

Кормление гуппи не должно быть обильным. Нужно давать (2 раза в день) столько корма, чтобы рыбы за несколько часов (1 – 2 ч) его полностью поедали. Нельзя допускать, чтобы остатки корма постоянно находились в аквариуме. Обильное кормление – одна из основных причин нарушения биологических процессов в аквариуме, помутнения воды, порчи грунта, появления синих водорослей и болезней рыб. Лучшим кормом для гуппи являются личинки комаров, различные виды дафний, самки циклопов, печень животных, водоросли.

Освещение аквариума должно быть достаточным, так как только при этом условии возможен рост растений, жизнедеятельность которых в свою очередь является необходимым условием правильного хода биологических процессов в аквариуме. Для освещения можно использовать лампы накаливания или люминесцентные лампы. Интенсивность освещения: при обычных лампах накаливания на 1 квадратный дециметр поверхности грунта требуется мощность 2 Вт, при люминесцентных лампах – 2 – 3 Вт.

Рыбы гуппи используются в опыте не ранее 8 – 9 дней с момента приобретения.

Для биотестирования в соответствии с ГОСТ отбирают средние пробы кормов и отправляют в лабораторию на исследования, в которых определяют

общую токсичность, а также исследуют на присутствие микотоксинов.

Материалы и оборудование: химические стаканы емкостью 700 – 800 мл диаметром от 11 до 18 см; делительные воронки на 250 мл; колбы плоскодонные с притертой пробкой для экстракции емкостью 500 мл; баня водяная или песочная, электрическая, шуттель-аппарат; фарфоровые чашки; пипетки, градуированные на 10 мл; цилиндры стеклянные емкостью 100 мл; фильтры обеззоленные, ТУ-09-1678-72.

Реактивы: ацетон ч., ч.д.а., ГОСТ 2603; гексан ТУ 609-3375-73.

1. Определение общей токсичности

Принцип методики. Принцип методики основан на извлечении из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов ацетоном жиро – и водорастворимых фракций токсических веществ и последующем воздействии этих фракций на аквариумных рыб гуппи. Методика позволяет определить токсичность концентрированных кормов в течение суток.

Ход анализа. Пробу фуражного зерна (ячмень, овес, пшеница, горох, кукуруза, просо) массой 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируют без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой, заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и выпаривают под тягой на водяной бане (55 – 60°C) досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан (емкостью 700 – 800 мл, диаметром 11 – 15 см) с 500 мл воды из аквариума комнатной температуры (17 – 20 °C). Экстракт из комбикормов, кукурузы, гороха и проса после растворения в воде помещают в бытовой холодильник на 40 – 45 минут при температуре 6 – 7 °C. По истечении срока экстракты фильтруют через небольшой слой ваты, подогревают до исходной температуры (17 – 20 °C), помещают 5 рыб гуппи (независимо от пола), взрослых, за которыми ведут на-

блюдения, отмечая их гибель через 24 часа (гуппи, вышедшие из опыта, выбраковываются).

2. Определение микотоксинов

Принцип методики. Методика основана на извлечении ацетоном микотоксинов из фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов, частичной очистке экстракта гексаном от липидов и некоторых неполярных хлор- и фосфорорганических соединений с последующей переэкстракцией микотоксинов хлороформом и исследованием на рыбах гуппи.

Если фуражное зерно, продукты его переработки и комбикорм окажутся токсичными, такие партии кормов немедленно исключаются из рациона и проводят дополнительные дифференциальные исследования на хлор- и фосфорорганические соединения, препараты ртути, алкалоиды и микотоксины.

Ход анализа. Пробу фуражного зерна массой 50 г тщательно измельчают на лабораторной мельнице (отруби и комбикорма экстрагируются без измельчения), помещают в плоскодонную колбу с притертой пробкой. Заливают 150 мл ацетона и экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение двух часов или в статическом состоянии – 20 часов. Экстракт фильтруют через бумажный обеззоленный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают под тягой на водяной бане (55 – 60 °С) до исчезновения хлороформа (досуха). Сухой остаток растворяют в 5 мл ацетона и переносят его в химический стакан с 500 мл воды из аквариума комнатной температуры (17 – 20 °С). В раствор экстракта помещают 5 гуппи (независимо от пола и возраста), за которыми ведут наблюдение, отмечая их гибель через 24 часа.

Результаты определения. В зависимости от степени токсичности исследуемого корма гуппи погибают в сроки, указанные в таблице 5. В качестве контроля используют 1%-ый раствор ацетона, в котором гуппи в течение суток должны остаться живыми. Контроль ставится с целью определения качества ацетона.

Оценка степени токсичности исследуемого корма

Степень токсичности кормов	Количество погибших гуппи, штук	Время гибели (в часах)
Нетоксичный	Не более 1	В течение 24
Слаботоксичный	2 – 4	24
Токсичный	5	24

В конце работы делается вывод о степени токсичности исследованных кормов.

Контрольные вопросы:

1. Почему метод биотестирования более приемлем для проведения исследований в производственных условиях?
2. Объясните принцип методики определения токсичности кормов.
3. Почему в качестве индикатора используются рыбы гуппи?

Список литературы:

1. Микозы и микотоксикозы сельскохозяйственных животных и птиц / Под общей редакцией Т.Г. Манько. – М.: 1976. – 254 с.
2. Мосина, Л.В. Агрэкологии Модуль 7. Сельскохозяйственная экотоксикология / Л. В. Мосина. – Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2000. – 184 с.
3. Федорова А.И. Практикум по экологии и охране окружающей среды / А.И. Федорова, А.Н. Никольская. – М.: Владос, 2003. – 286 с.

Лабораторная работа 15

Определение нитратов в мясе и мясопродуктах, в молоке и молочных продуктах.

Цель работы: ознакомиться с нитритами, нитратами, нитрозоаминами – токсичными веществами, загрязняющими продукты питания. Научиться определять нитриты в продуктах питания животного происхождения методом, основанным на реакции Грисса.

Теоретические сведения

Нитраты и нитриты в продукции животноводства могут накапливаться при поедании животными кормов, содержащих повышенное количество нитратов и в процессе переработки и изготовления продуктов питания. Нитраты, содержащиеся в пищевых продуктах в незначительной концентрации или в среде, в состав которой не входят окислители, практически безопасны для организма взрослого здорового человека, поэтому нельзя говорить об их непосредственной токсичности.

Согласно нормативам Всемирной организации здравоохранения, допустимая норма нитратов составляет 5 мг NaNO_3 в сутки на 1 кг массы человека. Для человека массой 60 кг это соответствует примерно 220 мг NO_3^- . Следует иметь в виду, что при определении этой нормы не учитывалась возможность образования из нитратов и нитритов.

Потенциальная токсичность нитратов, содержащихся в повышенной концентрации в пищевом сырье и продуктах питания, заключается в том, что они при определенных условиях могут восстанавливаться до нитритов, которые обуславливают серьезное нарушение здоровья не только детей, но и взрослых. Микробиологическое восстановление нитратов под действием ферментов нитратредуктаз происходит как вне человеческого организма, так и внутри его.

В первом случае оно имеет место, например, при транспортировке, хранении и переработке сырья и продуктов. Здесь особенно опасным является неправильное хранение готовых блюд с повышенным содержанием нитратов; в частности, при повышенной температуре и в течение длительного времени.

В организме человека нитриты образуются в пищеварительном тракте (желудке и кишечнике) или уже непосредственно в полости рта. Поступающие с пищей нитраты всасываются в пищеварительном тракте, попадают в кровь и с ней в ткани. Через 4 – 12 ч большая часть их (80% у молодых и 50% у пожилых людей) выводятся из организма через почки. Остальное их коли-

чество остается в организме. Предполагается, что в кишечнике нитраты превращаются главным образом в соединения аммония.

Токсическое действие нитритов в человеческом организме проявляется в форме метгемоглобинемии. Она является следствием окисления двухвалентного железа Fe^{2+} гемоглобина в трехвалентное Fe^{3+} . В результате такого окисления гемоглобин, имеющий красную окраску, превращается в метгемоглобин, который уже имеет темно-коричневую окраску:



Совсем еще недавно считалось, что этому заболеванию подвержены исключительно дети младшего грудного возраста. Однако затем было доказано, что и дети более старшего возраста и даже взрослые могут поражаться асимптоматической (без клинических признаков) формой метгемоглобинемии.

Кроме того, нитраты, особенно в повышенной концентрации, могут влиять на активность ферментов пищеварительной системы, метаболизм витамина А и деятельность щитовидной железы. Нарушается работа сердца (изменяется электрокардиограмма) и поражается центральная нервная система. Нельзя исключить и возможность аккумуляции нитратов в человеческом организме.

В последнее время медики уделяют большое внимание нитратам еще и потому, что они превращаются в организме в конечном итоге в нитрозосоединения, многие из которых являются канцерогенными. Нитрозосоединения относятся к веществам, в которых нитрозогруппа связана с атомом азота. Они образуются при взаимодействии нитритов не только с вторичными, но и с третичными, а также, согласно последним данным, и с четвертичными аминами.

Образование нитрозоаминов при взаимодействии азотистой кислоты со вторичными аминами можно схематически представить в виде реакции:



где R_1 и R_2 – алкилы, арилы или гетероциклические соединения.

При технологической обработке мясных продуктов наиболее опасными с точки зрения образования нитрозоаминов являются стадии посола и копчения. При посоле используются нитраты, нитриты, способствующие путем образования достаточно стабильных пигментов сохранению естественной окраски, а также специи лук, чеснок, танин и др. Исследования показали, что при хранении в таких смесях образуются нитрозоамины. При посоле происходит необратимый распад некоторой части белков с образованием низкомолекулярных аминокислот и аминов. Процесс образования нитрозоаминов ускоряется при копчении. Коптильный газ содержит азотсодержащие газы, а также формальдегид, катализирующий реакцию нитрозирования.

Принцип метода. Метод основан на извлечении нитритов из продукции животноводства нагретой водой, осаждении белков и получении окрашенных растворов при реакции с реактивом Грисса. Концентрация нитритов определяется фотоколориметрически.

Оборудование: весы аналитические ВЛР-200, весы технические ВЛКТ-500, водяная баня, фотоэлектроколориметр ФЭК – 56М, терка или гомогенизатор, колбы конические емк. 100 мл, стаканы химические емк. 100 мл, цилиндры емк. 100 мл, колбы мерные емк. 100 мл, 200 мл, 500 мл, пипетки емк 1,0 мл, 2,0 мл, 5,0 мл, термометр, фильтры обеззоленные "синяя лента", вата обезжиренная, кюветы с толщиной поглощающего слоя 2 см.

Реактивы: кислота уксусная 2М, сульфаниловая кислота, L-нафтиламин, нитрат натрия, нитрит натрия, аммиак, кислота соляная 0,1М, натрия гидроокись, цинк сернокислый.

Приготовление реактива Грисса

Раствор № 1. 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл раствора уксусной кислоты (2 М).

Раствор № 2 0,2 г L нафтиламина кипятят с 20 мл дистиллированной воды, раствор фильтруют и прибавляют к фильтрату 180 мл 2М раствора уксусной кислоты.

Растворы хранят отдельно на холоде в течение двух месяцев.

Перед употреблением 1 часть раствора №1 смешивают с равной частью по объему раствора №2. В случае появления при смешивании растворов розовой окраски добавляют цинковую пыль, взбалтывают и фильтруют. Реактив Грисса готовят непосредственно перед анализом.

Приготовление стандартных растворов натрия азотистокислого.

Приготовление основного раствора. Для приготовления основного раствора взвешивают навеску, содержащую точно 1 г основного вещества, определенную по формуле

$$X = \frac{100}{N},$$

где X – навеска нитрита натрия, г;

N – количество основного вещества, содержащегося в 100 г реактива в процентах.

Пример: NaNO_2 квалификации х.ч. содержит 98% основного вещества, тогда масса навески равна

$$X = \frac{100}{98} = 1,0204 \text{ г}$$

Навеску переносят в мерную колбу на 1000 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление рабочего раствора. 10 мл основного раствора переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Приготовление образцового раствора. 5 мл рабочего раствора переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. 1 мл образцового раствора содержит 0,001 мг (1 мкг) натрия азотистокислого.

Построение градуировочного графика.

В мерные колбы на 100 мл наливают рабочий раствор в количестве 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 мл. В первую колбу рабочего раствора не вносят, используют ее как контрольную. В каждую колбу добавляется 5 мл аммиака, 10 мл

0,1 М раствора HCL, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Затем в конические колбы на 100 мл переносят по 15 мл приготовленных выше растворов и по 15 мл реактива Грисса. Интенсивность розовой окраски измеряют на фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром при длине волны 540 нм не ранее, чем через 15 минут после прибавления реактива Грисса, в кювете с толщиной поглощающего слоя 20 мм.

Готовят три серии стандартных растворов, начиная каждый раз с приготовления основного раствора из новой навески натрия азотистокислого.

По полученным данным средним из трех определений на миллиметровой бумаге строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс массовую концентрацию нитрита натрия мкг/мл, а на оси ординат – соответствующие оптические плотности. График должен проходить через начало координат.

Построение графика содержания нитритов в стандартных пробах.



Проведение анализа

Приготовление вытяжки. 20,0 г пробы, подготовленной к анализу, взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и помещают в химический стакан на 100 мл. Заливают 35 – 40 мл воды, нагретой до 55°C и настаивают 10 минут при периодическом перемешивании. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр в мерную колбу на 200 мл. Навеску несколько раз промывают теплой дистиллированной водой и переносят на фильтр, где еще несколько раз промывают теплой водой. Охлажденный фильтрат доливают до метки.

При приготовлении вытяжки из сырокопченых колбас и сырокопченых продуктов из свинины, баранины и говядины навеску 20 г заливают 200 мл

дистиллированной воды при температуре 55°C и настаивают 30 минут. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр, не перенося на него остатка.

Осаждение белков. 20 мл вытяжки помещают в коническую колбу на 100 мл, добавляют 10 мл раствора гидроксида натрия и 40 мл раствора сернокислого цинка. Смесь в колбе нагревают на кипящей водяной бане в течение 7 минут. После охлаждения доводят объем до 100 мл дистиллированной водой, перемешивают и фильтруют через обеззоленный фильтр "синяя лента". Параллельно проводят контрольный анализ на реактивы, помещая в мерную колбу на 100 мл вместо 20 мл вытяжки 20 мл воды.

Получение окрашенного раствора и его колориметрирование

В коническую колбу на 100 мл помещают 5 мл прозрачного фильтрата, полученного после осаждения белка, 1 мл раствора аммиака, 2 мл раствора соляной кислоты, 2 мл дистиллированной воды и для усиления окраски 5 мл образцового раствора натрия азотистокислого, с содержанием нитрита 1 мкг/мл. Затем в колбу приливают 15 мл реактива Грисса и через 15 минут колориметрируют в тех же условиях, что и растворы шкалы, в отношении раствора сравнения (нулевого раствора).

Обработка результатов.

Массовую долю нитрита (X) в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{M \times 200 \times 100 \times 100 \times 30}{m \times 20 \times 5 \times 10^6}$$

где M – массовая концентрация нитрита натрия, найденная по градуировочному графику, мкг/мл;

m – масса навески в граммах;

10^6 – коэффициент перевода в граммы.

Контрольные вопросы:

1. Расскажите о путях попадания нитритов и нитратов в продукты пита-

ния.

2. Как проявляется токсическое действие нитратов и нитритов для человека?

3. Источники поступления нитрозоаминов в организм человека и возможности их синтеза в ЖКТ?

4. Как можно снизить токсический эффект нитратов, поступающих в организм человека?

Список литературы:

1. Козлова, А.Б. Нитраты и экологическая безопасность. – Благовещенск: Изд. Даль ГАУ, 2004. – 110 с.

2. Соколов, О.А., Семенов В.А., Агаев В.М. Нитраты в окружающей среде / О.А. Соколов, В.А. Семенов, В.М. Агаев – Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. –316 с.

Содержание

Введение.....

Лабораторная работа 1. Отбор проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания, почвы и воды.....	4
Лабораторная работа 2. Методы определения токсического влияния почвенных микроорганизмов на растения.....	20
Лабораторная работа 3. Определение в почве активности ферментов.....	24
Лабораторная работа 4. Накопление фенольных соединений в органах цветковых растений, мхах, лишайниках, как проявление защитной реакции на неблагоприятные условия среды.....	29
Лабораторная работа 5. Влияние солей тяжелых металлов на плазмолиз протоплазмы растительной клетки и коагуляцию растительных и животных белков	34
Лабораторная работа 6. Определение свинца и кадмия в растениях	38
Лабораторная работа 7. Определение ртути в мясе, мясных и молочных продуктах методом визуального колориметрирования.....	42
Лабораторная работа 8. Метод определения общего железа в питьевой воде (Гост 4011 – 72).....	51
Лабораторная работа 9. Хроматографические методы исследования	55
Лабораторная работа 10. Определение остаточных количеств хлорорганических пестицидов (ГОСТ 23452-79).....	61
Лабораторная работа 11. Определение остаточных количеств аминной соли 2,4-Д дихлорфеноксисукусной кислоты в воде методом тонкослойной хроматографии.....	66
Лабораторная работа 12. Колориметрическое определение тетраметилтиурам – дисульфида (ТМТД) в зерне.....	69
Лабораторная работа 13. Определение афлатоксина М ₁ в молоке и молочных продуктах.....	72
Лабораторная работа 14. Определение токсичности фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов.....	81
Лабораторная работа 15. Определение нитратов в мясе и мясопродуктах, в молоке и молочных продуктах.....	85