



А. И. ФОКИНА,
С. Г. СКУГОРЕВА,
Е. В. ТОВСТИК

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТОКСИКОЛОГИИ

(лабораторный практикум)

Учебно-методическое пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт химии и экологии
Кафедра фундаментальной химии и методики обучения химии

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

А. И. ФОКИНА, С. Г. СКУГОРЕВА, Е. В. ТОВСТИК

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТОКСИКОЛОГИИ (ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ)

Учебно-методическое пособие

Киров
2018

УДК 615.9:54(07)
Ф753

Допущено к изданию методическим советом института химии и экологии ВятГУ в качестве учебного пособия для студентов направления 04.03.01, 04.04.01 «Химия», 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия», 05.03.06 «Экология и природопользование»

Рецензент:

канд. биол. наук, доцент кафедры
экологии и природопользования ВятГУ
Г. И. Березин

Фокина, А. И.

Ф753 Химические основы токсикологии (лабораторный практикум): учебно-методическое пособие / А. И. Фокина, С. Г. Скугорева, Е. В. Товстик. – Киров: ВятГУ, 2018. – 81 с.

Учебно-методическое пособие может быть использовано при подготовке студентов химических и экологических специальностей высших учебных заведений, а также при проведении научных исследований студентами, магистрантами, аспирантами и научными сотрудниками.

УДК 615.9:54(07)

© ВятГУ, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ 1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И ФАРМПРЕПАРАТОВ	6
Лабораторная работа № 1. Определение содержания нитратов в овощах	6
Лабораторная работа № 2. Определение содержания нитритов в колбасной продукции	9
Лабораторная работа № 3. Определение содержания хлоридов в колбасной продукции	14
Часть 1. Определение хлорида натрия по методу Мора	14
Часть 2. Определение хлорида натрия по Фольгарду с применением роданида калия	16
Лабораторная работа № 4. Определение содержания действующего вещества в фармпрепарате и расчет максимального количества фармпрепарата для приема взрослыми и детьми	19
Лабораторная работа № 5. Определение токсичности различных соединений, применяемых в фармации, методом компьютерного моделирования	21
РАЗДЕЛ 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БЫТОВОЙ ХИМИИ (НА ПРИМЕРЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО МОЮЩЕГО СРЕДСТВА)	22
Лабораторная работа № 6. Определение содержания фосфатов в синтетических моющих средствах	22
Лабораторная работа № 7. Определение содержания активного кислорода в синтетических моющих средствах	26
Лабораторная работа № 8. Использование методов биотестирования в оценке токсичности растворов синтетических моющих средств	29
Часть 1. Определение токсичности растворов синтетических моющих средств тетразольно-топографическим методом (по жизнеспособности цианобактерий)	29
Часть 2. Биотестирование растворов моющих средств по гибели <i>Daphnia</i> <i>magna</i>	31
Часть 3. Биотестирование растворов моющих средств с использованием культуры люминесцентных бактерий-биосенсоров серии «Эколюм»	33

РАЗДЕЛ 3. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДМЕТОВ ДОМАШНЕГО ОБИХОДА	35
Лабораторная работа № 9. Определение содержания формальдегида в материале для изготовления мебели	35
РАЗДЕЛ 4. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА, ПОЧВЫ И ВОДЫ	38
Лабораторная работа № 10. Определение концентрации некоторых загрязняющих веществ в воздухе с помощью индикаторных трубок	38
Лабораторная работа № 11. Фитотестирование почв	42
Часть 1. Фитотестирование почв с использованием семян кресс-салата	42
Часть 2. Фитотестирование почв с использованием семян редиса	44
Лабораторная работа № 12. Определение ионов меди(II) в пробах питьевой воды методом инверсионной вольтамперометрии	45
РАЗДЕЛ 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У РАСТЕНИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВЫ И ВОДНЫХ РАСТВОРОВ	50
Лабораторная работа № 13. Спектрофотометрическое определение фотосинтетических пигментов в растениях	50
Лабораторная работа № 14. Спектрофотометрическое определение содержания флавоноидов в растениях	54
Лабораторная работа № 15. Спектрофотометрическое определение содержания антоцианов в растениях	58
Лабораторная работа № 16. Спектрофотометрическое определение интенсивности перекисного окисления липидов в растениях	60
Лабораторная работа № 17. Выделение и определение содержания растворимого и мембранносвязанного белка по Шактерле в растениях	63
Лабораторная работа № 18. Определение содержания SH-групп в молекулах белков в растениях спектрофотометрическим методом с реактивом Эллмана	66
Лабораторная работа № 19. Спектрофотометрическое определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях	69
Лабораторная работа № 20. Определение активности каталазы в растениях ..	71
ПРИЛОЖЕНИЯ	74
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	77

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие «Химические основы токсикологии (лабораторный практикум)» предназначено для студентов направлений подготовки 04.03.01, 04.04.01 «Химия», 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» и 05.03.06 «Экология» в качестве руководства по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Химические основы токсикологии». Данное учебно-методическое пособие является приложением к учебному пособию «Химические основы токсикологии: курс лекций». Курс лекций и лабораторный практикум логично связаны между собой и дополняют друг друга. Кроме того, что лабораторный практикум предназначен для изучения дисциплины «Химические основы токсикологии», он включает описание методик, которые возможно использовать и уже используются в научных исследованиях.

В данном учебно-методическом пособии представлены методики исследований по четырем разделам: исследование продуктов питания и фармпрепаратов, исследование токсикологических параметров бытовой химии (на примере синтетического моющего средства), химико-токсикологическое исследование предметов домашнего обихода, исследование почвы и воздуха. Предложены методики как химического и физико-химического анализа, так и биотестирования.

РАЗДЕЛ 1. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И ФАРМПРЕПАРАТОВ

Лабораторная работа № 1. Определение содержания нитратов в овощах¹

Цель занятия

Определение и оценка содержания нитратов в сезонных фруктах и овощах.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых неорганических анионов».
2. Краткое описание основных методов определения нитратного азота в различных объектах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Терка кухонная – 1 шт.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г второго класса точности – 1 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ – 33 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 см³ – 8 шт.

Колбы конические вместимостью 100 см³ – 33 шт.

Воронки диаметром 36 и 100 см – 16 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Чашки фарфоровые вместимостью 50 см³ – 15 шт.

Палочки стеклянные – 15 шт.

Установка для выпаривания (штатив с кольцом, горелка, тигельные щипцы) – 8 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 100 и 250 см³ – 8 шт.

Фильтры обеззоленные бумажные.

Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы спектрофотометрические с длиной оптимального пути 2 см – 3 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

Гидроксид натрия, раствор – 350 см³.

Калий азотнокислый, ч.д.а. или х.ч. – 1 г.

Кислота серная, ч.д.а., концентрированная – 200 см³.

Кислота соляная раствор $C(HCl) = 0,1$ моль/дм³ – 1 дм³.

¹ Разработано на основе (Скугорева, Фокина, 2010).

Аммиак водный, раствор $C(NH_3) = 3,0 \text{ моль/дм}^3 - 100 \text{ см}^3$.

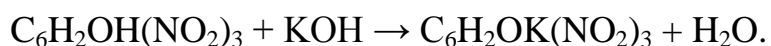
Кислота дисульфофеноловая – 0,5 г.

Вода дистиллированная.

Вата медицинская.

Принцип анализа

Метод основан на измерении интенсивности желтой окраски раствора, обусловленной образованием продуктов реакции между нитрат-ионами и дисульфофеноловой кислотой в щелочной среде:



Интенсивность окраски раствора зависит от концентрации нитрат-ионов.

Подготовка к анализу

1. Приготовление стандартных растворов

Основной стандартный раствор: 0,361 г нитрата калия растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 500 см^3 .

Рабочий стандартный раствор готовят разбавлением основного в 50 раз ($0,002 \text{ мг азота в } 1 \text{ см}^3 \text{ раствора}$), используют свежеприготовленным.

2. Построение градуировочного графика

2.1. Выпаривают $5, 10, 15, 20, 25 \text{ см}^3$ рабочего стандартного раствора нитрата калия, после выпаривания чашки охлаждают.

2.2. В чашки с сухим осадком добавляют по 1 см^3 раствора дисульфофеноловой кислоты, содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

2.3. После растирания раствор оставляют на 10 мин, затем в чашку наливают 15 см^3 дистиллированной воды.

2.4. Раствор доводят до щелочной реакции, прибавляя к нему раствор щелочи и постоянно перемешивая (конец приливания фиксируют или по лакмусовой бумаге, или по появлению устойчивой желтой окраски).

2.5. Окрашенные в желтый цвет растворы шкалы переносят в колбы вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки. Измерение оптической плотности проводят при $410\text{--}440 \text{ нм}$.

2.6. Готовят три серии стандартных растворов.

2.7. По полученным средним данным из трех серий стандартных растворов строят на миллиметровой бумаге размером $25 \times 25 \text{ см}$ градуировочный график. На оси абсцисс откладывают массовую концентрацию нитрата, мкг/см^3 , на оси ординат – соответствующие оптические плотности. Градуировочный

график должен проходить через начало координат. Допускается построение графика в программе *Excel*.

Ход анализа

1. 20 г исследуемого продукта помещают в коническую колбу, заливают 50 см³ воды и взбалтывают в течение 3-х мин.
2. Вытяжку отфильтровывают через плотный складчатый фильтр.
3. 25 см³ приготовленной вытяжки выпаривают в фарфоровой чашке.
4. В чашки с сухим осадком добавляют по 1 см³ раствора дисульфифеновой кислоты, содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой.
5. После перемешивания раствор оставляют на 10 мин, затем в чашку наливают 15 см³ дистиллированной воды.
6. Кислотность раствора доводят до уровня щелочной реакции, прибавляя раствор щелочи и постоянно перемешивая (конец приливания фиксируют лакмусовой бумагой или по появлению устойчивой желтой окраски).
7. Окрашенные в желтый цвет растворы переносят в мерные колбы вместимостью 100 см³ и доводят водой до метки.
8. Измеряют интенсивность окраски на спектрофотометре при длине волны 410–440 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 2 см в отношении раствора сравнения.
9. Полученные данные по содержанию нитратов в овощах и фруктах сравнивают с предельно допустимыми концентрациями (Приложение: таблица 1) и делают выводы.

Отчет

Отчет по проделанной лабораторной работе включает:

- 1) описание основных этапов анализа;
- 2) представление статистической обработки результатов;
- 3) краткое обсуждение результатов (сравнение с нормативными значениями);
- 4) краткое описание качественных реакций на нитрат-ионы.

Лабораторная работа № 2.

Определение содержания нитритов в колбасной продукции²

Цель занятия

Определение и оценка уровня содержания нитритов в некоторых видах колбасной продукции.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых неорганических анионов».

2. Краткое описание основных методов определения нитритного азота в различных объектах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Мясорубка бытовая или электрическая бытовая с диаметром отверстий решетки от 3 до 4 мм – 1 шт.

Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания 200 г, второго класса точности – 1 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Баня водяная – 4 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ – 33 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 см³ – 8 шт.

Колбы конические вместимостью 100 см³ – 33 шт.

Воронки диаметром 36 и 100 см – 16 шт.

Цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 100 и 250 см³ – 8 шт.

Фильтры обеззоленные бумажные.

Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы спектрофотометрические с длиной оптимального пути 2 см – 3 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

Кислота уксусная, раствор (CH₃COOH) = 2,0 моль/дм³ – 350 см³.

Нитрит натрия, ч.д.а. или х.ч. – 1 г.

Кислота соляная, ч.д.а., плотностью 1,19 г/см³ – 200 см³.

Кислота соляная, раствор C(HCl) = 0,1 моль/дм³ – 1 дм³.

Аммиак водный, раствор C(NH₃) = 3,0 моль/дм³ – 100 см³.

Кислота сульфаниловая безводная, ч.д.а. или х.ч. α-нафтиламин – по 0,5 г.

Натрия гидроксид, раствор C(NaOH) = 0,1 моль/дм³ – 1 дм³.

Сульфат цинка, раствор 4,5 г/дм³ – 1,5 дм³.

Пыль цинковая – 5 г.

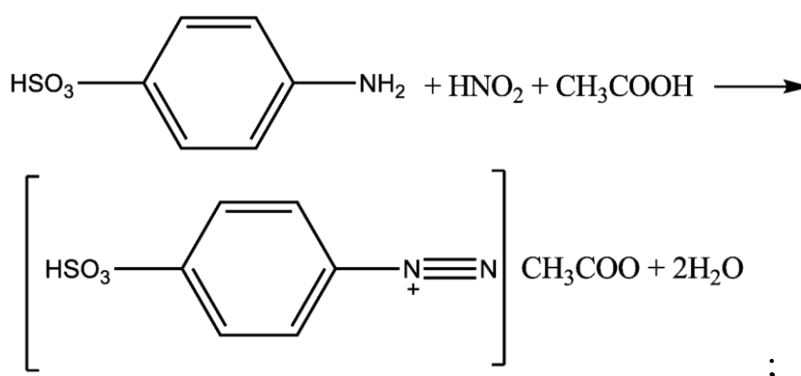
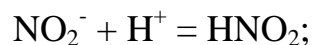
² Разработано на основе (ГОСТ 8558.1-78).

Вода дистиллированная.

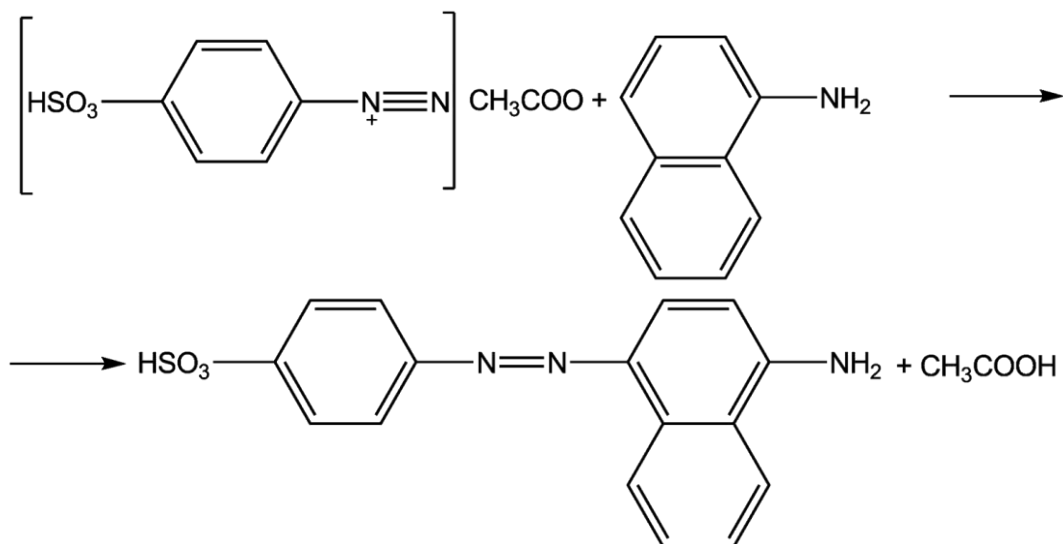
Вата медицинская.

Принцип анализа

О концентрации нитрит-ионов судят по интенсивности ярко-розовой окраски раствора, обусловленной образованием азокрасителя в результате реакции между компонентами реактива Грисса и нитрит-ионами:



соль диазония



азокраситель, ярко-розовый

Подготовка к анализу

1. Растворы для проведения цветной реакции

Раствор 1: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 см³ раствора уксусной кислоты.

Раствор 2: 0,2 г α-нафтиламина кипятят с 20 см³ воды, раствор фильтруют

и прибавляют к фильтрату 180 см^3 раствора уксусной кислоты. Раствор хранят в темной склянке.

Реактив Грисса: смешивают равные объемы растворов 1 и 2. В случае появления при смешивании растворов розовой окраски добавляют цинковую пыль, взбалтывают и фильтруют. Реактив Грисса готовят непосредственно перед анализом.

2. Стандартные растворы нитрита натрия

Для приготовления основного раствора берут навеску нитрита натрия, содержащую 1 г основного вещества.

Навеску переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки. Для приготовления рабочего раствора 10 см^3 основного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3 и доводят водой до метки. Для приготовления образцового раствора 5 см^3 рабочего раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят водой до метки. 1 см^3 образцового раствора содержит 0,001 мг (или 1 мкг) нитрита натрия.

3. Построение градуировочного графика.

3.1. В шесть мерных колб вместимостью 100 см^3 пипеткой вносят рабочий раствор: 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 см^3 . В первую колбу рабочий раствор не вносят, используя ее как контрольную.

3.2. В каждую колбу добавляют 5 см^3 раствора аммиака, 10 см^3 раствора соляной кислоты, доводят водой до метки и перемешивают. В конические колбы вместимостью 100 см^3 пипеткой переносят по 15 см^3 приготовленных растворов, 15 см^3 реактива Грисса и через 15 мин выдержки при комнатной температуре измеряют интенсивность розовой окраски на спектрофотометре при длине волны 538 нм или фотоэлектроколориметре с зеленым светофильтром в кювете толщиной поглощающего свет слоя 2 см в отношении раствора сравнения.

3.3. Готовят три серии стандартных растворов.

3.4. По полученным средним данным из трех серий стандартных растворов строят на миллиметровой бумаге размером $25 \times 25\text{ см}$ градуировочный график. На оси абсцисс откладывают массовую концентрацию нитрита, мкг/ см^3 , на оси ординат – соответствующие оптические плотности. Градуировочный график должен проходить через начало координат. Допускается построение графика в программе *Excel*.

Ход анализа

1. 20 г пробы, подготовленной к анализу, взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и помещают в химический стакан. Заливают 35–40 см^3 дистиллированной воды, нагретой до $(55 \pm 2)^\circ\text{C}$, и настаивают, периодически перемешивая, в течение 10 мин.

2. Вытяжку фильтруют через ватный фильтр в мерную колбу вместимо-

стью 250 см³. Навеску несколько раз промывают и переносят на фильтр, где еще промывают водой, затем раствор охлаждают и доводят водой до метки.

Примечание: для приготовления вытяжки из сырокопченых продуктов из свинины, баранины, говядины и сырокопченых колбас навеску 20 г заливают 200 см³ предварительно отмеренной и нагретой до (55 ± 2) °С дистиллированной воды и настаивают, периодически помешивая, в течение 30 мин. Затем вытяжку фильтруют через ватный фильтр, не перенося осадка на фильтр.

3. 20 см³ вытяжки помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 10 см³ раствора гидроксида натрия и 40 см³ раствора сульфата цинка для осаждения белков. Смесь в колбе нагревают 7 мин на кипящей водяной бане, после чего охлаждают, доводят до метки водой, перемешивают и фильтруют через обеззоленный бумажный фильтр.

4. Параллельно проводят контрольный анализ на реактивы, помещая в мерную колбу вместимостью 100 см³ вместо 20 см³ вытяжки 20 см³ дистиллированной воды.

5. В коническую колбу вместимостью 100 см³ помещают 5 см³ прозрачного фильтрата, полученного после осаждения белков, 1 см³ раствора аммиака, 2 см³ раствора соляной кислоты, 2 см³ дистиллированной воды и, для усиления окраски, 5 см³ образцового раствора нитрита, содержащего 1 мкг в 1 см³.

6. Затем в колбу приливают 15 см³ реактива Грисса и через 15 мин измеряют интенсивность окраски на спектрофотометре при длине волны 538 нм или на фотоколориметре с зеленым светофильтром (№ 6) в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 2 см в отношении раствора сравнения.

Обработка результатов анализа

Массовую долю нитрита (X) в процентах вычисляют по формуле 1:

$$X = \frac{M \times 250 \times 100 \times 100 \times 30}{m \times 20 \times 5 \times 10^6}, \quad (1)$$

где M – массовая концентрация нитрита натрия, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

m – масса навески продукта, г;

10⁶ – коэффициент перевода мкг в граммы.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений и вычисляют с точностью до 0,0001 %. Предел возможных значений относительной погрешности измерений – 2 % при вероятности 0,95. Сравнивают полученный результат с нормативным значением (Приложение: таблица 3).

Отчет

Отчет по проделанной лабораторной работе включает:

- 1) описание основных этапов анализа;
- 2) представление статистической обработки результатов;
- 3) краткое обсуждение результатов (сравнение с нормативными значениями);
- 4) краткое описание качественных реакций на нитрит-ионы.

Лабораторная работа № 3.

Определение содержания хлоридов в колбасной продукции³

Цель занятия

Определение и оценка уровня содержания хлоридов в некоторых видах колбасной продукции.

В данной работе хлориды необходимо определить двумя методами (метод Мора и Фольгарда) и установить наличие или отсутствие статистически достоверной разницы между массивами данных, полученных с использованием различных методик.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых неорганических анионов».

2. Краткое описание основных методов определения хлоридов в различных объектах.

Часть 1. Определение хлорида натрия по методу Мора

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Мясорубка бытовая – 1 шт.

Баня водяная – 4 шт.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г и с допустимой погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г – 1 шт.

Термометр – 4 шт.

Бюретка вместимостью 25 см³ – 8 шт.

Цилиндр вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 2, 5, 10 см³ – 8 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 250 см³ – 8 шт.

Колба коническая вместимостью 100 см³ – 24 шт.

Колба мерная вместимостью 1000 см³.

Бумага фильтровальная.

Вода дистиллированная.

Нитрат серебра, раствор $C(\text{AgNO}_3) = 0,05$ моль/дм³ – 1 дм³.

Хромат калия, раствор 100 г/дм³.

Принцип анализа

О количестве хлорид-ионов судят по количеству раствора нитрата серебра, затраченного на титрование в присутствии хромата калия.

³ Разработано на основе (ГОСТ 9957-73).

Ход анализа

1. Пробы колбасных изделий освобождают от оболочки, а с соленого бекона и продуктов из свинины, выработанных в шкуре, снимают шкурку. Пробы два раза измельчают на мясорубке с диаметром отверстий решетки 3–4,5 мм и тщательно перемешивают. Пробу сырокопченых колбас дважды измельчают на мясорубке с диаметром отверстий решетки 3–4,5 мм или нарезают острым ножом на круговые ломтики толщиной не более 1 мм, после чего их режут на полоски и рубят ножом так, чтобы размер частиц пробы не превышал 1 мм, затем тщательно перемешивают. Пробы паштетов, студней и зельцев измельчают на мясорубке один раз и тщательно перемешивают.

2. 5 г измельченной средней пробы взвешивают в химическом стакане с погрешностью $\pm 0,01$ г и добавляют 100 см^3 дистиллированной воды. Через 40 мин настаивания (при периодическом перемешивании стеклянной палочкой) водную вытяжку фильтруют через бумажный фильтр.

3. $5\text{--}10 \text{ см}^3$ фильтрата пипеткой переносят в коническую колбу и титруют из бюретки $0,05 \text{ моль/дм}^3$ раствором нитрата серебра в присутствии $0,5 \text{ см}^3$ раствора хромата калия до появления оранжевого окрашивания.

Примечание: навеску полукопченых, варено-копченых, копченых колбас, соленого бекона, продуктов из свинины, баранины и говядины (сырокопченых, копчено-вареных, копчено-запеченных, запеченных и жареных) нагревают в стакане на водяной бане до 40°C , выдерживают при этой температуре в течение 45 мин (при периодическом перемешивании стеклянной палочкой) и фильтруют через бумажный фильтр. После охлаждения до комнатной температуры $5\text{--}10 \text{ см}^3$ фильтрата титруют $0,05 \text{ моль/дм}^3$ раствором нитрата серебра в присутствии $0,5 \text{ см}^3$ раствора хромата калия до оранжевого окрашивания.

Обработка результатов анализа

Массовую долю хлорида натрия (X), %, вычисляют по формуле 2:

$$X = \frac{0,00292 \times K \times V \times 100 \times 100}{v_1 \times m}, \quad (2)$$

где $0,00292$ – количество хлорида натрия, эквивалентное 1 см^3 $0,05 \text{ моль/дм}^3$ раствора нитрата серебра, г;

K – поправка к титру $0,05 \text{ моль/дм}^3$ раствора нитрата серебра;

V – количество $0,05 \text{ моль/дм}^3$ раствора нитрата серебра, израсходованное на титрование испытуемого раствора, см^3 ;

v_1 – количество водной вытяжки, взятое для титрования, см^3 ;

m – навеска, г.

Расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 0,1 %. За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Часть 2. Определение хлорида натрия по Фольгарду с применением роданида калия

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Мясорубка бытовая – 1 шт.

Баня водяная – 4 шт.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г и с допустимой погрешностью взвешивания $\pm 0,01$ г – 1 шт.

Термометр – 4 шт.

Бюретка вместимостью 25 см³ – 8 шт.

Мерный цилиндр вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 2, 5, 10 см³ – 8 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 250 см³ – 8 шт.

Колба коническая вместимостью 250 см³ – 24 шт.

Колба мерная вместимостью 1000 см³.

Бумага фильтровальная.

Вода дистиллированная.

Нитрат серебра, раствор $C(\text{AgNO}_3) = 0,05$ моль/дм³ – 1 дм³.

Роданид калия, раствор $C(\text{KSCN}) = 0,1$ моль/дм³ (титр раствора устанавливают по 0,1 моль/дм³ раствора AgNO_3 с использованием в качестве индикатора раствора железоаммонийных квасцов) – 1 дм³.

Ацетат цинка – 100 г.

Квасцы железоаммонийные, насыщенный раствор, подкисленный концентрированной азотной кислотой (индикатор) – 100 см³.

Кислота азотная, раствор $C(\text{HNO}_3) = 4$ моль/дм³ – 250 см³.

Кислота уксусная – 250 см³.

Нитробензол – 100 см³.

Гексацианоферрат(III) калия – 200 г.

Принцип анализа

Метод Фольгарда основан на освобождении испытуемого образца от белковых веществ и оттитровывании избытка добавленного раствора азотнокислого серебра раствором роданида калия в присутствии железоаммонийных квасцов как индикатора.

Подготовка к анализу

Приготовление реактива Карреза I: 106 г гексацианоферрата(III) калия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 дм³ (хранят в склянке из темного стекла не более 10 суток); реактив Карреза II: 238 г ацетата цинка и 30 см³ ледяной уксусной кислоты растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 дм³ (хранят не более 10 суток).

Ход анализа

1. 10 г измельченной средней пробы, взвешенной с точностью до $\pm 0,01$ г, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³ и добавляют небольшими порциями около 100 см³ горячей дистиллированной воды.

2. Колбу выдерживают на кипящей водяной бане 15 мин.

3. После охлаждения колбы с содержимым до комнатной температуры в нее последовательно добавляют для осаждения белков 10 см³ реактива Карреза I и 10 см³ реактива Карреза II, встряхивая колбу после добавления каждого реактива.

4. Затем в колбу доливают дистиллированную воду до метки, содержимое тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

5. 20 см³ фильтрата пипеткой переносят в коническую колбу вместимостью 200–250 см³, добавляют 5 см³ 4 моль/дм³ раствора азотной кислоты, 2 см³ раствора железоаммонийных квасцов, 20 см³ 0,1 моль/дм³ раствора нитрата серебра и 3 см³ нитробензола (для коагуляции осадка).

6. Содержимое колбы титруют 0,1 моль/дм³ раствором роданида калия при энергичном встряхивании до появления не исчезающей красноватой окраски раствора.

Обработка результатов анализа

Массовую долю хлорида натрия (X), %, вычисляют по формуле 3:

$$X = \frac{0,00584 \times (20 \times K_1 - V \times K_2) \times 200 \times 100}{m \times 20} = \frac{5,84 \times (20 \times K_1 - V \times K_2)}{m}, \quad (3)$$

где 0,00584 – количество хлорида натрия, эквивалентное 1 см³ 0,1 моль/дм³ раствора AgNO₃, г;

K₁ – поправка к титру 0,1 моль/дм³ раствора AgNO₃ с точностью до 0,0001 моль/дм³;

V – количество KSCN, израсходованное на титрование, см³;

K₂ – поправка к титру 0,1 моль/дм³ раствора KSCN;

m – навеска, г;

200 – разбавление навески, см³;

20 – количество титруемого раствора, см³.

Вычисление производят с точностью до 0,01 %. Расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 0,1 %. За окончательный результат принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений. Сравнивают полученный результат с нормативным значением (Приложение: таблица 2).

Отчет

Отчет по проделанной работе включает:

- 1) описание хода работы;
- 2) статистическую обработку результатов (результат, получаемый каждым методом и их сравнение);
- 3) оценка уровня содержания хлоридов в исследуемых образцах относительно нормативных значений.

Лабораторная работа № 4.
Определение содержания действующего вещества
в фармпрепарате и расчет максимального количества
фармпрепарата для приема взрослыми и детьми⁴

Цель занятия

Формирование умения студентов, используя результаты химического анализа, определять допустимое суточное количество фармпрепарата для приема взрослыми и детьми.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых лекарственных препаратов».
2. Знать суть основных токсикологических понятий: летальная доза, минимально токсическая доза, среднесмертельная доза, пороговая доза и т. п.
3. Краткое описание основных методов изучения токсичности лекарственных препаратов.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 2 шт.

Весы лабораторные – 2 шт.

Кристаллизатор – 4 шт.

Термометр – 4 шт.

Колба коническая вместимостью 100 см³ – 24 шт.

Мерный цилиндр вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Установка для титрования – 8 шт.

Аспирин – 8 упаковок.

Гидроксид натрия, раствор 0,1 н – 1 дм³.

Спирт этиловый – 300 см³.

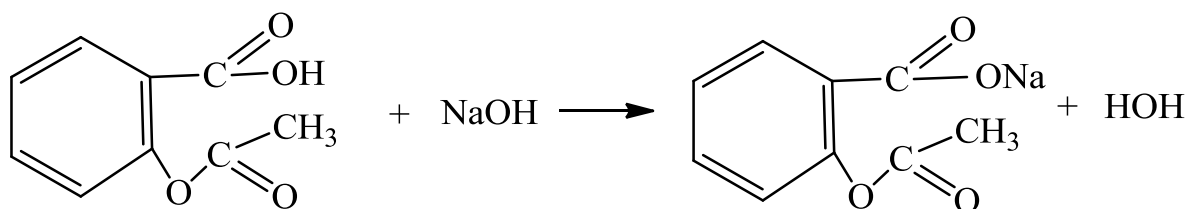
Индикатор фенолфталеин – 100 см³.

Лед колотый – 2 кг.

Принцип анализа

О количестве ацетилсалициловой кислоты судят по количеству щелочи, пошедшей на титрование раствора препарата (алкалиметрия):

⁴ Разработано на основе (ФС.2.1.0006.15).



Ход анализа

1. Около 0,5 г препарата (точная навеска) растворяют в 10 см³ нейтрализованного по фенолфталеину (5–6 капель) и охлажденного до 8–10 °С спирта.
2. Раствор титруют с тем же индикатором 0,1 н раствором едкого натра до розового окрашивания.

Обработка результатов анализа

1 см³ 0,1 н раствора гидроксида натрия соответствует 0,01802 г С₉Н₈О₄, которой в препарате должно быть не менее 99,5 %.

Рассчитывают количество таблеток, которые возможно принять взрослому (или ребенку) за один прием и в сутки без отрицательных последствий препарата на здоровье. Учитывают, что отравление аспирином происходит, если принять 100 мг ацетилсалициловой кислоты на 1 кг массы тела в сутки. Смертельная доза 500 и более мг/кг в сутки. Летальная (способная привести к смерти) доза ацетилсалициловой кислоты для взрослых – более 10 г, для малышей – более 3 г.

Отчет

Отчет о проделанной работе включает:

- 1) описание принципа и хода проведенного исследования;
- 2) статистически обработанные результаты исследования;
- 3) выводы.

Лабораторная работа № 5.

Определение токсичности различных соединений, применяемых в фармации, методом компьютерного моделирования

Зайдите на страницу российского программного продукта с онлайн-доступом на сайте <http://pharmaexpert.ru/GUSAR/acutoxpredict.html>. Необходимо нарисовать структуру вещества прямо на странице (на компьютере должно быть установлено *java* приложение) или загрузить в виде *mol* файла, созданного в любой программе для рисования химических структур. После этого нажать кнопку «*Predict*». С помощью данной программы возможно предсказание показателя ЛД₅₀ для крыс при 4-х способах введения.

Задание для самостоятельного выполнения на занятии

1. Выберите произвольно одно химическое соединение.
2. Найдите его токсичность методом компьютерного моделирования и сопоставьте с литературными данными.
3. Проведите эксперимент: вносите изменения в структуру уже выбранного соединения, проследите изменения токсичности, которые при этом происходят. Дайте объяснения происходящим изменениям.
4. Составьте перечень программ (2–3 шт.), которые можно использовать для изучения токсичности. Представьте их краткую аннотацию.

РАЗДЕЛ 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БЫТОВОЙ ХИМИИ (НА ПРИМЕРЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО МОЮЩЕГО СРЕДСТВА)

Лабораторная работа № 6. Определение содержания фосфатов в синтетических моющих средствах⁵

Цель занятия

Определение и оценка уровня содержания фосфатов в некоторых марках синтетических моющих средств (СМС).

В данной работе учащиеся определяют содержание фосфатов и рассчитывают необходимую степень разбавления водой, рекомендуемую для потребителей с экологической точки зрения.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых наиболее распространенных органических веществ».
2. Краткое описание основных методов определения фосфатов в различных объектах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы спектрофотометрические с длиной оптимального пути 30 мм – 3 шт.

Мерная колба вместимостью 1000 см³ – 2 шт.

Термометр – 4 шт.

Мерная колба вместимостью 500 см³ – 4 шт.

Мерная колба вместимостью 100 см³ – 12 шт.

Фильтровальная бумага – синяя лента.

Фосфат калия однозамещенный (предварительно высушенный в сушильном шкафу в течение 2 ч при $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$).

Хлороформ или четыреххлористый углерод.

Молибдат аммония.

Ванадат аммония.

Кислота азотная, концентрированная – 250 см³.

Принцип анализа

Сущность метода состоит в гидролизе фосфорнокислых солей до ортофосфорной кислоты, получении окрашенного комплексного соединения этой

⁵ Разработано на основе (ГОСТ 22567.7-87).

кислоты с молибдат-ванадатом аммония и определении оптической плотности полученного окрашенного раствора.

Подготовка к анализу

1. Приготовление стандартного раствора

Для приготовления стандартного раствора фосфорнокислый калий предварительно высушивают в сушильном шкафу в течение 2 ч при $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$. После этого берут навеску высушенного фосфорнокислого калия массой 0,9584 г, записывая результат взвешивания в граммах с точностью до четвертого десятичного знака, помещают ее в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и растворяют в небольшом количестве воды. Затем прибавляют 2 см³ хлороформа и доводят объем раствора водой до метки (1 см³ раствора содержит 0,5 мг Р₂О₅). Раствор хранят в полиэтиленовой посуде.

2. Приготовление раствора молибдат-ванадата аммония

Навеску молибдата аммония массой $(20,00 \pm 0,05)$ г помещают в химический стакан и растворяют в 200 см³ воды, нагретой до 50 °С. Полученный раствор охлаждают до комнатной температуры. В другой стакан помещают навеску ванадата аммония массой $(1,00 \pm 0,05)$ г, растворяют в 100 см³ воды и добавляют пипеткой 10 см³ азотной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 см³ приливают 500 см³ воды, 130 см³ азотной кислоты, затем добавляют при перемешивании растворы молибдата аммония и ванадата аммония. Полученный раствор тщательно перемешивают и доводят водой до метки. Раствор молибдат-ванадата аммония годен не более 15 суток.

3. Построение градуировочного графика. Готовят растворы сравнения. В мерные колбы вместимостью 100 см³ пипеткой вместимостью 5 см³ наливают 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 см³ стандартного раствора. В каждую колбу добавляют воды до 50 см³ и пипеткой или бюреткой добавляют 25 см³ раствора молибдат-ванадата аммония, доводят объем раствора до метки водой, тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 мин. Параллельно готовят контрольный раствор, не содержащий Р₂О₅. В мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают 50 см³ воды, пипеткой или бюреткой добавляют 25 см³ раствора молибдат-ванадата аммония и доводят объем водой до метки. Оптическую плотность растворов сравнения измеряют на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром при длине волны 413–453 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 30 мм. По полученным данным строят градуировочный график. При использовании вместо фотоэлектроколориметра типа ФЭК-56 М прибора с другими аналогичными метрологическими характеристиками измерение следует проводить при длине волны, при которой наблюдается максимальное светопоглощение. Градуировочный график проверяется по мере приготовления нового раствора молибдат-ванадата аммония.

Ход анализа

1. Среднюю пробу порошкообразного моющего средства растирают в ступке.
2. Навеску растертого порошка массой $(2,0 \pm 0,5)$ г растворяют в 100 см^3 , нагретой до кипения воде, охлаждают, переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3 , доводят объем раствора до метки водой и тщательно перемешивают.
3. Отбирают пипеткой 20 см^3 раствора в колбу, добавляют 60 см^3 воды и 15 см^3 азотной кислоты и кипятят 30 мин. Объем раствора поддерживают постоянным, добавляя воду.
4. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3 и разбавляют водой до метки.
5. Часть раствора фильтруют.
6. В мерную колбу вместимостью 100 см^3 отбирают раствор, полученный после фильтрования, объем (X) которого определяют по таблице 1 в зависимости от массовой доли фосфорнокислых солей в синтетическом моющем средстве, добавляют $20\text{--}30 \text{ см}^3$ воды и пипеткой или бюреткой 25 см^3 раствора молибдат-ванадата аммония. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.
7. Через 10 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора по отношению к контрольному образцу.

Таблица 1

Определение объема исследуемого раствора, необходимого для анализа

Массовая доля фосфорнокислых солей в пересчете на P_2O_5 в синтетическом моющем средстве, %	Объем раствора, см^3	
	после фильтрования	для измерения оптической плотности
От 0,7 до 3,0 включительно	25	25
Свыше 3,0 до 12,0 включительно	20	10
Свыше 12,0 до 25,0 включительно	10	10

Обработка результатов анализа

Массовую долю фосфорнокислых солей в пересчете на P_2O_5 , в процентах вычисляют по формуле 4:

$$X = \frac{C \times 200 \times 500 \times 100}{(m_1 - m_2) \times 20 \times 1000 \times V_1}, \quad (4)$$

где С – массовая доля фосфорнокислых солей в пересчете на P_2O_5 , найденная по градуировочному графику, мг;

m_1 – масса колбы (стакана) с навеской синтетического моющего средства, г;

m_2 – масса колбы (стакана), г;

V_1 – объем раствора, отобранный после фильтрования, см³.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должно превышать 0,2 %.

Отчет

Отчет по проделанной работе включает:

- 1) краткое описание хода работы;
- 2) статистическую обработку результатов;
- 3) оценку содержания фосфатов в СМС и рекомендуемую степень разбавления перед сливом в канализацию;
- 4) краткое описание качественных реакций на фосфат-ионы.

Лабораторная работа № 7.
Определение содержания активного кислорода
в синтетических моющих средствах⁶

Цель занятия

Определение и оценка уровня содержания активного кислорода в некоторых марках синтетических моющих средств (СМС).

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых наиболее распространенных органических веществ».
2. Краткое описание основных методов определения активного кислорода в различных объектах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Мешалка – 8 шт.

Мерная колба вместимостью 1000 см³ – 2 шт.

Коническая колба вместимостью 500 см³ – 4 шт.

Стеклянная палочка – 8 шт.

Колба мерная для приготовления раствора из фиксанала, воронка, боек – 1 шт.

Октадекагидрат Al₂(SO₄)₃ сульфата алюминия × 8 H₂O – 100 г.

Раствор серной кислоты, содержащий висмут и марганец. Растворяют 2 г висмута нитрата пентагидрата Bi(NO₃)₃ × 5 H₂O и 4 г сульфата марганца моногидрата MnSO₄ × H₂O, или эквивалентное число тетра- или пентагидрата MnSO₄ × 4 H₂O, или MnSO₄ × 5 H₂O в 1000 см³ 5 н раствора серной кислоты.

Раствор серной кислоты, содержащий алюминий, висмут и марганец, при необходимости, растворяют 50 г сульфата алюминия, 5 г нитрата висмута пентагидрата и 5 г сульфата марганца в 1000 см³ 5 н раствора серной кислоты.

Перманганат калия KMnO₄, свежеприготовленный титрованный 0,1 н раствор.

Фиксанал оксалата натрия.

Принцип анализа

Совместное восстановление соли перкислоты и перманганат калия в кислотном растворе с освобождением кислорода.

Ход анализа

1. Анализ начинают сразу же после приготовления пробы!
2. Взвешивают 10 г лабораторной пробы с погрешностью до 0,01 г.

⁶ Разработано на основе (ГОСТ 22567.10-93).

3. Помещают пробу в химический стакан вместимостью 2000 см³. Заполняют мерную колбу до метки водой температурой 36–40 °С и приливают воду к пробе, давая ей возможность стекать со стенок колбы в течение нескольких секунд. Энергично перемешивают с помощью мешалки в течение 3 мин до растворения пробы, за исключением небольшого количества нерастворимых силикатов и др.

4. Во время растворения наливают в коническую колбу 50 см³ раствора серной кислоты и добавляют по капле, постоянно перемешивая, раствор перманганата калия до появления устойчивой бледно-розовой окраски.

5. С помощью пипетки набирают 100 см³ раствора и переносят в коническую колбу. Титруют раствором перманганата калия до появления бледно-розовой окраски, устойчивой в течение не менее 15 с. Если конечная точка выражена нечетко, повторяют определение в присутствии 1 г сульфата алюминия или используя 20 см³ раствора серной кислоты.

Обработка результатов анализа

Содержание активного кислорода в стиральном порошке (X), % от массы, определяют по формуле 5:

$$X = \frac{V \times T \times 8,0}{m}, \quad (5)$$

где V – объем титрованного раствора перманганата калия, используемого при определении, см³;

T – точная нормальность титрованного раствора перманганата калия, используемого при определении;

m – масса пробы для анализа, г.

Максимальная разница между результатами двух определений, проведенных последовательно на данном продукте одним и тем же лицом и с использованием одного и того же оборудования, не должна превышать 1,3 % среднего значения, найденного для содержания активного кислорода около 2 %. Максимальная разность результатов, полученных для одной пробы в двух различных лабораториях, не должна превышать 5 % среднего значения, найденного для содержания активного кислорода около 2 %.

Отчет

Отчет по проделанной работе включает:

- 1) краткое описание хода работы;
- 2) статистическую обработку результатов;
- 3) оценку содержания активного кислорода в СМС различных марок.

Далее студентам предлагается определить степень токсичности растворов СМС различных марок и различных степеней разбавления водой. Рассчитать коэффициент корреляции между содержанием в СМС фосфатов, активного кислорода и степенью токсичности для различных групп организмов. Установить степень разбавления СМС водой, безопасную, судя по степени токсичности.

Лабораторная работа № 8.
Использование методов биотестирования в оценке токсичности
растворов синтетических моющих средств

Цель занятия

Оценка степени токсичности растворов СМС различных марок с различной концентрацией моющего вещества в растворе.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых наиболее распространённых органических веществ».
2. Краткое описание основных методов определения токсичности веществ.

Часть 1. Определение токсичности растворов синтетических моющих средств тетразолю-топографическим методом (по жизнеспособности цианобактерий)⁷

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 1 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 – 8 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 – 8 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

СМС – 100 г.

Вода дистиллированная.

Культура цианобактерий *Nostoc paludosum* – 100 см³ с титром не менее 1×10^9 кл/см³.

Трифенилтетразолия хлорид – 1 г.

Центрифуга с пробирками для центрифугирования – 1 шт.

Гомогенизатор – 1 шт.

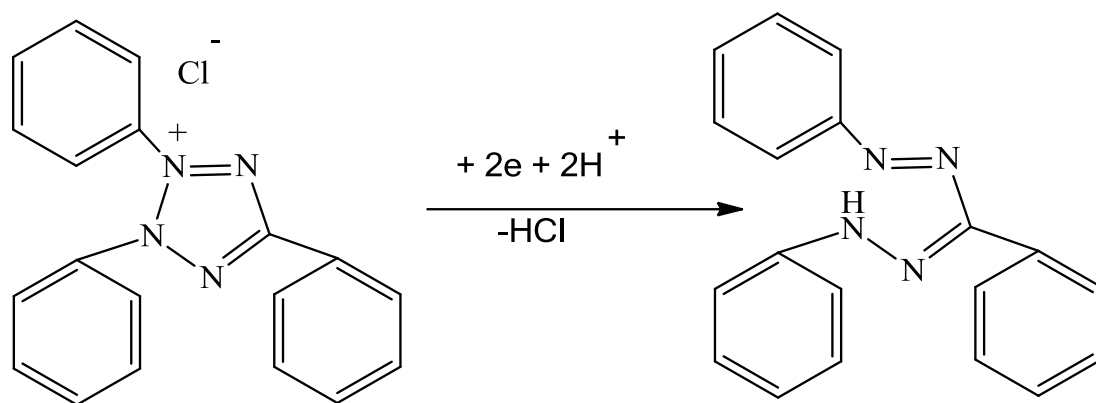
Микроскоп с возможностью увеличения не менее чем в 900 раз – минимум 2 шт.

Принцип метода

Для количественного определения активности дегидрогеназной реакции в качестве субстрата используют бесцветные соли тетразолия, в частности 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), имеющий красную окраску. По интенсивности окраски колориметрическим способом измеряют количество формаза.

⁷ Разработано на основе (Домрачева и др., 2008).

Восстановление ТТХ происходит по схеме:



2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ)

формаза

Ход анализа

1. Подготовительный этап сводится к наращиванию биомассы цианобактерии (ЦБ) путем внесения инокулята в стерильную питательную среду с последующей экспозицией в люминостате.

2. Для работы с токсикантами образующуюся пленку ЦБ разбивают на гомогенизаторе *Homogenizer type 302* (9000 оборотов в минуту), так как в жидкой среде все испытанные штаммы по мере роста приобретают текстуру из псевдоткани, состоящую из переплетенных трихомов и нитей. Работа с ненарушенной биопленкой очень затруднена, так как доступ токсикантов к отдельным клеткам неравномерный, и при микроскопировании мазков невозможен просмотр препарата в одной плоскости. Режим гомогенизации должен быть выбран таким, чтобы не происходило разрушения перидерма трихомов, достигался выход отдельных нитей, но не повреждались отдельные клетки.

3. В приготовленной суспензии подсчитывают титр клеток и в случае необходимости разбавляют дистиллированной водой до нужной концентрации. Полученную однородную суспензию подвергают центрифугированию на центрифуге *High speed centrifuge 310* в том объеме культуры, который в дальнейшем используется для закладки одного варианта опыта.

4. Среду, в которой выращивали цианобактерии, сливают после центрифугирования, и концентрат клеток помещают в раствор токсиканта (модельный раствор, приготовленный разведением СМС в воде в пропорции, рекомендованной для стирки) в ту емкость (колбы или пенициллиновые пузырьки), в которой проводят дальнейшую экспозицию с токсикантом. Берут для исследования токсичности растворы СМС с различным разведением, для того, чтобы выявить нетоксичную концентрацию.

5. Экспозицию культур на свету проводят в течение нескольких часов, затем несколько раз проводят отмывку культуры ЦБ от токсиканта путем цен-

трифугирования или дистиллированной водой, или средой Громова (в зависимости от цели опыта). В оставшуюся после промывания массу ЦБ добавляют 0,075 % раствор ТТХ и выдерживают 3 часа.

6. Готовят мазки на предметных стеклах (3-х кратная повторность для каждого варианта) и с помощью иммерсионного микроскопа просчитывают не менее 500 клеток в каждой повторности, дифференцируя клетки с ярко-красными кристаллами формазана внутри (считая их жизнеспособными с выраженной дегидрогеназной активностью) и клетки без кристаллов (считая их неактивными и нежизнеспособными).

Обработка результатов исследования

Долю клеток с кристаллами формазана (X), % рассчитывают по формуле 6:

$$X = \frac{N_{\text{кр}} \times 100}{N_{\text{общ}}}, \quad (6)$$

где $N_{\text{кр}}$ – количество клеток цианобактерий с кристаллами;

$N_{\text{общ}}$ – общее количество клеток.

За токсичность принимается результат, если доля клеток с кристаллами менее 50 %.

У исследуемых растворов СМС изучают токсичность не только с использованием ЦБ, но и с помощью ракообразных *Daphnia magna* (часть 2).

Часть 2. Биотестирование растворов моющих средств по гибели *Daphnia magna*⁸

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 1 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 см³ – 8 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

Трубки стеклянные – 8 шт.

СМС – 100 г.

Вода дистиллированная.

Культура *Daphnia magna* – 120 шт.

Сачок из мелкоячеистого материала.

Принцип исследования

Методика основана на оценке уровня смертности молодых особей популяции (до 24 часов). Опыт по определению токсичности по гибели рачков даф-

⁸ Разработано на основе (ПНД Ф 14.1:2:4.12 06 (16.1:2.3.3.9 06).

ний продолжается 96 часов (ФР.1.39.2007.03222, 2001). При наличии устройства экспонирования рачков, непрерывно перемешивающих пробы, эксперимент можно сократить до двух суток (ПНД Ф 14.1:2:4.12-06, 2010).

Подготовка к исследованию

Подготовка пробы согласно методике: получение водных вытяжек из твердых образцов, фильтрация вод и полученных водных вытяжек, приготовление необходимых разбавлений, измерение температуры, pH и содержания растворенного кислорода в контрольном и опытных вариантах.

Ход исследования

1. Исследуемые образцы наливают в стеклянные сосуды по 100 см³ (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом отфильтрованной воды из емкостей, где культивируются дафнии (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

2. Высаживают рачков: при биотестировании используют молодь дафний в возрасте 6–24 часов. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 дафний. Их быстро переносят стеклянной трубкой диаметром 5–7 мм на сачок из мелкочаеистого материала («мельничный газ»), дают стечь жидкости, чтобы не смешивать растворы разного состава, а затем переносят дафний в тестируемую среду, погружая туда сачок. Тщательно пересчитывают особей, определяют, не пострадали ли они при пересадке. Продолжительность биотестирования составляет 96 часов. Дафний ежедневно кормят и пересчитывают.

3. В конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считают дафний, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже, чем через 15 сек после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими. После подсчета дафний в контроле и опыте в каждом сосуде определяют концентрацию растворенного кислорода, pH и температуру.

Обработка результатов исследования

На основании результатов трех параллельных определений количества живых дафний в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых дафний во всех вариантах.

Рассчитывают (в %) количество погибших дафний в опыте по отношению к контролю по формуле 7:

$$A = \frac{(X_k - X_t) \times 100}{X_k}, \quad (7)$$

где X_k – количество выживших дафний в контроле;

X_t – количество выживших дафний в тестируемой среде.

Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы делают на основании величины А. Если величина А составляет 50 % дафний и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее среднее летальное разбавление за 96 ч биотестирования.

Для определения токсичности объекта желательно использовать три тест-культуры. Поэтому дальнейшее исследование токсичности растворов СМС можно провести с помощью люминесцентных бактерий-биосенсоров серии «Эколюм» (вариант 3).

Часть 3. Биотестирование растворов моющих средств с использованием культуры люминесцентных бактерий-биосенсоров серии «Эколюм»⁹

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Прибор «БИОТОКС – 10 М» – 1 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 см³ – 8 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Пробирки стеклянные.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

Сульфат меди(II) пентагидрат – 10 г.

Вода дистиллированная.

Культура бактерий – 1 амп.

Принцип анализа

Методика основана на определении изменения биолюминесценции бактерий при воздействии химических веществ, присутствующих в пробе, по сравнению с контролем. Данный показатель отражается в значении индекса токсичности, по величине которого пробу относят к одной из групп токсичности (табл. 2).

⁹ Разработано на основе (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11 04 (16.1:2:3:3.8 04).

Классификация проб, анализируемых с помощью тест-системы «Эколюм»

Интервал индекса токсичности Т, у. е.	Группа токсичности
$0 < T < 20,00$	Группа I. Проба не токсична
$20,1 < T < 49,99$	Группа II. Проба средне токсична
$T > 50,00$	Группа III. Проба сильно токсична

Ход исследования

1. Готовят тест-систему «Эколюм»: вскрывают флакон с бактериальным препаратом (хранится в морозильной камере), добавляют 10 см³ дистиллированной охлажденной воды с нейтральным уровнем рН для регидратации «Эколюм». Суспензия выдерживается в холодильнике при температуре + (2–4) °С в течение 30 минут. Далее температуру суспензии бактерий доводят до комнатной.

2. Разбавляют суспензию бактерий: регидратированную тест-систему «Эколюм» разбавляют до показателей биолуминесценции, в 100–500 раз превышающих фоновые шумы прибора «БИОТОКС-10 М».

3. Проводят эксперимент: для анализа отбирают по 0,1 см³ рабочей суспензии бактерий и добавляют в три пробирки для контрольных и три пробирки для опытных вариантов. Добавляют в контрольные пробирки по 0,9 см³ дистиллированной воды, в остальные – по 0,9 см³ опытной пробы. Замечают время экспозиции (30 минут), а затем измеряют интенсивность биолуминесценции бактерий.

Обработка результатов анализа

Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолуминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «Т», % по формуле 8:

$$T = \frac{(X_k - X_{оп}) \times 100}{X_k}, \quad (8)$$

где X_k и $X_{оп}$ – среднее значение биолуминесценции для контрольного и опытного вариантов соответственно.

Отчет

Отчет по проделанной работе включает в себя:

- 1) краткое описание хода исследования;
- 2) представление коэффициентов корреляции между химическими показателями и показателями токсичности растворов СМС для организмов различных систематических групп. Обсуждение.
- 3) вывод о степени разбавления моющих средств до нетоксичного уровня.

РАЗДЕЛ 3. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕДМЕТОВ ДОМАШНЕГО ОБИХОДА

Лабораторная работа № 9.

Определение содержания формальдегида в материале для изготовления мебели¹⁰

Цель занятия

Определение и оценка содержания формальдегида в материале для изготовления мебели.

Перед студентами ставится задача определить содержание формальдегида методом иодометрии и спектрофотометрии. Сравнить, полученные результаты, объяснить, при необходимости, различия между результатами, полученными двумя методами. Провести статистическую обработку результатов и просчитать статистически достоверное различие между двумя массивами данных.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм токсического действия некоторых наиболее распространенных органических веществ».

2. Краткое описание основных методов определения формальдегида в различных объектах.

Метод спектрофотометрии

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы спектрофотометрические с длиной оптимального пути 40–50 см – 2 шт.

Плитка электрическая – 4 шт.

Термометр – 4 шт.

Весы аналитические – 2 шт.

Весы лабораторные – 2 шт.

Баня водяная – 4 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 8 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 100 и 500 см³ – 8 шт.

Воронки конические – 8 шт.

Бумага для фильтрования.

Ножницы – 1 шт.

Палочки стеклянные – 8 шт.

Ацетилацетоновая смесь – 200 см³.

ГСО формальдегида – 1 шт.

¹⁰ Разработано на основе (ГОСТ 30255-2014).

Принцип метода

Формальдегид с ацетилацетоном образует комплексное соединение, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски зависит от концентрации формальдегида в растворе.

Ход анализа

1. Фотометрическое определение формальдегида проводят следующим образом. Пробы материалов взвешивают, нарезают на части и помещают в колбу, заливают 20 см³ дистиллированной воды. Колбы помещают на водяную баню и выдерживают при $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин.

2. Раствор фильтруют, после чего отбирают от каждой пробы 5–10 см³ фильтрата, добавляют 10 см³ ацетилацетоновой смеси и выдерживают 30 мин при $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$, охлаждают при 18–25 °C. Содержимое колб переносят в мерные колбы вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой. Параллельно проводят «холостой опыт», где вместо фильтрата используют дистиллированную воду, в дальнейшем этот раствор применяют в качестве раствора сравнения при измерении оптической плотности. Определение оптической плотности растворов проводят на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром или спектрофотометре при длине волны 412 нм. Количество свободного формальдегида определяют по калибровочному графику, который строят индивидуально для каждого прибора, на котором определяют формальдегид.

Метод иодометрии

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Плитка электрическая – 4 шт.

Весы аналитические – 2 шт.

Весы лабораторные – 2 шт.

Стаканы химические термостойкие вместимостью 100 и 500 см³ – 8 шт.

Установка для титриметрического анализа – 4 шт.

Воронки конические – 8 шт.

Бумага для фильтрования.

Ножницы – 1 шт.

Палочки стеклянные – 8 шт.

0,05 н раствор иода – 1 дм³.

2 н раствор гидроксида натрия – 1 дм³.

0,05 н раствор тиосульфата натрия – 1 дм³.

Раствор крахмала (индикатор) – 50 см³.

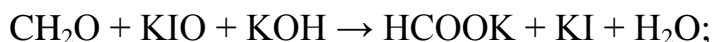
Принцип анализа

Количественное определение формальдегида можно провести по реакции окисления иодом в щелочной среде формальдегида в муравьиную кислоту (процесс идет через несколько стадий):

- 1) образование гипоиодита калия:



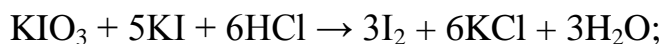
- 2) окисление формальдегида до формиата в щелочной среде:



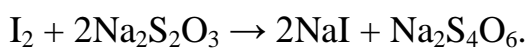
- 3) превращение гипоиодит в иодат и иодид:



- 4) выделение иода:



- 5) титрование свободного йода раствором тиосульфата натрия:



Выделившийся при последующем подкислении иод титруют раствором тиосульфата натрия, индикатор – раствор крахмала.

Ход анализа

1. Подготовительный этап исследования аналогичен подготовительному этапу при определении с ацетилацетоном.

2. К 25 см³ вытяжки добавляют 100 см³ 0,05 н стандартизованного раствора иода, добавляют 5 см³ 2 н раствора гидроксида натрия и оставляют в темном месте на 5 мин. Нейтрализуют раствором соляной или серной кислоты до нейтральной реакции. Избыток иода оттитровывают стандартизованным раствором тиосульфата натрия.

Отчет

Отчет о проделанной работе включает:

- 1) описание принципа и хода проведенного исследования;
- 2) статистически обработанные результаты исследования;
- 3) выводы.

РАЗДЕЛ 4. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДУХА, ПОЧВЫ И ВОДЫ

Лабораторная работа № 10.

Определение концентрации некоторых загрязняющих веществ в воздухе с помощью индикаторных трубок¹¹

Цель занятия

Формирование умения студентов, используя индикаторные трубки, определять концентрацию некоторых загрязняющих веществ в воздухе рабочей зоны.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Тест-методы в токсикологии».
2. Состав реагентов индикаторных трубок для определения H_2S , SO_2 , NO , NO_2 , NH_3 , CO , CO_2 , HCON , CH_3COOH , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, бензин, керосин. Химизм определения данных веществ в воздухе.
3. Виды ПДК веществ в воздухе рабочей зоны.
4. Краткое описание основных методов экспресс-диагностики содержания загрязняющих веществ (ЗВ) в воздухе.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Аспиратор – 1–2 шт.

Индикаторные трубки для определения H_2S , SO_2 , NO , NO_2 , NH_3 , CO , CO_2 , HCON , CH_3COOH , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, бензина, керосина – по 3 шт.

Субстанции – источники ЗВ в воздухе – произвольное количество.

Устройство аспиратора

Аспиратор (рис. 1) представляет собой сильфонный насос ручного действия, работающий на всасывание воздуха за счет раскрытия пружинами предварительно сжатого сильфона и выброса воздуха из сильфона через клапан при сжатии пружин.

¹¹ Разработано на основе (ТУ 4215-002-00211145-2003, ГОСТ 12.1.014-84).

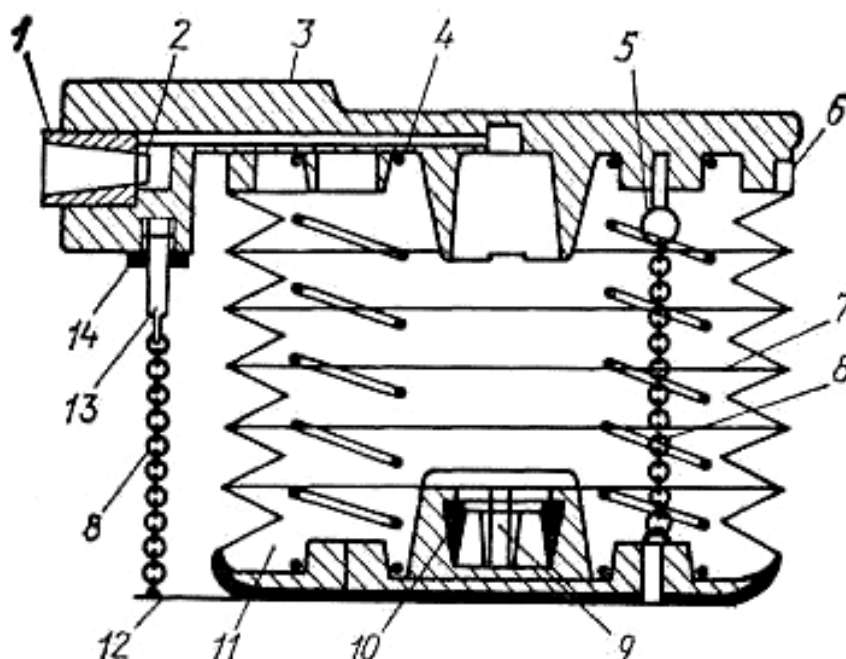


Рис. Аспиратор меховый типа АМ:

1 – мундштук; 2 – фильтр; 3 – крышка верхняя; 4 – пружина;
5 – кольцо пружинное; 6 – обвязка; 7 – кольцо; 8 – цепочка; 9 – клапан;
10 – седло; 11 – мех; 12 – крышка нижняя; 13 – винт; 14 – втулка

Основу прибора составляет резиновый мех (сильфон) с пружинами, обеспечивающими работу аспиратора. От спадения мех удерживается распорными кольцами, крепится к крышке при помощи обвязки. В крышку вмонтирован фильтр и резиновый мундштук, служащий для присоединения индикаторной трубки. В нижнее основание меха встроено седло с выпускным клапаном, предназначенным для удаления воздуха из меха при сжатии последнего. Воздух выходит из меха через выпускной клапан, а не через индикаторную трубку потому, что клапан создает сжатому воздуху гораздо меньшее сопротивление по сравнению с трубкой.

Две цепочки – наружная и внутренняя – соединены с нижней и верхней крышкой, служат для ограничения раскрытия меха. Наружная цепочка присоединена к винту и втулке, с помощью которых производится настройка аспиратора на нормированный объем рабочего хода ($10 \pm 5 \text{ см}^3$). Вращая ключом втулку в ту или иную сторону и придерживая винт от проворота, изменяют объем меха; при навинчивании втулки на винт объем уменьшается, при отвинчивании – увеличивается.

На нижней крышке прибора, в передней ее части, расположена скоба с двумя отверстиями, предназначенными для сламывания концов индикаторной трубки.

Индикаторная трубка представляет собой стеклянную трубку (длина 125 мм, диаметр 7 мм), заполненную обработанным порошком силикагеля.

Концы трубки оттянуты и запаяны. На поверхности трубки в области реактивного слоя нанесены кольца с цифровыми значениями, соответствующими определенным концентрациям анализируемых веществ. Стрелка показывает направление движения воздуха. Слой белой краски на поверхности одного из концов трубки служит для записи даты и места отбора пробы.

Измерительные шкалы, нанесенные на футляре-кассете газоопределителя, служат для отсчета концентрации определяемых веществ в объемных процентах без проведения соответствующих пересчетов.

Порядок работы с прибором. Перед выполнением анализа проверяют герметичность прибора. Для этого в мундштук плотно вставляют закрытую индикаторную трубку и сжимают мех рукой до упора. Аспиратор считается герметичным, если в течение 10 мин сжатый мех полностью не раскрылся.

На месте отбора пробы вскрывают индикаторную трубку, отломав оттянутые концы ее в скобе на нижней крышке прибора, и плотно вставляют ее в мундштук так, чтобы стрелка была направлена к аспиратору. Рукой охватывают корпус аспиратора, держа его между большим и указательным пальцами (большой палец охватывает корпус аспиратора, остальные лежат на нижней крышке). Резиновый мех сжимают до упора, затем отпускают. Конец всасывания определяется по натяжению цепочки. Перед следующим сжатием выдерживается пауза в 3 секунды. Показания записывают либо непосредственно по индикаторным трубкам, либо по шкалам, разработанным для каждого из указанных веществ.

Измерение концентраций вредных веществ проводят не менее трех раз, последовательно. Содержание вредного вещества рассчитывают как среднюю арифметическую величину из трех проведенных измерений.

В соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.014–79 «Воздух рабочей зоны. Методы измерений концентраций вредных веществ индикаторными трубками» исследования должны проводиться при определенных параметрах воздушной среды: атмосферное давление – 90–101 кПа (680–780 мм рт. ст.), относительная влажность – 30–80 %, температура воздуха – 15–30 °С.

В ряде случаев для устранения влияния химических соединений, мешающих определению исследуемого вещества, перед индикаторными трубками устанавливаются вспомогательные. По механизму удаления сопутствующих примесей вспомогательные трубки делятся на окислительные, осушительные, фильтрующие и др.

Измерение необходимо начинать не позднее 1 мин после разгерметизации трубок.

Ход анализа

1. Емкости с субстанциями – источниками газов поставить в вытяжной шкаф, вентиляцию отключить.

2. Произвести измерение концентрации ЗВ в областях пространства вблизи вытяжного шкафа, в которых происходит вдыхание воздуха студентом при работе.

3. Включить вентиляцию и провести аналогичное измерение.

Значения концентрации ЗВ в воздухе с отключенной и включенной вентиляцией сравнивают между собой и со значениями ПДК веществ в воздухе рабочей зоны (Приложение: таблица 2).

Отчет

Отчет о проделанной работе включает:

- 1) описание принципа и хода проведенного исследования;
- 2) статистически обработанные результаты исследования;
- 3) выводы.

Лабораторная работа № 11.

Фитотестирование почв

Цель занятия

Формирование умения студентов проводить фитотестирование почв.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Тест-методы в токсикологии».
2. Самостоятельно ознакомиться с ГОСТ 12039-82 и ГОСТ 12038-84.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Термостат – 1 шт.

Ротатор – 1 шт.

Чашки Петри – 24 шт.

Весы лабораторные – 2 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Воронки диаметром 100 см – 8 шт.

Дистиллированная вода.

Фильтровальная бумага.

Почва.

Семена редиса, кресс-салата.

Часть 1. Фитотестирование почв с использованием семян кресс-салата¹²

Подготовка к анализу

Перед биотестированием почву высушивают до воздушно-сухого состояния, удаляют из нее посторонние включения и остатки растений, растирают в фарфоровой чашке и просеивают через сито с отверстиями размером 2 мм.

Ход анализа

1. В каждую чашку Петри переносят одинаковые массы подготовленной контролируемой почвы так, чтобы толщина слоя почвы в чашках Петри была равна 1 см. Почву в чашках накрывают фильтровальной бумагой. Перед раскладкой семян почву и бумагу увлажняют дистиллированной до полного насыщения. Воду во все пробы добавляют в одинаковых количествах. Семена кресс-салата по 20–50 штук раскладывают в чашках на одинаковом расстоянии друг от друга.

2. Чашки Петри помещают в термостат и выдерживают при температуре 23–25 °С в течение 4 сут. Каждый опыт проводят в трех повторностях. Параллельно в трех повторностях проводят опыт с чистым субстратом (дистиллированной водой).

¹² Разработано на основе (Чеснокова, Чугай, 2008).

3. Через 4 суток определяют перечисленные ниже показатели.

Всхожесть – число проросших семян, выраженное в процентах от общего количества семян.

Энергия прорастания – число семян, проросших за первые трое суток, выраженное в процентах от общего количества семян, взятых для проращивания.

Дружность прорастания – средний процент семян, проросших за первые сутки прорастания, рассчитывают по формуле 9:

$$D = \frac{P}{A}, \quad (9)$$

где D – дружность прорастания;

P – полная всхожесть;

A – число дней прорастания.

Скорость прорастания – сумма средних чисел семян, прорастающих ежедневно, рассчитывают по формуле 10:

$$C = a + \frac{б}{2} + \frac{в}{3} + \frac{г}{4} + \dots, \quad (10)$$

где C – скорость прорастания семян;

a – число семян, проросших за первые сутки;

$б$ – число семян, проросших за вторые сутки;

$в$ – число семян, проросших за третьи сутки;

$г$ – число семян, проросших за четвертые сутки.

Обработка результатов анализа

Для качественной оценки токсичности почв по всхожести используются следующие уровни загрязнения:

1) загрязнение отсутствует – всхожесть семян достигает 90–100 %, всходы дружные, проростки крепкие, ровные. Эти признаки, как правило, характерны для контроля, с которым следует сравнивать результаты, полученные с тестируемыми почвами;

2) слабое загрязнение – всхожесть 60–90 %, проростки ровные, почти нормальной длины;

3) среднее загрязнение – всхожесть 30–60 %, проростки по сравнению с контролем короче и тоньше, некоторые проростки имеют уродства;

4) сильное загрязнение – всхожесть семян менее 20 %, проростки мелкие и уродливые.

Часть 2.

Фитотестирование почв с использованием семян редиса¹³

Подготовка к анализу

1. Чашки Петри (3 для контроля и по 3 для каждого из разведений) с вложенными в них кружочками фильтровальной бумаги стерилизуются и охлаждаются.

2. Для проведения анализа из свежих образцов почвы готовится водная вытяжка в соотношении почва : вода – 1 : 4 (с учетом гигроскопической влажности). Полученные водные вытяжки 2 ч встряхивают на ротаторе, затем 30 мин отстаивают и фильтруют через фильтр «белая лента».

Ход анализа

1. В каждую чашку помещается по 25 сухих здоровых семян, в опытные чашки вносят по 5 мл экстракта или его разведений; контрольные семена обрабатывают 5 мл дистиллированной воды. Все образцы помещают в термостат и выдерживают при температуре 20–23 °С в течение 7 суток.

2. По истечении срока экспозиции измеряют максимальную длину корней и проростков, в контрольных и опытных пробах.

Обработка результатов анализа

Рассчитывают эффект торможения по формуле 11:

$$E_M = \frac{L_K - L_{оп}}{L_K} \times 100 \%, \quad (11)$$

где E_m – эффект торможения, %;

$L_{оп}$ – средняя длина корней в опыте, мм по 3-м повторностям;

L_k – средняя длина корней в контроле, мм по 3-м повторностям.

Класс опасности почвы рассчитывается путем нахождения разведения, при котором происходит подавление роста длины корней на 50% и далее устанавливается по табличным значениям (табл. 3).

Таблица 3

Критерии опасности проб по фитотоксическому действию

Классы	1	2	3	4
Категории опасности	Чрезвычайно опасные	Высоко опасные	Умерено опасные	Мало опасные
Величина E_T	> 102	> 9–102	> 1–10	≤ 1

Отчет

Отчет по проделанной работе включает:

- 1) краткое описание хода анализа;
- 2) представление результатов и их обсуждение.

¹³ Разработано на основе (Терехова, Воронина и др., 2011).

Лабораторная работа № 12.
Определение ионов меди(II) в пробах питьевой воды
методом инверсионной вольтамперометрии¹⁴

Цель занятия

Определение и оценка содержания меди в питьевой воде.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Механизм действия солей тяжёлых металлов».
2. Краткое описание основных методов определения меди в различных объектах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Модуль ЕМ-04

Весы аналитические – 1 шт.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Колбы мерные вместимостью 250, 500 и 1000 см³ – 8 шт.

Воронки диаметром 36 и 100 см – 16 шт.

Мерные цилиндры вместимостью 50 см³ – 8 шт.

Чашки фарфоровые – 15 шт.

Палочки стеклянные – 15 шт.

Установка для выпаривания (штатив с кольцом, горелка, тигельные щипцы).

Стаканы химические термостойкие вместимостью 100 и 250 см³ – 8 шт.

Фильтры обеззоленные бумажные.

Анализатор «ЭКОТЕСТ-ВА» инверсионный вольтамперметр – 1 шт.

ГСО ионов меди (II) – 1 амп.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – по 4 шт.

Кислота соляная, концентрированная – 100 см³.

Кислота азотная, концентрированная – 100 см³.

Нитрат ртути(II) двуводный – 0,3 г.

Вода дистиллированная.

Принцип анализа

Суть проведения анализа на приборе марки «Экотест-ВА» состоит в том, что из фонового раствора, содержащего нитрат ртути(II), на поверхности рабочего электрода восстанавливается металлическая ртуть, образуя пленку. В дальнейшем на этой пленке происходит накопление металла, переход которого обратно в раствор идет при определенном значении напряжения, характерного для каждого элемента. Возникает сила тока, пропорциональная концен-

¹⁴ Разработано на основе (ГОСТ Р 52180–2003).

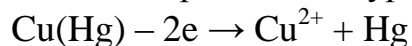
трации переходящих с электрода ионов металла. Графическим выражением является пик, площадь которого отражает концентрацию элемента в растворе.

Снимают последовательно вольтамперограммы из растворов типа «Фон», «Проба», «Проба + Добавка». Добавка – раствор известного объема с известной концентрацией искомого компонента. Сравнивая площадь пика на вольтамперограмме раствора «Добавка» и «Проба», программа к прибору вычисляет концентрацию искомого компонента, вычитать из найденного значения концентрацию иона в фоне.

В качестве рабочего электрода для определения концентрации ионов меди(II) удобно использовать ртутный электрод, так как медь обратимо восстанавливается в определенной области потенциалов (от потенциала окисления ртути до потенциалов восстановления фоновых катионов) и образует с ртутью амальгаму:



Окисление металла из амальгамы проходит по уравнению:



Подготовка к анализу

1. Подготовка электрохимической ячейки

Собирают электрохимическую ячейку в соответствии с описанием на датчик «Модуль ЕМ-04» Соединяют анализатор «Экотест-ВА» с датчиком «Модуль ЕМ-04» согласно руководству по эксплуатации на анализатор.

При подключении к электрической сети на передней панели анализатора засветится сигнальный светодиод, а на цифровом индикаторе панели управления датчика «Модуль ЕМ-04» загорится число «1000» и предусмотренная методикой определения скорость вращения мешалки (число оборотов в мин.).

2. Минерализация до влажных солей

5 см³ пробы переносят в фарфоровую чашку. Добавляют 2 см³ концентрированной азотной кислоты и упаривают раствор до влажных солей на электроплитке со слабым нагревом. Минерализация считается законченной, если остаток осветлился. К остатку добавляют 1 см³ 1 М соляной кислоты и упаривают раствор досуха на водяной бане. После окончания минерализации переходят к приготовлению анализируемого раствора пробы.

Если остаток остается темный, кислотную обработку повторяют до его осветления (3–5 раз). Если остаток не осветляется после кислотной обработки, пробу упаривают досуха, помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре не выше 400 °С в течение 30–50 мин. Чашку с золой вынимают из муфельной печи, охлаждают до комнатной температуры. Минерализация считается законченной, когда зола станет светлого цвета. Зола смачивают 1 см³

1 М соляной кислоты и досуха выпаривают на водяной бане. После окончания минерализации переходят к приготовлению анализируемого раствора пробы.

Для приготовления анализируемого раствора пробы чашку с осадком охлаждают до комнатной температуры. К осадку добавляют 1 см³ 1 М соляной кислоты и 10 см³ разбавленного фонового раствора, тщательно перемешивают. Раствор фильтруют через обеззоленный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 см³. Ополаскивают чашку и фильтр 15–20 см³ разбавленного фонового раствора и вносят смыв в колбу. Доводят объем раствора до 100 см³ разбавленным фоновым раствором.

Ход анализа

1. Подготовка анализатора в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

2. Задание условий проведения измерений.

3. Снятие вольтамперограммы фонового раствора.

4. Снятие вольтамперограммы исследуемого раствора.

5. Снятие вольтамперограммы исследуемого раствора с добавкой аттестованной смеси (АС) определяемого элемента.

6. Обработка результатов согласно площадям или высотам пиков на вольтамперограммах.

Выполнение измерений

25 см³ контрольной пробы, подготовленной к измерению, помещают в электрохимическую ячейку. Параметры электрохимического измерения устанавливают согласно таблице 4.

Продолжительность накопления, шкалу токов анализатора и скорость вращения мешалки устанавливают одинаковыми при регистрации вольтамперограммы раствора анализируемой пробы и раствора анализируемой пробы с добавкой стандартного раствора ионов определяемого иона металла.

Снимают вольтамперограммы исследуемого раствора и исследуемого раствора с добавкой. Обработывают их.

Обработка результатов анализа

Концентрация ионов металла в анализируемом растворе пробы (C_m) (раствор в электрохимической ячейке) рассчитывают по формуле 12:

$$C_m = \frac{S_x \times C_d \times V_d}{(S - S_x) \times V + S \times V_d}, \quad (12)$$

где C_m – концентрация ионов металла в анализируемом растворе пробы (в электрохимической ячейке), мкг/дм³;

S_x – площадь пика ионов металла в анализируемом растворе пробы;

S – площадь пика ионов металла в анализируемом растворе пробы с добавкой стандартного раствора ионов металла;

V – объем раствора в ячейке до внесения добавки, см^3 , ($V = 25 \text{ см}^3$);

V_d – объем добавки стандартного раствора ионов металла, см^3 ;

C_d – концентрация добавленного стандартного раствора ионов металла, мкг/дм^3 .

Вычисление проводится с помощью программного обеспечения анализатора.

Расчет массовой концентрации ионов металла в пробе воды (C) проводят по формулам 13, 14:

$$C = C_m \times N \times n; \quad (13)$$

$$N = \frac{V}{V_{\text{пр}}}, \quad (14)$$

где C_m – концентрация ионов металла в анализируемом растворе пробы, мкг/дм^3 ;

$V_{\text{пр}}$ – аликвотный объем пробы, см^3 ;

V – объем анализируемого раствора пробы, см^3 ;

n – величина предварительного разбавления пробы с большой концентрацией определяемого компонента (без предварительного разбавления $n = 1$).

Допускается использование значений концентрации меди, полученных за счет программного обеспечения прибора.

За результат анализа (C) принимают среднее арифметическое результатов параллельных определений C_1 и C_2 , расхождение между которыми не превосходит значений норматива оперативного контроля.

Таблица 4

Параметры электрохимического измерения

Название параметра	Единицы измерения	Величина параметра
Скорость развертки потенциала	мВ/с	от 50 до 100
Начало развертки потенциала	мВ	–950
Конец развертки потенциала	мВ	0
Потенциал накопления	мВ	–950
Продолжительность накопления	с	от 60 до 300
Мешалка	–	вкл.
Потенциал очистки электрода	мВ	0
Продолжительность очистки электрода	с	равна продолжительности накопления
Шкала измерения анодного тока	мкА	диапазон 0–200
Электродная схема ячейки	–	трехэлектродная

Отчет

Отчет по проделанной работе включает:

- 1) краткое описание хода анализа;
- 2) представление результатов и их обсуждение.

РАЗДЕЛ 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У РАСТЕНИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВЫ И ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Студентам предварительно может быть предложено выращивание растений (ячменя, редиса и т. п.) на субстратах (почва, водные растворы), содержащих какие-либо токсиканты. Для исследований могут быть использованы не только высшие растения, но и, например, микроорганизмы, для которых характерно протекание изучаемых процессов и наличие определяемых компонентов (фотосинтетические пигменты, флавоноиды, антоцианы, процессы перекисного окисления липидов, содержание тиогрупп в белках, аскорбиновая кислота, активность ферментов и т. п.).

Цель занятия

Формирование умения студентов, проводить оценку состояния по биохимическому отклику растений.

Необходимо подготовить к занятию

1. Повторить материал лекции «Методы исследования токсичности различных сред и объектов».
2. Используя 10–15 литературных источников, охарактеризовать механизм влияния некоторых токсикантов (по выбору студентов) на фотосинтетические пигменты, перекисное окисление липидов, содержание в растениях аскорбиновой кислоты, флавоноидов, антоцианов, веществ с тиоловыми группами).

Лабораторная работа № 13.

Спектрофотометрическое определение фотосинтетических пигментов в растениях¹⁵

Важнейшими компонентами фотосинтетического аппарата является система пигментов, включающая хлорофиллы *a*, *b* и каротиноиды. Хлорофиллы играют ключевую роль в процессе фотосинтеза. Каротиноиды, наряду с участием в поглощении света, выполняют антиоксидантную, фотопротекторную и структурную функции.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Нож керамический – 4 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Градуйрованная пипетка вместимостью 5 см³ – 8 шт.

¹⁵ Разработано на основе (Шлык, 1971).

Груша резиновая – 8 шт.
Стеклянные пробирки вместимостью 10–15 см³ – 24 шт.
Штатив для пробирок – 8 шт.
Водяная баня – 4 шт.
Плитка электрическая – 4 шт.
Фарфоровая ступка с пестиком диаметр 100 см³ – 8 шт.
Колба Бунзена – 1 шт.
Стеклянная воронка (№ 3 или 4) – 8 шт.
Водоструйный насос – 1 шт.
Мерные колбы с притертой стеклянной пробкой (вместимостью 25 или 50 см³) – 24 шт.
Спектофотометр – 1 шт.
Кюветы стеклянные с толщиной слоя 1 см – набор.
Ацетон 100 % – 300 см³.
Кварцевый песок – 100 г.
Карбонат кальция – 100 г.
Сульфат натрия безводный – 50 г.

Принцип анализа

Для количественного определения пигментов в растительных тканях широко используется спектрофотометрический метод, важнейшим условием применимости которого является отсутствие в экстрактах светопоглощающих примесей. Метод основан на извлечении хлорофиллов и каротиноидов из растительного материала ацетоном, очистке экстракта и определении оптической плотности растворов в диапазоне длин волн 400–700 нм. Определение хлорофиллов осуществляется в области красных максимумов поглощения, при анализе общих каротиноидов используют синюю область спектра.

Ход анализа

1. Пробу свежего растительного материала (200–300 мг) заливают 5 см³ 100 % ацетона и фиксируют на кипящей водяной бане (или в жидком азоте).
2. Фиксированную пробу листьев растирают в фарфоровой ступке с добавлением кварцевого песка под слоем ацетона. В целях предотвращения феофетинизации во время извлечения к ацетону добавляют CaCO₃ для нейтрализации кислот клеточного сока, а также немного Na₂SO₄ для обезвоживания пробы.
3. Как правило, используют несколько последовательных порций растворителя, сливая каждую предыдущую через стеклянный фильтр, укрепленный в колбе Бунзена с водоструйным насосом. Каждую порцию растворителя сливают после нескольких минут дополнительного растворения и растирания массы.

Обычно требуется не менее 5–7 порций до полного обесцвечивания последней из них.

4. Объединенные порции экстракта переносят в мерную колбу, доводят ацетоном до метки, промывая пробирку для отсасывания.

5. Колбу закрывают стеклянной притертой пробкой, экстракт перемешивают и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длинах волн 662 (хлорофилл *a*), 644 (хлорофилл *b*) и 470 нм (каротиноиды) в кювете с толщиной слоя 1 см. Предварительно необходимо уточнить положение максимума хлорофилла *a*. Для этого снимают весь спектр, определяют смещение теоретического максимума (от 662 нм). Обычно смещение составляет 0,5–2,0 нм. Далее ведут определение оптической плотности для хлорофилла *b* и суммы каротиноидов с учетом смещения. В качестве стандарта используют 100 % ацетон.

Обработка результатов анализа

Расчет концентрации пигментов проводят по формулам 15–18:

$$C_a = 9,78 \times D_{662} - 0,99 \times D_{644}; \quad (15)$$

$$C_b = 21,42 \times D_{644} - 4,56 \times D_{662}; \quad (16)$$

$$C_{a+b} = C_a + C_b; \quad (17)$$

$$C_k = \frac{1000 \times D_{470} - 2,27 \times C_a - 81,4 \times C_b}{227}, \quad (18)$$

где C_a – концентрация хлорофилла *a* (мг/дм³),

C_b – концентрация хлорофилла *b* (мг/дм³),

C_k – концентрация каротиноидов (мг/дм³),

E_{662} – оптическая плотность раствора при 662 нм и толщине слоя 1 см,

E_{644} – оптическая плотность раствора при 644 нм и толщине слоя 1 см,

D_{470} – оптическая плотность раствора при 470 нм и толщине слоя 1 см.

Исходя из полученных концентраций пигментов, рассчитывают их содержание в исследуемом образце по формулам 19, 20:

$$X = \frac{C \times V \times 0,001}{m}, \quad (19)$$

X – содержание пигмента в исследуемом образце (мг/г),

C – концентрация пигмента (мг/г),

W – объем экстракта пигментов (см³),

m – навеска исследуемой ткани (г),

0,001 – коэффициент пересчета концентрации пигмента.

$$ССК = \frac{хлb + 1,2 хла}{\sum хл(a+b)}, \quad (20)$$

ССК – светособирающий комплекс, %;

хла – содержание хлорофилла a в исследуемом образце (мг/г);

хл b – содержание хлорофилла b в исследуемом образце (мг/г);

$\sum хл (a+b)$ – сумма хлорофилла a и b в исследуемом образце (мг/г).

Каждое определение проводят в четырехкратном повторении. Для оценки погрешности количественных определений проводят статистическую обработку полученных результатов. Рассчитывают следующие статистические характеристики:

- среднее значение содержания компонента по формуле 21:

$$X_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_{ij}); \quad (21)$$

- стандартное выборочное отклонение определения по формуле 22:

$$S_n (x_i) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - x_i)^2}, \quad (22)$$

где X_i – отдельное отклонение,

n – число измерений.

Лабораторная работа № 14.

Спектрофотометрическое определение содержания флавоноидов в растениях¹⁶

Флавоноиды – группа природных биологически активных соединений – производных бензо-γ-пирона, в основе которых лежит фенилпропановый скелет, состоящий из $C_6-C_3-C_6$ – углеродных единиц. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце. Под термином «флавоноиды» объединены различные соединения, генетически связанные друг с другом и обладающие сходными свойствами.

Свое название флавоноиды получили от латинского *flavus* – желтый, так как первые выделенные из растений соединения имели желтую окраску. Однако позднее выяснилось, что большинство из них – бесцветные соединения. Это самый обширный класс фенольных соединений, к которому относятся и антоцианиды. Флавоноиды широко распространены, в большем или меньшем количестве их содержат почти все высшие растения. Особенно богаты флавоноидами семейства розоцветных, бобовых, гречишных, сложноцветных, яснотковых.

Флавоноиды находятся в разных частях растений, но чаще в надземных: цветках, листьях, плодах. Значительно меньше их содержится в стеблях и подземных органах. Наиболее богаты ими молодые цветки и незрелые плоды. Содержание флавоноидов в растениях различно: в среднем оно составляет 0,5–5,0 %. Будучи постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, флавоноиды несут значительную функциональную нагрузку: участвуют в процессах дыхания и онтогенеза; играют важную роль в окислительно-восстановительных реакциях; защищают растительные ткани от избыточной солнечной радиации; влияют на проницаемость мембран; являются субстратами ряда ферментов.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Нож керамический – 4 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Водяная баня – 4 шт.

Плитка электрическая – 4 шт.

Колбы мерные вместимостью 50 и 100 $см^3$ – 16 шт.

Стеклянная пробирка вместимостью 10–15 $см^3$ – 32 шт.

Пробирка мерная вместимостью 10 $см^3$ – 24 шт.

Штатив для пробирок – 8 шт.

Пипетка (дозатор) вместимостью 0,5 $см^3$ – 8 шт.

¹⁶ Разработано на основе (Рогожин, 2013).

Груша резиновая – 8 шт.
Спектрофотометр – 1 шт.
Кюветы стеклянные с толщиной слоя 1 см – набор.
Этанол, раствор 96 % – 300 см³.
Тритон X-100 – 1 см³.
Лимонная кислота – 200 г.
Борная кислота – 20 г.
Рутин – 80 мг.

Принцип анализа

Для максимального извлечения флавоноидов из биологического материала используется 1 % раствор тритона X-100 в 96 % растворе этанола, способного извлекать из мембранных структур нерастворимые в воде соединения. За счет формирования мицеллярных структур в тритоне X-100 могут растворяться гидрофобные соединения. В основе реакции лежит способность флавоноидов из растительных тканей реагировать с лимоннокислым борным реактивом, образуя окрашенный устойчивый комплекс с максимумом поглощения при 420 нм.

Подготовка к анализу

1. Приготовление экстрагирующего раствора. 1 %-ный раствор тритона X-100 в 96 % растворе этанола: 1 см³ тритона X-100 растворяют в 99 см³ 96 % раствора этанола.

2. Приготовление лимонно-борного реактива. На растворе для экстракции, отдельно готовят, нагревая на водяной бане: а) лимонную кислоту 10 г на 50 см³ (20 %); б) борную кислоту 2,5 г на 50 см³ (5 %). Непосредственно перед определением смешивают полученные растворы в соотношении 1 : 1. Отдельно на 96 % растворе этанола готовят: в) раствор рутина с концентрацией 0,1 мг/см³ (10 мг на 100 см³); г) 20 % раствор лимонной кислоты (20 г на 100 см³), нагревая на водяной бане.

Ход анализа

1. Экстракция флавоноидов

Растительный материал (0,5–1,0 г сырых листьев) измельчают и заливают экстрагирующим раствором в соотношении 1 : 5. Экстракцию флавоноидов проводят путем настаивания в течение 24 ч. По истечении времени настаивания отмечают точный объем экстракта.

2. Построение градуировочного графика

Устанавливают в штатив (12 пробирок). В 6 пробирок последовательно вносят разные объемы исходного 0,1 мг/см³ раствора рутина и лимонно-

борного реактива, как показано в таблице 5. В следующие 6 пробирок последовательно приливают разные объемы исходного $0,1 \text{ мг/см}^3$ раствора рутина и экстрагирующего раствора. Измерение первых шести калибровочных растворов проводят относительно экстрагирующего раствора, а остальных – против лимонно-борного реактива.

Таблица 5

Подготовка калибровочных растворов и измерение оптической плотности

№ п/п	Концентрация рутина в пробирке, $\text{мг/см}^3 \times 10^{-3}$	Раствор рутина с реактивом			Раствор рутина с экстрагирующим раствором		
		объем рутина, см^3	объем реактива, см^3	оптическая плотность	объем рутина, см^3	объем реактива, см^3	оптическая плотность
1	4	0,2	4,8		0,2	4,8	
2	8	0,4	4,6		0,4	4,6	
3	12	0,6	4,4		0,6	4,4	
4	16	0,8	4,2		0,8	4,2	
5	20	1,0	4,0		1,0	4,0	
6	24	1,2	3,8		1,2	3,8	

Оптическую плотность калибровочных растворов измеряют через 15 мин на спектрофотометре при 420 нм. Результаты заносят в таблицу 5. Величину оптической плотности с известной концентрацией рутина вычисляют путем вычитания из оптической плотности раствора рутина с лимонно-борным реактивом оптической плотности раствора рутина с экстрагирующим раствором.

3. Проведение реакции

В первую пробирку (опытная проба) последовательно вносят $0,5 \text{ см}^3$ супернатанта (объем вносимого образца можно изменять в пределах $0,05\text{--}0,60 \text{ см}^3$ в зависимости от содержания флавоноидов в исследуемой пробе), а затем объем доводят до 3 см^3 лимонно-борным реактивом. Во вторую пробирку вместо реактива приливают 20 % раствор лимонной кислоты в 96 % растворе этанола. После перемешивания измерения проводят через 15 мин при 420 нм.

Величину оптической плотности опытной пробы вычисляют путем вычитания из оптической плотности опытной пробы (с лимонно-борным реактивом) оптической плотности супернатанта с 20 % раствором лимонной кислоты. Концентрацию флавоноидов определяют по калибровочному графику.

Обработка результатов анализа

Содержание флавоноидов в исследуемом образце вычисляют по формуле 23:

$$C\Phi = \frac{C \times V_1 \times V_3}{m \times V_2}, \quad (23)$$

где СФ – содержание флавоноидов, мг/г сырого веса;

С – концентрация флавоноидов, определенная по калибровочному графику мг/см³;

V₁ – общий объем после экстракции, см³;

V₂ – объем супернатанта, вносимого в пробирку, см³;

V₃ – конечный объем пробы в пробирке, см³;

m – масса навески растительного материала, г.

Лабораторная работа № 15.

Спектрофотометрическое определение содержания антоцианов в растениях¹⁷

Антоцианы – основные водорастворимые пигменты растений, обуславливающие окраску цветков, плодов, листьев в разнообразные цвета – от розового до фиолетово-черного. Окраска антоцианами цветков, плодов и других частей растений зависит от ряда факторов, многие из которых до конца не выяснены до сих пор. Следует отметить, что часто за окраску цветков ответственны не только антоцианы, но и другие пигменты. Например, коричневая окраска часто обусловлена сочетанием синевато-красного антоциана в вакуолях с желтыми каротиноидами в хромопластах.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Нож керамический – 4 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Термостатируемая водяная баня – 1 шт.

Стеклянная мерная пробирка вместимостью 15–20 см³ с притертой пробкой – 24 шт.

Пробирка химическая – 24 шт.

Штатив для пробирок – 4 шт.

Воронка стеклянная диаметром 36 мм – 24 шт.

Фильтр бумажный – 24 шт.

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы стеклянные с толщиной слоя 1 см – набор.

Соляная кислота, раствор 1 % – 1 дм³.

Принцип анализа

Метод определения антоцианов в растительной ткани основан на спектрофотометрическом определении оптической плотности экстракта антоцианов в 1 % растворе соляной кислоты при длинах волн 510 нм и 657 нм.

Ход анализа

1. Навеску растительного материала (0,3–0,5 г сырых листьев) мелко измельчают (но не растирают), помещают в мерную пробирку, добавляют 10 см³ 1 % раствора соляной кислоты и выдерживают на водяной бане при 40–45 °С в течение 20 мин.

2. После охлаждения содержимое фильтруют через бумажный фильтр и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длинах волн 510 нм и 657 нм.

¹⁷ Разработано на основе (Муравьева, Бубенчикова, 1987).

Обработка результатов анализа

Содержание суммы антоцианов вычисляют по формуле 24:

$$C_A = \frac{(D_{510} - 0,33 \times D_{657}) \times V}{453 \times m}, \quad (24)$$

где C_A – содержание антоцианов, % от сырого веса;

D_{510} , D_{657} – оптические плотности растворов при длинах волн 510 и 657 нм;

V – объем экстракта, дм^3 ;

453 – удельный показатель поглощения цианидин-3,5-дигликозида при длине волны 510 нм в 1 % водном растворе соляной кислоты;

m – масса навески растительного материала, г.

Процентное содержание антоцианов переводят в мкг на г сырого веса, умножая C_A (%) на 10000.

Лабораторная работа № 16.
Спектрофотометрическое определение
интенсивности перекисного окисления липидов в растениях¹⁸

Активные радикалы, в основном $\text{HO}\cdot$, взаимодействуя с органическими веществами, образуют гидропероксиды ДНК, белков, липидов. Гидропероксиды так же, как и пероксиды, химически активны и в ходе метаболизма переходят в спирты, альдегиды и другие окисленные соединения. В липидах, в основном в полиненасыщенных жирных кислотах, АФК (активные формы кислорода) вызывают цепные реакции с накоплением липидных, пероксильных, алкоксильных и других радикалов. При участии тяжелых металлов с переменной валентностью (медь, железо, кобальт и др.) происходит разветвление этой цепи. Перекисное окисление липидов является индикаторной реакцией повреждения клеточных мембран. В результате перекисного окисления липидов (ПОЛ) образуются метаболиты (малоновый диальдегид, пентан и др.), реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), что легло в основу количественной характеристики ПОЛ.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 1 шт.

рН-метр – 1 шт.

Мерный цилиндр вместимостью 50 см^3 – 8 шт.

Мерная колба вместимостью 100 см^3 – 8 шт.

Керамический нож – 4 шт.

Пипетка (дозатор) вместимостью 10 см^3 – 8 шт.

Пипетка (дозатор) вместимостью 2 см^3 – 8 шт.

Стеклянная мерная пробирка с притертой пробкой – 24 шт.

Штатив для пробирок – 4 шт.

Водяная баня – 4 шт.

Плитка электрическая – 4 шт.

Пробирка химическая – 24 шт.

Воронка стеклянная диаметром 36 мм – 24 шт.

Фильтр бумажный – 24 шт.

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы стеклянные с толщиной слоя 1 см – набор.

Соляная кислота, 0,1 н раствор – 100 см^3 .

Трис(гидроксиметил)аминометан – 2 г.

Хлорид натрия – 10 г.

¹⁸ Разработано на основе (Лукаткин, Голованова, 1988).

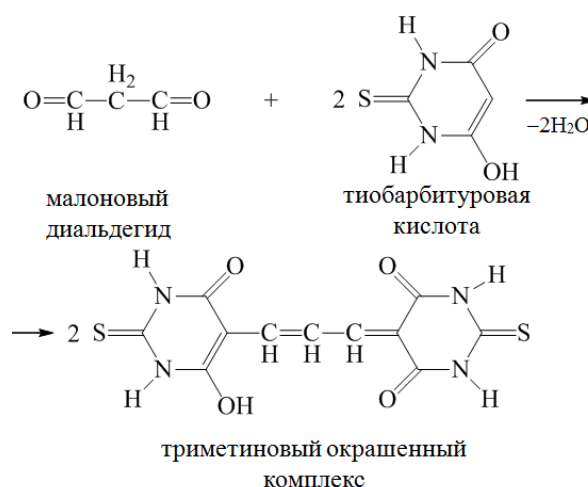
Тиобарбитуровая кислота – 0,5 г.

Трихлоруксусная кислота – 20 г.

Стеклянный песок.

Принцип анализа

Одним из продуктов ПОЛ является малоновый диальдегид (МДА). В реакции с тиобарбитуровой кислотой он дает окрашенное соединение. По интенсивности желтой окраски можно судить о концентрации МДА в растворе. По скорости образования малонового альдегида можно судить об активации ПОЛ. При взаимодействии МДА, образующегося в результате ПОЛ, с тиобарбитуровой кислотой происходит образование соединения, имеющего желтую окраску:



Подготовка к анализу

0,1 М трис-НCl буфер с pH = 7,6. Буфер готовят из трис(гидроксиметил)-аминометана ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (трис) и 0,1 н раствора соляной кислоты. Для приготовления 100 см^3 буфера необходимо в мерную колбу вместимостью 100 см^3 взять два раствора: 1) 1,21 мг трис, растворить в 50 см^3 дистиллированной воды; 2) 30 см^3 0,1 н раствора HCl (готовят из фиксаля). Слить растворы, pH корректировать до заданного значения соляной кислотой или сухим трис. Конечный объем доводят до 100 см^3 дистиллированной водой. Среда выделения представляет собой 0,35 М раствор хлорида натрия в 0,1 М трис-НCl буфере.

Ход анализа

1. Навеску растительного материала (0,6 г сырых листьев или корней) гомогенизируют в 10 см^3 среды выделения. Для лучшей гомогенизации можно добавить стеклянный песок.

2. Отбирают 3 партии гомогената по 3 см^3 (каждая партия – повторность) пипеткой с широким кончиком, чтобы не фильтровались плохо растертые кусочки растительной ткани.

3. К 3 см^3 гомогената добавляют 2 см^3 0,5 % ТБК в 20 % трихлоруксусной

кислоте, инкубируют на кипящей водяной бане в течение 30 мин вместе с контролем (среда выделения с раствором ТБК).

4. Пробирки с содержимым охлаждают, фильтруют и регистрируют оптическую плотность фильтрата при длине волны 532 нм на спектрофотометре против контроля (среда выделения с ТБК). Все варианты опыта делают одновременно (в одной водяной бане).

Обработка результатов анализа

Концентрацию МДА рассчитывают по молярной экстинкции согласно формуле 25:

$$c = \frac{D}{\epsilon \cdot l}, \quad (25)$$

где c – концентрация МДА, мкмоль/дм³;

D – оптическая плотность;

ϵ – коэффициент молярной экстинкции ($1,56 \times 10^{-5} \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$);

l – толщина слоя раствора в кювете (обычно используют кюветы с толщиной оптического слоя 1 см).

Количество МДА в растительных тканях рассчитывают в микромолях на грамм сырой массы.

Лабораторная работа № 17.

Выделение и определение содержания растворимого и мембранносвязанного белка по Шактерле в растениях¹⁹

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 1 шт.

Фарфоровая ступка диаметром 100 см³ с пестиком – 8 шт.

Холодильник с морозильной камерой – 1 шт.

Кювета для заморозки – 8 шт.

Центрифужная пробирка – 16 шт.

Центрифуга – 1 шт.

Стеклоаналитическая пробирка вместимостью 10–15 см³ (для проведения реакции) – 42 шт.

Штатив для пробирок – 8 шт.

Секундомер (таймер) – 8 шт.

Термостатируемая водяная баня – 1 шт.

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы стеклянные с толщиной оптического слоя 1 см – набор.

Пипетка градуированная вместимостью 0,5, 1, 5, 10 см³ – 8 шт.

Груша резиновая – 8 шт.

Колба мерная вместимостью 50 и 100 см³ – 16 шт.

Буфер трис-НСl, раствор 0,1 М – 400 см³.

Гексагидрат хлорида магния – 10 г.

ЭДТА – 100 г.

Пентагидрат сульфата меди(II) – 100 г.

Сегнетова соль – 50 г.

Натрия карбонат – 250 г.

Натрия гидроксид – 100 г.

Реактив Фолина 1 н – 10 см³.

Альбумин (построение одного графика на всю группу студентов) – 0,2 г.

Тритон X-100, 0,05 % раствор – 100 см³.

Принцип анализа

Метод Шактерле основан на реакции Лоури, одной из наиболее чувствительных реакций на белки. Реагируя с реактивом Фолина, содержащий соли фосфорно-18-вольфрамомолибденовой кислоты, белки образуют комплексы, окрашенные в синий цвет. Интенсивность окраски зависит от концентрации белков, поэтому реакция Лоури используется для количественного определе-

¹⁹ Разработано на основе (Shakterle, 1973).

ния. Если белок предварительно обработать солями меди, то интенсивность окраски, даваемой им с реактивом Фолина, на много возрастает.

Подготовка к анализу

Приготовление реактивов:

1) среда выделения. Добавляют в одну колбу последовательно: 50 см³ 0,1 М буфер трис-НСl с рН = 8; 101,5 мг MgCl₂ × 6 H₂O (1 мМ); 57,5 мг ЭДТА (трилон Б) (0,3 мМ);

2) медно-щелочной реактив Фолина. В 100 см³ воды растворяют (обязательно в указанной последовательности): 80 мг CuSO₄ × 5 H₂O (0,32 мМ); 100 мг К-Na-виннокислый (сегнетова соль) (0,35 мМ); 10,0 г Na₂CO₃ (94 мМ); 2,0 г NaOH (50 мМ). Раствор хранится в холодильнике не более 5 дней;

3) рабочий раствор реактива Фолина. Раствор готовят в день анализа непосредственно перед использованием. К 0,5 см³ 1 н реактива Фолина добавляют 4 см³ воды (1 : 8), в мерной колбе доводят объем до 100 см³ дистиллированной водой;

4) свежий раствор альбумина. Используют для построения калибровочного графика. 10 мг альбумина растворяют в 10 см³ дистиллированной воды, получают раствор с концентрацией 1 мг/см³. Хранят в холодильнике не более 3 дней. Калибровочные растворы готовят последовательным разбавлением более концентрированного раствора в два раза: 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 и 0,0125 мг/см³.

Ход анализа

1. Выделение белка: маленькие абсолютно сухие фарфоровые ступки с пестиками помещают в кювету, наполовину заполненную водой, а затем – в морозильную камеру (до образования льда). На каждый вариант необходима одна ступка.

2. Выделение растворимого белка: растительный материал (если корни, то их предварительно промывают водой) навеской 300 мг сырого веса растереть в ступке при добавлении среды выделения, конечный объем которой не должен превышать 4 см³. Для этого сначала пипеткой (дозатором) добавляют 0,5 см³, растереть, а затем смыть в центрифужную пробирку. Центрифугировать необходимо в холоде, можно центрифугу поставить в холодильник, если нет рефрижераторной центрифуги, при 15 тыс. оборотах в минуту в течение 15–20 мин. Супернатант слить в стеклянные пробирки. Его можно хранить до двух дней в морозильной камере.

3. Выделение мембранносвязанного белка: к осадку, который остался после центрифугирования, добавляют 6 см³ 0,05 % раствора тритона X-100. Вы-

держивают при комнатной температуре 5 мин. Затем центрифугируют в течение 15–20 мин при 15 тыс. оборотах в минуту. Супернатант слить и хранить в морозильной камере, но лучше использовать сразу.

4. Проведение реакции:

1) на каждый вариант необходимо 3 стеклянных пробирки (повторности). Перед проведением реакции супернатант растворимой и мембранносвязанной фракции разбавляют в 20 раз средой выделения или дистиллированной водой. Конечный объем пробы – 1 см^3 ($0,05\text{ см}^3$ белка + $0,95\text{ см}^3$ воды). В качестве контроля на спектофотометре используют вместо белка среду выделения;

2) добавить в каждую пробирку, в том числе в контроль, по 1 см^3 медно-щелочного реактива и оставить на 10 мин;

3) после добавить по 4 см^3 рабочего раствора реактива Фолина, пробирки поместить на водяную баню при $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 5 мин. Результат реакции – появление синеватой окраски;

4) развитие окраски останавливают, погружая пробирки в холодную воду ($10\text{ }^{\circ}\text{C}$);

5) оптическую плотность опытной пробы измеряют против контрольной на спектофотометре при длине волны 650 нм;

6) провести ту же реакцию с раствором альбумина, построить градуировочный график. Во всех расчетах не забывать учитывать разбавление белка.

Лабораторная работа № 18.
Определение содержания SH-групп
в молекулах белков в растениях спектрофотометрическим
методом с реактивом Элмана²⁰

Одним из известных способов защиты растений от вредного влияния ТМ является биосинтез низкомолекулярных белков и пептидов, обогащенных SH-группами (металлотионеинов и фитохелатинов). Металлсвязывающие белки и пептиды синтезируются в норме в незначительном количестве. Их содержание в клетке резко возрастает при действии ТМ и снижается в случае уменьшения их концентрации в питательном субстрате. Металлотионеины имеют низкую молекулярную массу (до 10 кД) и характеризуются высоким содержанием цистеина (около 30 %). В настоящее время выделено три типа металлотионеиноподобных генов растений, продукты которых различаются по расположению остатков цистеина.

Фитохелатины имеют общую структуру $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, где $n = 2\text{--}11$ и называются также металлотионеинами III класса. Известно, что синтезирующая их фитохелатинсинтаза напрямую активируется тяжелыми металлами.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы аналитические – 1 шт.

pH-метр – 1 шт.

Термостатируемая водяная баня – 1 шт.

Бюкс стеклянный – 8 шт.

Колба мерная вместимостью 50 и 100 см³ с пробками – 16 шт.

Мерный цилиндр вместимостью 50 см³ – 4 шт.

Воронка стеклянная диаметром 36 мм – 8 шт.

Стеклянная пробирка вместимостью 10–15 см³ (для проведения реакции) – 42 шт.

Штатив для пробирок – 8 шт.

Секундомер (таймер) – 8 шт.

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы стеклянные с толщиной оптического слоя 1 см – набор.

Пипетка градуированная вместимостью 0,5, 1, 5 см³ – 8 шт.

Груша резиновая – 8 шт.

Соляная кислота, 1 н раствор – 1 дм³.

Трис(гидроксиметил)аминометан – 5 г.

Додецилсульфат натрия – 24 г.

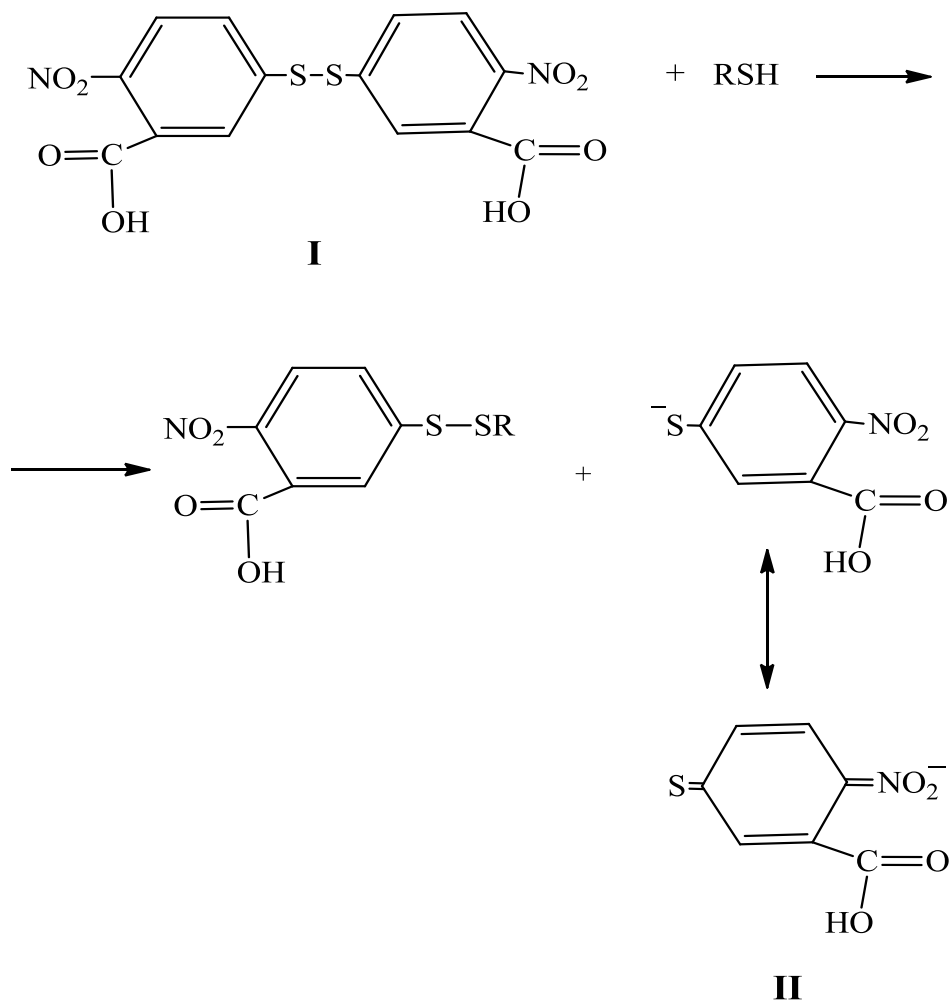
Реактив Элмана – 0,1 г.

Восстановленный глутатион-SH – 5 г.

²⁰ Разработано на основе (Rice-Evans et al., 1991).

Принцип анализа

Реактив Эллмана, или 5,5'-дителиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ, DTNB) (I), может вступать в реакцию с SH-группами белков и пептидов. Образующийся 5-тио-2-нитробензойный анион (II) имеет интенсивную окраску желтого цвета. На этом основано количественное определение SH-групп в растворимых и высокополимерных соединениях клетки:



Хиноидную форму (II) 2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты определяют спектрофотометрически при длине волны равной 412 нм. Интенсивность окрашивания раствора зависит от концентрации аналита.

Подготовка к анализу

1. Приготовление 0,1 М трис-HCl буфера pH = 7,8–8,0 (буфер 1). Этот буфер используют для приготовления среды выделения и реакционной среды при определении общего количества растворимых SH-групп и мембранно-связанных SH-групп. Для буфера необходим трис(гидроксиметил)аминометан и 0,1 н HCl (готовят из фиксанала): 1,21 г трис + 50 см³ дистиллированной воды; 30 см³ 0,1 н HCl. Растворы смешивают, корректируют pH, конечный объем доводят до 100 см³ дистиллированной водой.

2. Приготовление 0,25 М трис-HCl буфера pH = 7,5 (буфер 2). На этом буфере растворяют реактив Элмана, 3,025 г трис + 50 см³ дистиллированной воды; 40,3 см³ 0,1 н HCl. Растворы смешивают, корректируют pH, конечный объем доводят до 100 см³ дистиллированной водой.

3. Додецилсульфат натрия (SDS) – 1 г на 10 см³ дистиллированной воды (10 % раствор).

4. Раствор реактива Элмана (DTNB) – 8 мг (50 мкМ) растворить в 4 см³ 0,25 М трис-HCl буфере pH = 7,5. Для лучшего растворения нагревают на водяной бане при 37 °С.

5. Глутатион-SH – 500 мкг/см³. Раствор необходим для построения калибровочной кривой (готовят непосредственно к каждому опыту). Из этого раствора готовят разведения концентрацией 250; 100; 50; 25; 10; 5 мкг/см³. Калибровочные растворы готовят на том же буфере, что был использован для выделения белка.

Ход анализа

1. К 0,3 см³ раствора белка добавить 0,3 см³ 10 % раствора SDS и перемешать. Приготовить контрольную пробу (без белка): к 0,3 см³ буфера 1 прибавить 0,3 см³ SDS.

2. Добавить во все пробы 3 см³ буфера 1.

3. Измерить оптическую плотность при 412 нм (D_0). Содержимое пробирки осторожно перелить в кювету, чтобы не потерять количество.

4. В пробы с белком добавить 0,3 см³ DTNB, в контрольную пробу добавить 0,3 см³ буфера 1. Перемешать содержимое пробирок, инкубировать в течение 1 ч на водяной бане при 37 °С.

5. После инкубации измерить оптическую плотность (D_1) против контрольной на спектрофотометре при длине волны 412 нм. Для расчета количества SH-групп используют разность $D_1 - D_0 = D$.

6. Для перевода A в концентрацию SH-групп (мкг/см³) строят калибровочный график по глутатиону-SH. Реакцию с DTNB проводят так же, как с опытными пробами, только вместо супернатанта используют раствор глутатиона.

Лабораторная работа № 19.

Спектрофотометрическое определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях²¹

Аскорбиновая кислота (аскорбат, витамин С) хорошо растворима в воде и представляет собой бесцветное кристаллическое вещество. Аскорбиновая кислота содержится в фруктах и овощах (апельсин, капуста, лимон, лук, перец, роза морщинистая, рябина обыкновенная, черная смородина и др.).

Суточная потребность человека в аскорбиновой кислоте составляет 70–100 мг. Недостаток аскорбиновой кислоты вызывает заболевание – цингу; наблюдаются изменения со стороны соединительной ткани; нарушаются процессы костеобразования и деятельность сердца.

Аскорбиновая кислота играет очень важную роль: оказывает существенное влияние на многие физиологические процессы растений, включая рост, дифференциацию тканей и органов и метаболизм. Функция аскорбата – восстановление многих свободных радикалов и минимизация разрушительных воздействий окислительного стресса.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Весы лабораторные – 1 шт.

Весы аналитические – 1 шт.

Фарфоровая ступка диаметром 100 см³ с пестиками – 8 шт.

Стаканы химические вместимостью 50, 100 см³ – 8 шт.

Палочка стеклянная – 8 шт.

Пробирка мерная вместимостью 10 см³ – 24 шт.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 5, 10 см³ – 8 шт.

Груша резиновая – 8 шт.

Цилиндр мерный вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Колбы мерные вместимостью 50 и 100 см³ – 8 шт.

Штатив для пробирок – 8 шт.

Центрифуга – 1 шт.

Спектрофотометр – 1 шт.

Кюветы кварцевые с толщиной оптического слоя 1 см – набор.

Метафосфорная кислота, 2 % раствор – 300 см³.

Ортофосфат натрия, 24,8 % раствор – 200 см³.

Принцип анализа

Метод основан на экстрагировании аскорбиновой кислоты раствором метафосфорной кислоты, взаимодействии гомогената с фосфатом натрия с последующем определении оптической плотности раствора.

²¹ Разработано на основе (Hewitt et al., 1961).

Подготовка к анализу

На дистиллированной воде готовят: а) метафосфорную кислоту – 2 г растворяют в 100 см³ (2 раствор); б) Na₃PO₄ – 33 г фосфата натрия растворяют в 100 см³. Из полученных растворов готовят смесь кислоты и фосфата в объемном соотношении 3 : 2.

Ход анализа

1. Растительный материал (0,3–0,5 г сырых листьев) гомогенизируют с 3 см³ 2 % раствора метафосфорной кислоты.

2. Гомогенат переносят в мерную пробирку и доводят смесью HPO₃ и Na₃PO₄, взятых в объемном соотношении 3 : 2 (рН = 7,3–7,4) до 10 см³.

3. Экстракт центрифугируют 15 мин при 3000 оборотах в минуту. Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при 265 нм относительно стандарта – вышеуказанных растворов HPO₃ и Na₃PO₄, взятых в том же соотношении (3 : 2).

Обработка результатов анализа

Результаты вычисляют по формуле, используя коэффициент молярной экстинкции для аскорбиновой кислоты при 265 нм по формуле 26:

$$AK = \frac{D_{265} \times V}{1,655 \times 10^4 \times m}, \quad (26)$$

где AK – содержание аскорбиновой кислоты, мМ аскорбата/г сырого веса;
1,655 × 10⁴ – коэффициент молярной экстинкции аскорбата, моль⁻¹ × см⁻¹;
D₂₆₅ – оптическая плотность опытного раствора при длине волны 265 нм;
V – объем пробы общий, см³;
m – масса навески сырого растительного материала, г.

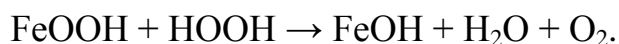
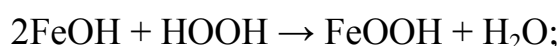
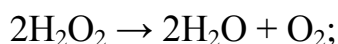
Для пересчета содержания аскорбиновой кислоты в мг на грамм сырого веса необходимо умножить соответствующее значение на коэффициент, равный величине молекулярной массы аскорбиновой кислоты (M_r = 176).

Лабораторная работа № 20.

Определение активности каталазы в растениях²²

Физические и химические свойства ферментов обусловлены их белковой природой: они термолабильны, способны высаливаться и дают характерные для белка качественные реакции. Активность ферментов очень сильно зависит от pH среды, присутствия электролитов и других веществ, активирующих или наоборот ингибирующих их действие. Различные загрязнители вызывают изменения ферментативной деятельности. Например, под влиянием кислых газов (сернистый газ, углекислый газ и др.) при невидимых повреждениях листьев происходит изменение активности ферментов в клетках вследствие подкисления и нарушения ионного режима, метаболизма и накопления балластных и, возможно, токсических продуктов.

Каталаза широко распространена в растительных тканях. Она обнаружена во всех аэробнодышащих клетках и у некоторых факультативных анаэробов. Подобно пероксидазе и цитохромоксидазе каталаза относится к Fe-порфириновым ферментам. Сущность каталитического действия каталазы состоит в разложении пероксида водорода с выделением молекулярного кислорода. Реакция с участием каталазы требует двух молекул пероксида водорода, из которых одна действует как донор, а другая – как акцептор электронов. Механизм каталитической реакции можно представить следующим образом:



Пероксид водорода, образующийся в обменных реакциях, в известных концентрациях для клетки токсичен, в связи с чем нельзя недооценивать роль каталазы, активирующей процесс разложения пероксида водорода с образованием воды и неактивного кислорода.

Аппаратура, материалы и реактивы (расчет на 8 студентов)

Мерный цилиндр вместимостью 100 см³ – 8 шт.

Нож керамический – 4 шт.

Весы лабораторные – 4 шт.

Фарфоровая ступка диаметром 100 см³ с пестиком – 8 шт.

Центрифуга – 1 шт.

Центрифужная пробирка вместимостью 5 см³ – 8 шт.

²² Разработано на основе (Аebi, 1971).

Морозильная камера – 1 шт.
Спектрофотометр – 1 шт.
Кюветы с толщиной оптического слоя 1 см – набор.
Весы лабораторные – 1 шт.
Весы аналитические – 1 шт.
Баня водяная – 4 шт.
Плитка электрическая – 4 шт.
Термостатируемая водяная баня – 1 шт.
Секундомер – 8 шт.
Стаканы химические вместимостью 50, 100 см³ – 8 шт.
Палочка стеклянная – 8 шт.
Пробирка мерная вместимостью 10 см³ – 24 шт.
Пипетки вместимостью 0,2, 1, 5, 10 см³ – 8 шт.
Груша резиновая – 8 шт.
Цилиндр мерный вместимостью 100 см³ – 8 шт.
Колбы мерные вместимостью 50 и 100 см³ – 8 шт.
Штатив для пробирок – 8 шт.
Пероксид водорода, 33 % раствор – 100 см³.
Моногидрофосфат натрия, 0,2 М раствор – 500 см³.
Дигидрофосфат натрия, 0,2 М раствор – 500 см³.
Стеклянный песок.

Принцип анализа

За основу определения активности каталазы принят метод *Aebi* (1971) с некоторыми изменениями.

Подготовка к анализу

Приготовление реактивов:

1) среда выделения представляет 0,1 М фосфатный буфер pH = 6,8–7,0. Для приготовления буфера в мерную колбу на 200 см³ вносят 49–61 см³ 0,2 М раствора Na₂HPO₄ и 59–61 см³ 0,2 М раствора NaH₂PO₄, доводят объем до метки дистиллированной водой;

2) реакционную среду готовят на 0,1 М фосфатном буфере pH = 6,8–7,0. На 50 см³ буфера необходимо 0,03 см³ пероксида водорода (H₂O₂, 33 %).

Ход анализа

1. Выделение фермента. Растительный материал (0,5 г сырых листьев) растирают на льду в ступке с небольшим количеством (1,5–2 см³) 0,1 М фосфатного буфера pH = 6,8–7,0 и с добавлением стеклянного песка. Гомогенат переносят в центрифужную пробирку, обмывая ступку небольшим (0,5 см³) количеством буфера. Общий объем использованного буфера составляет 5 см³. Гомогенат цен-

трифугируют в течение 20 мин (15 000 об./мин при 4 °С). Супернатант переносят в чистую пробирку, помещенную в стакан со льдом, для предотвращения потери активности. Его используют как фермент при проведении реакции. В таком виде супернатант при необходимости хранят в холодильнике не более 2 ч.

2. Проведение реакции. Активность каталазы определяют в кюветах для спектрофотометра при температуре 30 °С. Все растворы хранят в термостатированной ванне. В кювету (объем 3 см³) приливают 2,8 см³ реакционной среды. Реакцию запускают добавлением 0,2 см³ супернатанта. Смесь быстро встряхивают и измеряют на спектрофотометре изменение оптической плотности при длине волны 240 нм каждые 10 с в течение 2–3 мин. В контрольную пробу вместо супернатанта добавляют равный объем буфера.

Показания снимают аналогичным способом. В опытном и контрольном вариантах определения проводят трехкратно.

Обработка результатов анализа

Полученные данные используют для расчета скорости падения максимума поглощения в интервале времени, соответствующем линейному участку кривой, при длине волны 240 нм ($tg = \Delta D/t$).

Для перехода от тригонометрической функции (тангенса) к абсолютным единицам активности фермента используют формулу 27:

$$AK = \frac{(tg_0 - tg_k) \times V_n}{0,036 \times C_6}, \quad (27)$$

где АК – активность каталазы, мкМ Н₂О₂/мг белка × мин;

tg₀ – $\Delta D/t$ для опытной пробы;

tg_к – $\Delta D/t$ для контрольной пробы;

V_п – общий объем пробы (3 см³);

0,036 мМ⁻¹ × см⁻¹ – коэффициент экстинкции Н₂О₂;

C₆ – содержание белка в пробе, мг.

Количество растворимого белка в супернатанте определяют по Шактерле (лабораторная работа № 17). Активность каталазы можно рассчитать и другим способом, также через D₂₄₀, приняв, что изменение D₂₄₀ на одну единицу соответствует 25 мкМ Н₂О₂.

Отчет

Отчет по проделанной лабораторной работе включает:

- 1) описание основных этапов анализа;
- 2) представление статистической обработки результатов;
- 3) краткое обсуждение результатов (сравнение значений измеряемых показателей в опытных вариантах со значениями в контрольном варианте).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1

Предельно допустимый уровень содержания нитратов в различных фруктах и овощах

(Согласно постановлению Главного государственного санитарного врача РФ
от 14 ноября 2001 г. N 36 «О введении в действие санитарных правил»
(с изменениями от 31 мая, 20 августа 2002 г., 15 апреля 2003 г.)

Овощи	Нитраты, мг/кг
Картофель	250
Капуста белокочанная ранняя	900
Капуста белокочанная поздняя	500
Морковь ранняя	400
Морковь поздняя	250
Петрушка, укроп, шпинат	2000
Свекла столовая	1400
Лук репчатый	80
Перец сладкий	200
Кабачки	400
Арбуз	60
Томаты	150–300
Огурцы	150–400
Дыня	90
Виноград	60
Яблоки, груши	60

Таблица 2

Предельно допустимый уровень содержания ЗВ в воздухе рабочей зоны (ГН 2.2.5.686-98)

Вещество	ПДК, мг/м ³
Азота оксид(IV) (NO ₂)	2
Азота оксид(II) (NO)	5
Аммиак (NH ₃)	20
Ацетон (CH ₃ COCH ₃)	200
Бензин (в пересчете на гексан)	300
Керосин	300
Метанол (CH ₃ OH)	5
Сероводород (H ₂ S)	10
Серы оксид(IV) (SO ₂)	10

Вещество	ПДК, мг/м ³
Углерода оксид(II) (CO)	20
Уксусная кислота (CH ₃ COOH)	5
Формальдегид (НСОН)	0,5
Хлор (Cl ₂)	1
Хлороводород (HCl)	5
Этанол (C ₂ H ₅ OH)	1000

Таблица 3

**Максимальное количество нитрита и хлорида натрия
в колбасах различных видов и сортов**

Изделие	Содержание, % не более			Нитрит, мг/ 100 грамм продукта
	влага	соль	крахмал	
1	2	3	4	5
Колбасы вареные				
<i>высшего сорта</i>				
Русская	65	2,4	—	5
Столичная	53	2,8	—	5
Любительская	60	2,4	—	5
Диабетическая	65	2,2	—	5
Докторская	65	2,2	—	5
Молочная	65	2,2	—	5
Телячья	55	2,4	—	5
<i>первого сорта</i>				
Диетическая	75	2,2	—	5
Ветчинно-рубленая	63	3	—	5
Свиная	63	3	2	5
Столовая	65	2,3	—	5
Московская	68	2,4	—	5
<i>второго сорта</i>				
Чайная	75	3	5	5
Закусочная	75	3	5	5
Полукопченая				
<i>высшего сорта</i>				
Армавирская	45	4,5	—	5
Краковская	45	4,5	—	5
Охотничьи колбаски	35	4,5	—	5
<i>первого сорта</i>				
Минская	52	4,5	2,7	5
Одесская	48	4,5	—	5
Свиная	50	4,5	—	5
<i>второго сорта</i>				
Польская	50	4,5	—	5

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5
Полтавская	55	4,5	2,8	5
Варено-копченые				
Деликатесная	43	5	—	5
Московская	43	5	—	5
Сырокопченые				
Брауншвейгская	27	6	—	3
Московская	30	6	—	3
Польская	27	6	—	3
Свиная	25	6	—	3
Сервелат	30	6	—	3
Сосиски				
Любительские	65	2,1	—	5
Молочные	65	2,1	—	5
Свиные	65	2,1	—	5
Сливочные	70	2,1	—	5
Говяжьи	70	2,1	—	5
Сардельки				
Свиные	65	2,3	3	5
Говяжьи	65	2,3	—	5

Примечание: прочерк обозначает отсутствие данных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биотест-системы для задач экологического контроля [Текст] : метод. рекомендации по практ. использованию стандартизован. тест-культур / В. А. Терехова [и др.]. – Москва : Доброе слово, 2014. – 48 с.
2. ГН 2.2.5.1313-03. Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны : [Электронный ресурс]. – Прин. 30.04.2003 ; действ. с 15.06.2003 // Российская газета. – 2003. – № 119/1. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
3. О введение в действие межгосударственного стандарта [Электронный ресурс] : приказ Росстандарта от 21.08.2015 № 1183-ст. – Действ. с 01.01.2017. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
4. ГОСТ 8558.1-78. Продукты мясные. Методы определения нитрита [Электронный ресурс] : с Изменениями № 1, 2. – Прин. 16.11.1978 ; действ. с 01.01.1981. – Москва : Стандартиформ, 2010. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
5. ГОСТ 12.1.014-84. ССБТ. Воздух рабочей зоны. Метод измерения концентраций вредных веществ индикаторными трубками [Электронный ресурс] : с Изменением № 1. – Прин. 14.12.1984 ; действ. с 01.01.1986. – Москва : Стандартиформ, 2010. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
6. ГОСТ 22567.7-87. Средства моющие синтетические. Метод определения массовой доли фосфорнокислых солей [Электронный ресурс]. – Прин. 17.12.1987 ; действ. с 01.01.1989. – Москва : Изд-во стандартов, 1988. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
7. ГОСТ 22567.10-93. Средства моющие синтетические. Методы определения массовой доли активного кислорода [Электронный ресурс]. – Прин. 10.10.1995 ; действ. с 01.01.1996. – Москва : Изд-во стандартов, 1996. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
8. ГОСТ 30255-2014. Мебель, древесные и полимерные материалы. Метод определения выделения формальдегида и других вредных летучих химических веществ в климатических камерах [Электронный ресурс]. – Прин. 07.09.2014 ; действ. с 01.07.2015. – Москва : Стандартиформ, 2014. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
9. Применение тетразольно-топографического метода определения дегидрогеназной активности цианобактерий в загрязненных средах [Текст] / Л. И. Домрачева [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – № 2. – С. 23–28.
10. Лукаткин, А. С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений [Текст] / А. С. Лукаткин, В. С. Голованова // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, Вып. 4. – С. 773–780.

11. Муравьева, Д. А. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего [Текст] / Д. А. Муравьева, В. Н. Бубенчикова, В. В. Беликов // Фармация. – 1987. – Т. 36, № 5. – С. 28–29.
12. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, Т 16.1:2.3:3.8-04. Токсикологические методы анализа. Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных экстрактов почв, отходов, осадков вод по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» [Электронный ресурс]. – Действ. с 10.09.2004. – Москва : Министерство природных ресурсов Российской Федерации, 2010. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
13. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06, Т 16.1:1:2.3:3.9-06. Токсикологические методы контроля. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета [Электронный ресурс]. – Прин. 10.10.2014. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
14. Рогожин, В. В. Практикум по биохимии [Текст] : учеб. пособие / В. В. Рогожин. – Санкт-Петербург : Лань, 2013. – 544 с.
15. Скугорева, С. Г. Основы токсикологической химии [Текст] : учеб. пособие / С. Г. Скугорева, А. И. Фокина ; ВятГГУ. – Киров, 2010. – 157 с.
16. ТУ 4215-002-00211145-2003. Аспиратор сильфонный АМ-5М [Электронный ресурс]. – Прин. 25.09. 2008. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
17. Ацетилсалициловая кислота [Электронный ресурс] : ФС от 29.10.2015 № ФС 2.1.0006.15. – Действ. с 01.01.2016 // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Т. III. - Изд. XIII. – 2015. – Доступ из норматив.-техн. системы «Техэксперт».
18. Шлык, А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев [Текст] / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. – Москва : Наука, 1971. – С. 154–171.
19. Чеснокова, С. М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды [Текст] : учеб. пособие. В 2 ч. Ч. 2. Методы биотестирования / С. М. Чеснокова, Н. В. Чугай ; Владим. гос. ун-т. – Владимир, 2008. – 92 с.
20. Aebi, H. E. Catalases [Text] / H. E. Aebi // Methods of Enzymatic Analysis. – 1971. – Vol. 3. – P. 273–286.
21. Hewitt, E. J. Spectrophotometric Measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues [Text] / E. J. Hewitt, G. J. Dickes // The Biochemical Journal. – 1961. – Vol. 78, № 2. – P. 384–391.

22. Rice-Evans, C. A. Techniques in free radical research [Text] / A. T. Diplock, M. C. R. Symons, C. A. Rice-Evans // Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. – 1991. – Vol. 22. – P. 1–291.

23. Shacterle, T. R. A simplified method for the quantities assay of small amounts of protein in biological material [Text] / T. R. Shacterle, R. L. Pollack // Analytical Biochemistry. – 1973. – Vol. 51, № 2. – P. 654–655.

Учебное издание

Фокина Анна Ивановна
Скугорева Светлана Геннадьевна
Товстик Евгения Владимировна

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТОКСИКОЛОГИИ (ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ)

Учебно-методическое пособие

Авторская редакция
Технический редактор М. Н. Котельников

Подписано в печать 08.05.2018. Печать цифровая. Бумага для офисной техники.
Усл. печ. л. 4, 83. Тираж 36 экз. Заказ № 5133.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Вятский государственный университет».

610000, г. Киров, ул. Московская, 36, тел.: (8332) 74-25-63, <http://vyatsu.ru>