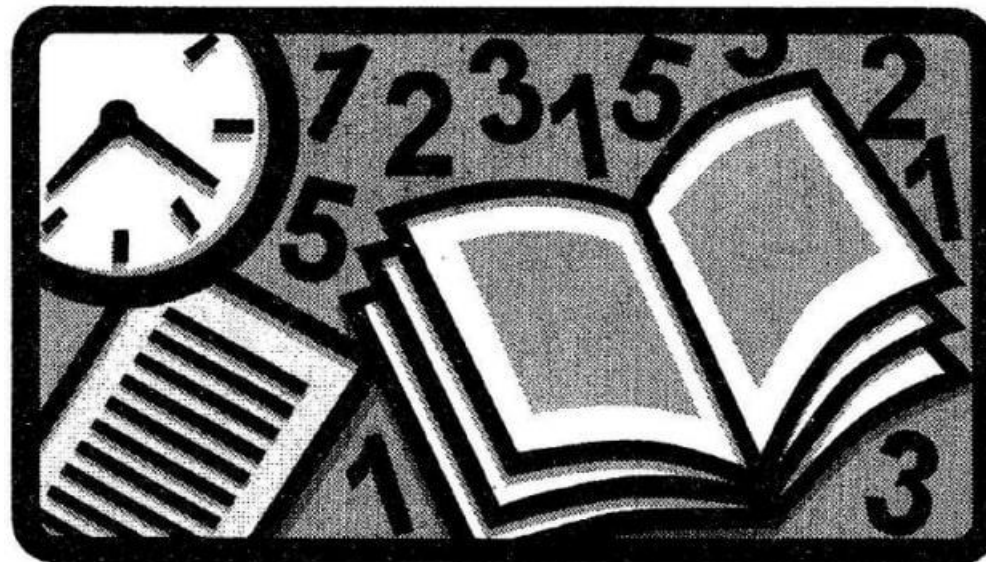


## РОБОЧИЙ ЖУРНАЛ 2

З ТОКСИКОЛОГІЧНОЇ ТА СУДОВОЇ ХІМІЇ  
СТУДЕНТА(ТКИ) КУРСУ ГРУПИ

---



Дата

**ТЕМА: ГРУПА РЕЧОВИН, ІЗОЛЮВАНИХ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПОЛЯРНИМИ РОЗЧИННИКАМИ («ЛІКАРСЬКІ ОТРУТИ»)**

**ЗАГАЛЬНІ ТА СПЕЦИФІЧНІ МЕТОДИ ІЗОЛЮВАННЯ:**

**1. Ізолювання водою, підкисленою щавлевою кислотою (метод А. А. Васильєвої)**

Подрібнений об'єкт (органи трупа) поміщають у колбу або склянку і заливають подвійним об'ємом (щодо наважки) дистильованої води, потім підкислюють суміш 10% розчином щавлевої кислоти до рН 2-3 за універсальним індикаторним папером. Після двогодинного настоювання при постійному помішуванні суміші отримують водні вилучення, який проціджують через подвійний шар марлі. Операцію настоювання повторюють протягом години з одинарним об'ємом підкисленої води. Проціджені кислі водні вилучення об'єднують, поміщають у розподільну лійку і тричі струшують з окремими порціями хлороформу (15, 10, 10 мл). Хлороформні вилучення об'єднують і фільтрують через невеликий паперовий фільтр, попередньо змочений хлороформом, у суху колбу з написом "Кислі хлороформні вилучення". Водний шар у ділильній лійці підлужнюють 25% розчином аміаку до рН 8-9 за універсальним індикаторним папером і знову збовтують тричі з окремими порціями хлороформу (15, 10, 10 мл). Хлороформні вилучення об'єднують, фільтрують, як описано вище, у колбу з написом "Лужні хлороформні вилучення". Під час вилучення отрут хлороформом з лужних водних вилучень утворюються стійкі емульсії, для руйнування яких можна застосувати центрифугування вмісту воронки або додавання до суміші безводного натрію сульфату.

**2. Ізолювання етанолом, підкисленим щавлевою кислотою (метод Стаса-Отто)**

Подрібнений об'єкт (органи трупа) поміщають у склянку або банку, заливають 96% етанолом до утворення дзеркальної поверхні, суміш підкислюють 10% спиртовим розчином щавлевої кислоти до рН 2-3 за універсальним індикаторним папером і залишають на добу при періодичному помішуванні. Після закінчення зазначеного терміну кислі спиртові вилучення відокремлюють, фільтруючи через змочений етанолом паперовий фільтр. Операцію вилучення повторюють 2-3 рази. Спиртові кислі вилучення об'єднують і випарюють на водяній бані за 40-50°C до густоти сиропу. Сиропоподібну рідину обробляють 96° етанолом, приливаючи його по краплях доти, доки етанол не перестане викликати помутніння рідини. Осаду дають відстоятися і потім відфільтровують його через невеликий фільтр (діаметр 5-6 см), попередньо змочений спиртом. Фільтр промивають невеликою кількістю спирту. Фільтрат згущують у фарфоровій чашці на водяній бані до густоти сиропу і знову повторюють операцію осадження. Так роблять доти, доки етанол не перестане

осаджувати білки. Потім вилучення знову випарюють на водяній бані до густини сиропу, залишок розчиняють у 25-30 мл теплої дистильованої води і каламутний розчин фільтрують через невеликий гладкий фільтр, змочений водою, в розподільчу воронку. Водно-спиртовий розчин екстрагують тричі хлороформом порціями по 15, 10 і 10 мл. Хлороформні вилучення фільтрують через фільтр, змочений хлороформом, у суху колбу з написом "Кислі хлороформні вилучення".

Водний залишок у ділильній лійці підлужнюють 25% розчином аміаку до рН 8-9 за універсальним індикаторним папером і знову проводять екстракцію хлороформом, як описано вище. Об'єднані хлороформні вилучення поміщають у суху колбу з написом "Лужні хлороформні вилучення".

**3. Ізолювання водою, підкисленою сірчаною кислотою (метод В. Ф. Крамаренка)**

100 г подрібненого біологічного матеріалу поміщають у колбу або склянку, заливають 0,01 М розчином сірчаної кислоти до утворення дзеркальної поверхні. Якщо рН розчину після перемішування вмісту колби вищий, ніж 2,5, то додають по краплях 20 % розчин сірчаної кислоти: до зазначеного значення рН. Суміш залишають на 2 год, періодично збовтуючи. Після закінчення цього часу водні вилучення відокремлюють і проціджують через марлю. Операцію вилучення проводять тричі. Кислі вилучення збирають разом і центрифугують. Надосадову рідину зливають, а осад знову заливають 20-30 мл 0,01 М розчину сірчаної кислоти (рН 2,5), перемішують, настоюють 2 год, після чого вилучення центрифугують. Центрифугати об'єднують, насичують сульфатом амонію і залишають на 1-2 год. Якщо утворився осад, його відокремлюють центрифугуванням. Звільнену від білків кислу рідину двічі витягують ефіром порціями по 40 мл. Ефірний шар відокремлюють, а до водного вилучення додають 20% розчин гідроксиду натрію до рН 8,5-9 і проводять тричі екстракцію речовин основного характеру окремими порціями хлороформу, що дорівнюють третій частині об'єму водної фази. Хлороформні вилучення об'єднують, фільтрують через сухий фільтр, а потім розчинник відганяють на водяній бані за температури 40-50°C насухо. Залежно від поставленого завдання сухий залишок розчиняють у 5-6 мл хлороформу або в 10 мл 0,1 М розчину хлороводневої кислоти і проводять дослідження на алкалоїди. За необхідності досліджують і ефірні вилучення, отриманий з кислого водного вилучення, на речовини, що екстрагуються з кислого водного середовища органічним розчинником.

**4. Ізолювання ацетоном (метод Карташова В. А.)**

5 г гомогенізованої тканини внутрішніх органів поміщають у пенігіліновий флакон місткістю 20 мл, додають 5 мл ацетону; суміш перемішують, закривають поліетиленовим корком і збовтують на автоматичному струшувачі протягом 10 хв. Потім вміст флакона центрифугують 5 хв при 2500 об/хв і надосадову рідину зливають через невеликий ватний тампон у флакон місткістю 30 мл. Операцію вилучення повторюють ще 3 рази. До об'єднаних ацетонових вилучень додають 20 мл 0,5 М розчину хлороводневої кислоти та витягують 2 рази н-гексаном по 10 мл. Органічну фазу відокремлюють і відкидають. З придатної фази речовини екстрагують ефіром 2 рази по 10 мл. Ефірні екстракти об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр і випарюють під струмом теплого повітря насухо. Сухий залишок досліджують на речовини кислотного характеру. Водну фазу підлужнюють до рН 11, додають 5 г хлориду натрію і екстрагують 2 рази ефіром по 10 мл. Ефірні екстракти об'єднують, фільтрують, розчинник випарюють, сухий залишок досліджують на речовини основного характеру.

#### **5. Експрес-метод ізолювання похідних фенотіазину підкисленим ацетонітрилом (метод Є. М. Саломатіна)**

50 г подрібненого біологічного матеріалу поміщають у колбу, підкислюють 10 % розчином хлороводневої кислоти до рН 2-3 і проводять екстракцію отрут 100, 50 і 50 мл ацетонітрилу протягом 30, 15 і 15 хв із використанням механічного струшувача. Ацетонітрильні вилучення фільтрують через зволожений дистильованою водою паперовий фільтр у розподільну лійку, що містить 500 мл 2,5% водного розчину сульфату натрію. Вміст ділильної воронки перемішують до утворення гомогенного розчину, підкислюють 6 М розчином хлороводневої кислоти до рН 2,0-3,0 (за універсальним індикатором) і тричі по 10 хв екстрагують порціями ефіру по 100 мл. Кислий водно-ацетонітрильний розчин, що залишився після екстракції ефіром, підлужнюють насиченим водним розчином гідроксиду натрію до рН 13 за універсальним індикаторним папером і тричі екстрагують по 10 хв порціями ефіру по 100 мл. Ефірні екстракти упарюють під вакуумом на роторному випаровувачі за 40°C до об'єму 35-40 мл і фільтрують у мірну колбу місткістю 50 мл через паперовий фільтр діаметром 5-6 см, що містить 1,5-2 г безводного сульфату натрію. Випарну колбу і фільтр промивають 10-15 мл ефіру, який приєднують до фільтрату в мірній колбі. Вміст колби доводять до мітки і досліджують.

#### **6. Ізолювання барбітуратів підлуженою водою (метод Вало́ва)**

До 100 г подрібненого біологічного матеріалу додають воду і 10% розчин гідроксиду натрію (180 і 20 мл відповідно). Суміш перемішують і залишають на 30 хв за періодичного помішування, потім проціджують і центрифугують протягом 30 хв за 3000 об/хв. До центрифугату додають 120 мл 10% розчину вольфрамату натрію і 0,5 М розчин сірчаної кислоти до рН 2. Після чого суміш нагрівають протягом 20 хв на

киплячій водянній бані, а потім центрифугують протягом 30 хв. Центрифугат проціджують через ватний тампон, зливаючи з осаду. Тампон промивають 10 мл води, приєднуючи її до процідженого центрифугату. До кислого вилучення додають рівний об'єм ефіру і збовтують протягом 15 хв. Органічну фазу відокремлюють і збовтують із 50 мл 10% розчину гідроксиду натрію, після чого відокремлюють водний шар, підкислюють його 25% розчином сірчаної кислоти до рН 2 і збовтують із рівним об'ємом ефіру. Відокремлюють ефірний шар і проводять з ним аналіз екстракту на барбітурати.

#### **7. Ізолювання барбітуратів водою, підкисленою сірчаною кислотою (метод В. І. Попової)**

100 г подрібненого біологічного матеріалу (печінка, нирки, мозок) заливають 0,01 М розчином сірчаної кислоти (80 мл), рідину доводять 30% розчином сірчаної кислоти до рН 2,0-3,0 і залишають на 2 год при періодичному помішуванні. Потім вилучення зливають, операцію настоювання з підкисленою водою повторюють ще 2 рази по годині, заливаючи об'єкт новими порціями 0,01 М сірчаної кислоти (по 80 мл). Вилучення об'єднують, проціджують через 3 шари марлі, вимірюють об'єм, потім центрифугують (3000-5000 об/хв) протягом 20-30 хв. 25 або 50 мл центрифугату вносять у колонку (40 x 2,5 см), заповнену гелем сефадекса G-25 (розмір часток у сухому стані 100-300 мкм). На поліетиленовій трубці в нижній частині колонки відкривають затискач: внесена в колонку вилучення вбирається гелем (над гелем має залишатися невеликий шар рідини). Після цього в колонку двічі вносять по 2 мл 0,01 М розчину сірчаної кислоти, щоразу відкриваючи затискач.

Для елюювання барбітуратів колонку з'єднують зі встановленою вище посудиною, заповненою 0,01 М розчином сірчаної кислоти, і відкривають затискач внизу колонки. Перші 150 мл елюату відкидають, а наступні 200 мл переносять у ділильну лійку, куди додають 50 мл хлороформу; вміст лійки збовтують 10 хв. Екстракцію новими порціями хлороформу проводять ще 2 рази. Хлороформні вилучення об'єднують, випарюють при 40°C насухо і досліджують.

#### **8. Ізолювання метаболітів похідних 1,4-бенздіазепіну (метод Б. М. Ізотова зі співавторами)**

До 25 г гомогенізату органа додають 6 М розчин хлороводневої кислоти у співвідношенні 1:2 і проводять гідроліз об'єкта в колбі зі зворотним холодильником на гліцериновій бані за температури 140-145°C протягом 60 хв. Гідролізат центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв, фільтрують і екстрагують тричі порціями 50, 25, 25 мл сумішню хлороформ-пентанол (9:1). Органічну фазу відокремлюють у мірну колбу на 100 мл, фільтруючи через шар безводного сульфату натрію, і доводять до мітки, після чого досліджують на бензофенони (продукти метаболізму похідних 1,4-бенздіазепіну).

## Заняття №

Дата

**ТЕМА: СПРЯМОВАНЕ І НЕСПРЯМОВАНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ "КИСЛИХ" ХЛОРОФОРМНИХ ВИЛУЧЕНЬ (ПОХІДНІ БАРБІТУРОВОЇ ТА САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ, ПІРАЗОЛОНУ, ПУРИНУ)**

### **ТШХ-"скринінг" (один із варіантів) речовин, що потрапляють у "кислі" хлороформні вилучення**

#### **1 етап (у загальних системах розчинників)**

На хроматографічну пластинку із закріпленим шаром силікагелю наносять у три точки, які відстають одна від одної на відстані 2 см, 0,1-0,2 мл екстракту, еквівалентного вилучення з 1-2 г органа. Пластину з пробами поміщають у камеру, на дні якої міститься система розчинників ацетон-хлороформ (1:9). Після розвитку хроматограми та висушування пластини проводять прояв окремих хроматографічних смуг (проб після розділення речовин). Закривши 2 і 3 смуги, першу смугу обробляють послідовно 5% розчином сульфату ртуті й потім 0,1% розчином дифенілкарбазону в хлороформі. За наявності барбітуратів з'являються плями, забарвлені в синьо-фіолетовий або червоно-фіолетовий колір. Потім закривають 1 і 3 смуги, а другу обробляють 10% розчином хлориду феруму (III). За наявності похідних піразолону з'являються забарвлені плями: блакитні, сині, синьо-фіолетові, червоно-фіолетові; саліцилової кислоти - синьо-фіолетові. Після цього закривають смуги 1 і 2, а третю обробляють реактивом Драгендорфа, а потім 10% розчином сірчаної кислоти. За наявності речовин слабоосновного характеру (кофеїн, амідопірин, антипін, діазепам, нітразепам) утворюються помаранчеві, помаранчево-коричневі, жовто-помаранчеві плями.

Оцінка результатів аналізу. За відсутності вищевказаних кольорових плям дослідження "кислого" хлороформного екстракту закінчують, за позитивного результату продовжують аналіз.

Залежно від передбачуваних сполук у пробі екстракту далі виконують підтверджувальний етап ТШХ-"скринінгу" в приватних системах розчинників зі свідком.

#### **2 етап (у приватних системах розчинників)**

Умови ТШХ-"скринінгу" барбітуратів:

Система: хлороформ-н-бутанол-25% розчин гідроксиду амонію (70:40:5); сорбент: силікагель КСК, забуферований 0,033 М розчином борної кислоти; свідок: циклобарбітал, кількість проб, які наносяться, - дві (одна для прояву, друга для елюювання).

Умови ТШХ-"скринінгу" кофеїну і похідних піразолону:

Система: ацетон-циклогексан (5:1); сорбент: основний окис алюмінію; свідок: залежно від забарвлення на хроматограмах із розчином хлориду феруму (III) - за стійкого червоного антипін, за фіолетового, який зникає, - амідопірин, за рожевого - 4-монометиламіноантипін (продукт метаболізму анальгін). При утворенні забарвлених плям тільки з одним модифікованим реактивом Драгендорфа як свідка використовують кофеїн.

Оцінка результатів аналізу. За позитивного результату підтверджувального етапу ТШХ-"скринінгу" виконують хімічні реакції і знімають спектри поглинання виявленої речовини в УФ-області.

№	Методика дослідження	Спостереження	Хімізм реакції	Хіміко-токсикологічна оцінка реакції
1.	<p><b><u>Хімічні методи дослідження</u></b> <i>Саліцилової кислоти</i></p> <p><b><u>Реакція утворення трибромфенолу</u></b> До залишку після видалення хлороформу у фарфоровій чашці додають кілька крапель дистильованої води, перемішують і додають 2-3 краплі насиченого розчину бромної води.</p>			
2.	<p><b><u>Реакція забарвлення з розчином хлориду окисного феруму</u></b> До залишку після видалення хлороформу у порцеляновій чашці додають 1 краплю свіжоприготованого розчину хлориду окисного феруму. На фільтрувальний папір поміщають 1 краплю свіжоприготованого розчину хлориду окисного феруму і підсушують. Потім на те саме місце наносять 1-2 краплі досліджуваного хлороформного вилучення.</p>			
3.	<p><i>Самостійна робота</i></p> <p><b><u>Реакція утворення метилсацілату</u></b> У пробірку поміщають кілька крапель досліджуваного хлороформного вилучення, випаровують за слабкого нагрівання на водяній бані й до залишку додають 2-3 краплі концентрованої сірчаної кислоти, 2-3 краплі метилового спирту й нагрівають на водяній бані. З'являється характерний запах метилового ефіру саліцилової кислоти.</p>			
1.	<p><b><i>Похідні барбітурової кислоти (барбітал, барбаміл, фенобарбітал)</i></b></p> <p><b><u>Загальні реакції барбітуратів</u></b></p> <p><b><u>Реакція з аміачним розчином нітрату або ацетату кобальту</u></b> На папірець, оброблений 1% спиртовим розчином нітрату кобальту наносять краплю хлороформного вилучення, висушують. Потім обкурюють парами аміаку (підносячи до горла склянки, що містить концентрований аміак).</p>			

2.	<p><b><u>Реакція виділення кислотної форми барбітуратів</u></b></p> <p>На предметне скло нашаровують кілька крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини, видаляючи хлороформ за кімнатної температури. Наступну краплю нашаровують після випаровування попередньої.</p> <p>Сухий залишок розчиняють у краплі концентрованої сірчаної кислоти. Через 3-5 хвилин поруч із цією краплею поміщають одну краплю дистильованої води, після чого їх обережно з'єднують за допомогою капіляра. Через 10-20 хвилин, а за малих кількостей барбітурату через 1-2 години, спостерігають появу кристалічного осаду, характерного для кожного окремого барбітурату.</p> <p>Описати форми кристалів і замалювати їх для кожного барбітурату.</p>			
3.	<p><b><u>Приватні реакції барбітуратів</u></b></p> <p><b><u>Реакція з хлорцинкйодом</u></b></p> <p>До сухого залишку на предметному склі (після видалення хлороформу) додають краплю розчину хлорцинкйоду. Через 10-15 хвилин під мікроскопом спостерігають утворення кристалічних осадів. Якщо осад довго не утворюється, до крапель на предметних скельцях додають 1-2 кристали вогняного йоду і препарати знову через 10-15 хвилин розглядають під мікроскопом.</p> <p>Замалювати форму кристалів для кожного з барбітуратів із хлорцинкйодом.</p>			
4.	<p><b><u>Реакція із залізойодидним комплексом</u></b></p> <p>До сухого залишку на предметному склі додають одну краплю залізойодидного комплексу; через 10-15 хвилин спостерігають утворення характерних зростків кристалів. Якщо кристалічний осад виходить занадто рясним, реакційну суміш обережно випарюють на предметному склі на полум'ї спиртівки, а до сухого залишку додають потім краплю дистильованої води. Через 10-15 хвилин препарат знову розглядають під мікроскопом.</p> <p>Замалювати форму отриманих кристалів для кожного з барбітуратів.</p>			
5.	<p><b><u>Реакція з міднойодидним комплексом</u></b></p> <p>До сухого залишку досліджуваної речовини на предметному склі додають одну краплю міднойодидного комплексу. Через 10-15 хвилин спостерігають утворення кристалічних осадів.</p> <p>Замалювати форму отриманих кристалів.</p>			

1.	<p><i>Похідні пурину (кофеїн)</i></p> <p><b>Загальна реакція</b></p> <p><b><u>Реакція утворення мурексиду</u></b></p> <p>5-6 крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини поміщають у порцелянову чашечку і розчинник випаровують без нагрівання. До сухого залишку додають 0,5-1 мл насиченого розчину бромної води і випарюють на водяній бані насухо. До забарвленого в буруватий колір залишку підносять на скляній паличці одну краплю 25% розчину аміаку.</p>			
2.	<p><b><u>Реакція з реактивом Несслера</u></b></p> <p>Розчин кофеїну з реактивом Несслера нагрівають протягом 1-2 хв на киплячій водяній бані.</p>			
1.	<p><i>Похідні піразолону (антипірін, анальгін)</i></p> <p><b>Антипірін</b></p> <p><b><u>Реакція з хлоридом феруму (III)</u></b></p> <p>У порцелянову чашку вносять кілька крапель хлороформного вилучення, яку випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 5% розчину хлориду феруму (III).</p>			
2.	<p><b><u>Реакція утворення нітросоантипірину</u></b></p> <p>У порцелянову чашку вносять 3-5 мл хлороформного вилучення, яку на водяній бані випарюють насухо. Сухий осад розчиняють у 3-5 краплях води, додають 2-4 краплі 10% розчину сірчаної кислоти і 2-3 краплі насиченого розчину нітриту натрію.</p>			
3.	<p><i>Самостійна робота</i></p> <p><b><u>Реакція утворення азобарвника</u></b></p> <p>У пробірку вносять 2-5 крапель хлороформного вилучення з кислого середовища, яку випарюють на водяній бані насухо. До сухого залишку додають 1-2 краплі води. До отриманого розчину додають краплю крижаної оцтової кислоти і краплю 5% розчину нітриту калію. Суміш залишають на 5 хвилин при періодичному збовтуванні. Потім у пробірку вносять невелику кількість азиду натрію. Після припинення виділення бульбашок газу додають 3-4 кристалики <math>\alpha</math>-нафтиламіну і нагрівають пробірку на водяній бані 1-2 хв.</p>			

1.	<p><b>Анальгін</b> <b><u>Реакція з хлоридом феруму (III)</u></b> У порцелянову чашку вносять кілька крапель хлороформного вилучення, яку випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 5% розчину хлориду феруму (III).</p> <p><b><u>Проба з лігніном</u></b> 2-3 краплі досліджуваного хлороформного розчину послідовно наносять в одну точку на шматочок газетного паперу. Спостерігають характерне забарвлення, яке різко посилюється під час обробки плями розведеною хлороводневою кислотою.</p>			
----	--	--	--	--



Заняття №

Дата

**ТЕМА: СПРЯМОВАНЕ ТА НЕСПРЯМОВАНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ "ЛУЖНОГО" ХЛОРОФОРМНОГО ВИЛУЧЕННЯ НА АЛКАЛОЇДИ (ПОХІДНІ ТРОПАНУ, ПІРИДИНУ ТА ПІПЕРИДИНУ)**

**ТШХ-"скринінг" (один із варіантів) речовин, що потрапляють у "лужні" хлороформні вилучення**

Умови ТШХ-"скринінгу": нанесення проб екстракту проводиться так, як описано для "кислого" хлороформного вилучення; система для попереднього етапу ТШХ-"скринінгу": хлороформ-діоксан-ацетон-25% розчин гідроксиду амонію (45:47,5:5:2,5). Проявники для окремих проб (смуг): 10% розчин сірчаної кислоти в етанолі для похідних фенотіазину (червоні, блакитні плями); 10% розчин хлориду феруму (III) для похідних піразолону і фенотіазину (червоне, синє, блакитне забарвлення плям); реактив Драгендорфа для всіх сполук, які містять третинний азот (оранжево-коричневе забарвлення плям).

Оцінка результатів аналізу. За відсутності характерних плям на хроматограмах дослідження закінчують. При утворенні забарвлених плям з однаковим значенням Rf після прояву всіма названими реактивами виконують підтверджувальний етап ТШХ-"скринінгу" на похідні фенотіазину; з реакцією Драгендорфа та розчином хлориду феруму (III) на похідні піридину і піперидину, хіноліну, ізохіноліну, тропану, індолу, а також на похідні 1,4-бенздіазепіну і п-амінобензойної кислоти.

**Умови підтверджувального етапу ТШХ-"скринінгу"**

Для алкалоїдів: система хлороформ-діетиламін (9:1); сорбент силікагель КСК; проявник реактив Драгендорфа.

№	Методика дослідження	Спостереження	Хімізм реакції	Хіміко-токсикологічна оцінка реакції
1.	<p><u>Підтверджувальні дослідження на речовини, що потрапляють у "лужні" хлороформні вилучення</u>  <b>Похідні піридину і піперидину (анабазин, нахікарпін)</b>  <b>Анабазин</b>  <b><u>Реакція з реактивом Драгендорфа</u></b>                      На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі і випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і краплю реактиву Драгендорфа. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом.</p>			
2.	<p><b><u>Реакція з пікриновою кислотою</u></b>                      На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і краплю 0,5% розчину пікринової кислоти. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом.</p>			

3.	<b><u>Реакція з 1% розчином солі Рейнеке</u></b> На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого осаду додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і краплю свіжоприготованого розчину 1% розчину солі Рейнеке. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом.			
1.	<b><u>Пахікарпін</u></b> <b><u>Реакція з розчином йоду в йодиді калію (реактив Бушарда)</u></b> На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої 1-2 краплі розчину йоду в йодиді калію. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.			
2.	<b><u>Реакція з пікриною кислотою</u></b> На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої 1-2 краплі розчину пікринової кислоти. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.			
3.	<b><u>Реакція з роданідним комплексом кобальту</u></b> На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої 1-2 краплі розчину роданідного комплексу кобальту. Через 5-10 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.			
1.	<b><u>Похідні тропану (атропін, скополамін, кокаїн)</u></b> <i>Загальна реакція (крім кокаїну)</i> <b><u>Реакція Віталі-Морена</u></b> До сухого хлороформного залишку у порцеляновій чашці додають кілька крапель концентрованої нітратної кислоти й обережно випарюють насухо на водяній бані. Цю операцію повторюють не менше 3 разів, охолоджують. Потім до залишку додають свіжоприготований спиртовий розчин гідроксиду калію. Спостерігають характерне забарвлення.			

2.	<p><i>Підтверджувальні реакції</i></p> <p><b>Атропін</b> <b>Реакція із сіллю Рейнеке</b></p> <p>На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого осаду додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і краплю свіжоприготованого розчину 1% розчину солі Рейнеке. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.</p>			
3.	<p><b>Реакція з пікриною кислотою</b></p> <p>На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого залишку додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої 1-2 краплі розчину пікринової кислоти. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом Кристали замалювати.</p>			
4.	<p><b>Скополамін</b> <b>Реакція із сіллю Рейнеке</b></p> <p>На предметне скло наносять 2-3 краплі розчину досліджуваної речовини в хлороформі й випарюють насухо. До сухого осаду додають краплю 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і краплю свіжоприготованого розчину 1% розчину солі Рейнеке. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.</p>			
5.	<p><b>Реакція утворення перманганату кокаїну</b></p> <p>Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поступово нашаровують на предметне скло; органічний розчинник випарюють без нагрівання, до залишку додають 1 краплю 10 % розчину кислоти хлороводневої. Рідину випаровують за кімнатної температури. Операцію повторюють 2-3 рази. Потім до сухого залишку додають 1 крап 1% розчину перманганату калію. Через 10-15 хв характерні кристали розглядають під мікроскопом. Кристали замалювати.</p>			

Заняття №

Дата

ТЕМА: СПРЯМОВАНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ "ЛУЖНИХ" ХЛОРОФОРМНИХ ВИЛУЧЕНЬ НА АЛКАЛОЇДИ (ПОХІДНІ ХІНОЛІНУ, ІЗОХІНОЛІНУ, ІНДОЛУ, АЦИКЛІЧНИЙ АЛКАЛОЇД ЕФЕДРИН)

№	Методика дослідження	Спостереження	Хімізм реакції	Хіміко-токсикологічна оцінка реакції
1.	<p><b>Похідні ізохіноліну (морфін, кодеїн)</b>  <i>Загальні реакції</i>  <b>Реакція з формальдегідом у концентрованій сульфатній кислоті (реактив Маркі)</b>  Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поміщають у порцелянову чашку, розчинник випаровують без нагрівання. До сухого залишку додають 1 краплю свіжоприготованого реактиву Маркі (1 крапля формаліну в 1 мл кислоти сульфатної).</p>			
2.	<p><b>Реакція з розчином молібдату амонію в концентрованій сульфатній кислоті (реактив Фреде)</b>  Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поміщають у порцелянову чашку, розчинник випаровують без нагрівання. До сухого залишку додають 1 краплю реактиву Фреде.</p>			
3.	<p><b>Реакція з ванадатом натрію в концентрованій сульфатній кислоті (реактив Манделіна)</b>  Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поміщають у порцелянову чашку, розчинник випаровують без нагрівання. До сухого залишку додають 1 краплю реактиву Манделіна.</p>			
4.	<p><b>Морфін</b>  <b>Реакція з хлоридом окисного феруму</b>  Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поміщають у чашку, розчинник випаровують без нагрівання. До сухого розчину додають 1 краплю свіжоприготованого розчину хлориду окисного феруму.</p>			
1.	<p><b>Похідні хіноліну (хінін)</b>  <b>Реакція флюоресценції</b>  Частину хлороформного досліджуваного розчину поміщають у пробірку, хлороформ випаровують при нагріванні на теплій водяній бані. До сухого залишку додають 1 мл дистильованої води та 1 мл 10% кислоти сульфатної. Характерну флюоресценцію спостерігають в УФ-світлі.</p>			

2.	<b><u>Реакція утворення таллейохіну (у крапельній модифікації Л.В. Пейсаховича)</u></b> На фільтрувальний папірець наносять 5-10 крапель хлороформного вилучення, пляму зволожують краплею води і піддають послідовній обробці парами бромної води (до появи жовтого забарвлення плями) і 25% розчином аміаку.			
1.	<b><u>Ациклічний алкалоїд ефедрин</u></b> <b><u>Реакція з розчином нінгідрину в н-бутанолі</u></b> На пластинку Силуфол наносять кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину, органічний розчинник випаровують без нагрівання. Потім додають розчин нінгідрину в н-бутанолі. Силуфолову пластинку нагрівають на піщаній бані до утворення характерного забарвлення.			
1.	<b><u>Похідні індолу (стрихнін)</u></b> <b><u>Реакція окиснення біхроматом калію в концентрованій кислоті сульфатній</u></b> 4-5 крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини поміщають у порцелянову чашку і після випаровування хлороформу до сухого залишку додають 1 краплю концентрованої кислоти сульфатної та невеликий кристал біхромату калію.			
2.	<b><u>Реакція з ванадатом натрію в концентрованій сульфатній кислоті (реактив Манделіна)</u></b> Кілька крапель досліджуваного хлороформного розчину поміщають у порцелянову чашку, розчинник випаровують без нагрівання. До сухого залишку додають 1 краплю реактиву Манделіна.			

### Заняття №

Дата

ТЕМА: СПРЯМОВАНЕ ТА НЕСПРЯМОВАНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ "ЛУЖНОГО" ХЛОРОФОРМНОГО ВИЛУЧЕННЯ НА СИНТЕТИЧНІ "ЛІКАРСЬКІ ОТРУТИ" (ПОХІДНІ 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІНУ, ФЕНОТІАЗИНУ, П-АМІНОБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ)

№	Методика дослідження	Спостереження	Хімізм реакції	Висновок
1.	<p><b>Похідні 1,4-бенздіазепіни</b>  <b>Методика проведення кислотного гідролізу</b>  2 мл хлороформного екстракту випарюють насухо в колбі на киплячій водяній бані. До сухого залишку додають 5 мл 6Н кислоти хлороводневої і вміст колби нагрівають зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані 60 хв. Гідролізат охолоджують, нейтралізують насиченим розчином натрію гідроксиду до рН 7-9. Отриманий розчин переносять у розподільну лійку й екстрагують рівним об'ємом хлороформу продукти гідролізату 1,4-бенздіазепінів-амінобензофенони. Органічну фазу відокремлюють, фільтрують через безводний натрію сульфат. Екстракт упарюють до об'єму 0,2 мл і досліджують. Після перенесення на хроматографічну пластинку розглядають в УФ-світлі.</p> <p><b>Реакція утворення азобарвника</b>  Хроматографічну пластинку послідовно обробляють реактивами: 1 % розчином нітриту натрію, потім 2 М розчином хлороводневої кислоти і лужним розчином β-нафтолу.</p>			
1.	<p><b>Похідні фенотіазину (аміназин, левомепромазин)</b>  <b>Реакція з концентрованою кислотою сульфатною</b>  4-5 крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини поміщають у порцелянову чашку і після випаровування хлороформу до сухого залишку додають 1 крап концентрованої кислоти сульфатної.</p>			
2.	<p><b>Реакція з концентрованою кислотою нітратною</b>  4-5 крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини поміщають у порцелянову чашку і після випаровування хлороформу до сухого залишку додають 1 краплю концентрованої кислоти нітратної.</p>			
3.	<p><b>Реакція з концентрованою кислотою хлороводневою</b>  4-5 крапель хлороформного розчину досліджуваної речовини поміщають у порцелянову чашку і після випаровування хлороформу до сухого залишку додають 1 краплю концентрованої кислоти хлороводневої.</p>			

1.	<b>Похідні п-амінобензойної кислоти (новокаїн)</b> Хлороформний екстракт переносять на хроматографічну пластину або папір в одну крапку, яку після висихання обробляють краплею 2 М розчину хлороводневої кислоти, потім краплею 1% розчину нітриту натрію, через 2-3 хв - краплею лужного розчину β-нафтолу.			
----	--	--	--	--

Заняття №

Дата

ТЕМА: КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ "ЛІКАРСЬКИХ ОТРУТ" В ЕКСТРАКТАХ З ОРГАНІВ ТРУПА

### Кількісне визначення аміназину з хлоридом феруму (ІІІ)

#### Реактиви:

1. 5 % розчин хлориду феруму (ІІІ).
2. Вода дистильована.
3. Екстракт із біологічного матеріалу, що містить аміназин (завдання).

#### Методика визначення

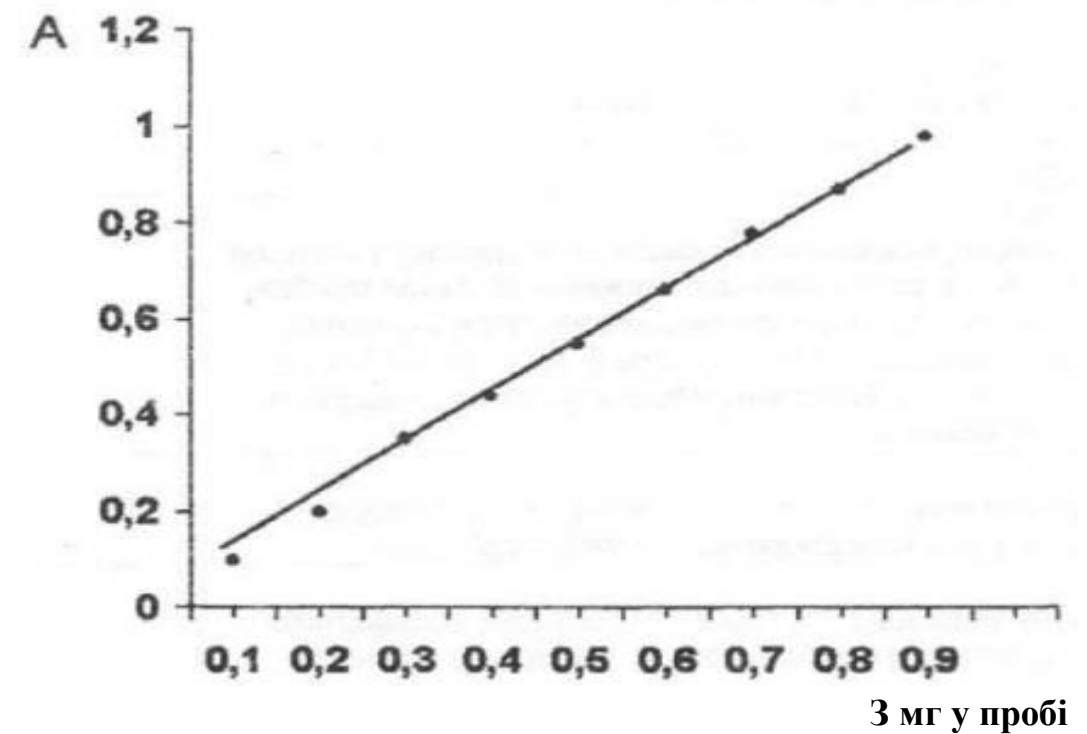
У пробірку вносять 5 мл водного екстракту, що містить аміназин, додають 1 мл 5 % розчину хлориду феруму (ІІІ) (безпосередньо перед вимірюванням). Перемішують. Пофарбований розчин переносять у кювету з товщиною шару 10 мм і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 за довжини хвилі 540 нм. Розчином порівняння слугує суміш 5 мл дистильованої води та 1 мл розчину хлориду феруму (ІІІ). За градувальним графіком визначають концентрацію аміназину в екстракті. Після цього за формулою визначають вміст аміназину в 100 г біологічного матеріалу.

$$X=C*20,$$

де X - вміст аміназину в 100 г біологічного матеріалу;

C - концентрація аміназину в пробі (об'єм пробі 5 мл).

Градувальний графік кількісного визначення аміназину



Заняття №

Дата

ТЕМА: ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН НА "ЛІКАРСЬКІ" ОТРУТИ ПРИ ГОСТРИХ ІНТОКСИКАЦІЯХ



**Об'єкти дослідження:** біологічні рідини, в яких передбачається вміст саліцилової кислоти, парацетамолу, аміназину, хініну, барбітуратів, кодеїну, похідних 1,4-бенздіазепіну.

№	Методика дослідження	Спостереження	Хімізм реакції	Висновок
I.	<u>Без ізолювання</u> <b>Саліцилова кислота та саліцилати</b>			
1.	До 1 мл сечі додають 3 краплі 5% розчину хлориду феруму (III).			
2.	<b>Парацетамол</b> До 1 мл сечі додають 2-3 краплі 10% розчину соляної кислоти й охолоджують. Потім до охолодженої суміші додають 2-3 краплі 1% розчину нітриту натрію і 2-3 краплі свіжоприготованого 1% розчину β-нафтолу в 10% розчині їдкого натру. Великий надлишок розчину β-нафтолу заважає цій реакції.			
3.	<b>Аміназин</b> До 1 мл сечі додають 1 мл реактиву ФПН (хлорид феруму (III), кислота хлорна, кислота нітратна).			
4.	<b>Хінін</b> До 2 мл сечі додають 3 мл 10% розчину сульфатної кислоти. В УФ-світлі спостерігають характерну флюоресценцію.			
II.	<u>Після ізолювання</u> <b>Барбітурати</b>			
1.	У ділильну лійку вносять 5 мл сечі, до якої по			

Заняття №

Дата

## ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ ХІМІЧНИХ РЕАКЦІЙ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ ГОСТРИХ ОТРУЄНЬ

**Об'єкти аналізу:** модельні хлороформні розчини атропіну, аміназину, амітриптиліну (1000 мкг/мл), 1% водний розчин пахікарпіну.

**Реактиви:** 1% водний розчин солі Рейнеке (тетрароданодіамінохроміату амонію)  $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{SCN})_4(\text{NH}_3)_2]$ ; 0,5% водний розчин пікринової кислоти, роданідний комплекс кобальту.

### Методика проведення аналізу для визначення чутливості хімічних реакцій (на прикладі пахікарпіну).

На предметне скло наносять 1 краплю 1% розчину пахікарпіну і додають 1 краплю роданідного комплексу кобальту, після чого з'єднують їх скляною паличкою. Якщо відразу ж не спостерігається утворення характерних кристалів, то предметне скло помістити у вологу камеру на 5-10 хвилин. Паралельно на предметне скло нанести краплю відповідного реактиву в якості контрольного досліду. Для визначення чутливості проводять низку послідовних розведень і встановлюють межу виявлення пахікарпіну, а потім за формулою розраховуємо граничне розведення.

### Результати та їх обговорення

Результати проведених досліджень внести в таблицю №1.

Граничне розведення розраховують за формулою:

$$C = \frac{V \cdot 10^6}{m},$$

де - V - об'єм краплі, мл (0,05 мл)

m - межа виявлення, м

C - граничне розведення.

Таблиця 1

Показники чутливості мікрокристалоскопічної реакції пахікарпіну з роданідним комплексом кобальту

Речовина (хімічна формула)	Реактив	Форма кристалів	Чутливість	
			Межа виявлення, мкг	Предельное разбавление

**Методика проведення аналізу для визначення специфічності хімічних реакцій.**

Як об'єкти дослідження використовують хлороформні розчини атропіну, аміназину, амітриптиліну. На предметне скло наносять 2-3 краплі досліджуваного хлороформного розчину, хлороформ упарюють насухо за кімнатної температури. До сухого залишку додають 1 краплю 0,1 М кислоти хлороводневої та 1 краплю відповідного реактиву (1% розчин солі Рейнеке, пікринову кислоту). Якщо відразу ж не спостерігається утворення характерних кристалів, то предметне скло поміщають у вологу камеру на 5-10 хвилин. Паралельно на предметне скло наносять краплю відповідного реактиву як контрольний дослід. Результати досліджень заносять у таблицю №2.

Таблиця 2

Результати специфічності мікрокристалоскопічних реакцій азотовмісних лікарських препаратів

№	Препарат (хімічна формула препарату)	Реактив	Характеристика осаду (аморфний, кристалічний)	Форма кристалів

1.	Аміназин	Сіль Рейнеке		
2.	Атропін	Сіль Рейнеке		
3.	Амітриптилін	Сіль Рейнеке		
4.	Аміназин	Пікринова кислота		
5.	Атропін	Пікринова кислота		
6.	Амітриптилін	Пікринова кислота		

За даними таблиці визначити найбільш специфічні реакції для лікарських препаратів, придатні для експрес-аналізу гострих отруень.

Висновок:

Заняття №

\_\_\_\_\_  
Дата

**ТЕМА: ЗАСТОСУВАННЯ ТШХ-МЕТОДУ ПРИ ПРОВЕДЕННІ СКРИНІНГУ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ**

**Об'єкти дослідження:** хлороформні екстракти із сечі, в яких передбачається вміст хініну, новокаїну, аміназину, саліцилової кислоти, антипірину; стандартні хлороформні розчини хініну, новокаїну, аміназину, саліцилової кислоти, антипірину.

**Реактиви та оснащення:** хроматографічні пластинки ВЕТШХ або Сорбфіл; системи розчинників: хлороформ-ацетон (9:1), хлороформ-ацетон-ізопропанол-25% розчин аміаку (7:7:7:2); проявники: реактив Драгендорфа, 5% розчин феруму хлориду (III). Хроматографічні камери, капіляри.

**Методика проведення аналізу для речовин кислого, нейтрального та слабоосновного характеру.** На хроматографічну пластинку наносять аналізовані екстракти (завдання) і стандартні розчини аміназину, антипірину, саліцилової кислоти. Платівку з пробами поміщають у камеру, на дні якої знаходиться система розчинників хлороформ-ацетон (9:1). Після розвитку хроматограми та висушування пластинки, її обробляють 5% розчином феруму хлориду (III) (за наявності речовин кислого, нейтрального, слабоосновного характеру з'являються плями характерного кольору). Розрахувати значення Rf.

**Методика проведення аналізу для речовин основного характеру.** На хроматографічну пластинку наносять аналізовані екстракти (завдання) і стандартні розчини аміназину, хініну і новокаїну. Платівку з пробами поміщають у камеру, на дні якої міститься система розчинників хлороформ-ізопропанол-ацетон-25% розчин аміаку (7:7:7:2). Після розвитку хроматограми та висушування пластинки, її обробляють реактивом Драгендорфа (за наявності речовин основного характеру з'являються оранжево-бурі плями). Розрахувати значення Rf.

Результати проведених хроматографічних досліджень замалювати (мал. 1, 2) і занести до таблиць №1, 2.

**Таблиця 1**

**Результати ТШХ-дослідження екстрактів, що містять деякі речовини кислого, нейтрального та слабоосновного характеру**

Об'єкт дослідження	Система розчинників	Реактив-проявник	Колір плями, після обробки	Значення Rf
--------------------	---------------------	------------------	----------------------------	-------------

			<b>проявником</b>	

**Висновок:**

**Таблиця 2**

**Результати ТШХ- дослідження екстрактів, що містять деякі речовини основного характеру**

<b>Об'єкт дослідження</b>	<b>Система розчинників</b>	<b>Реактив-проявник</b>	<b>Колір плями, після обробки</b>	<b>Значення Rf</b>
---------------------------	----------------------------	-------------------------	-----------------------------------	--------------------

			<b>проявником</b>	

**Висновок:**

**Мал. 1. Схема нанесення проб аналізованих екстрактів і стандартних розчинів речовин кислого, нейтрального і слабоосновного характеру.**

**Мал. 2. Схема нанесення проб аналізованих екстрактів і стандартних розчинів речовин основного характеру.**

**Заняття №**

---

**Дата**



**ТЕМА: КІЛЬКІСНЕ ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ НАРКОТИЧНИХ ТА ОДУРМАНЮВАЛЬНИХ РЕЧОВИН З БРОМТИМОЛОВИМ СИНІМ І ВИБІР УМОВ ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ. ВИКОРИСТАННЯ РОЗРОБЛЕНОЇ МЕТОДИКИ В ЕКСПРЕС-АНАЛІЗІ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН**

Екстракційно-фотометричний метод аналізу ґрунтується на утворенні іонних асоціатів позитивно заряджених іонів азотовмісних органічних речовин і негативно заряджених іонів кислотних барвників. Іонні асоціати екстрагуються органічними розчинниками і забарвлюють органічну фазу, яку фотометрують з використанням фотоелектроколориметрів або спектрофотометрів.

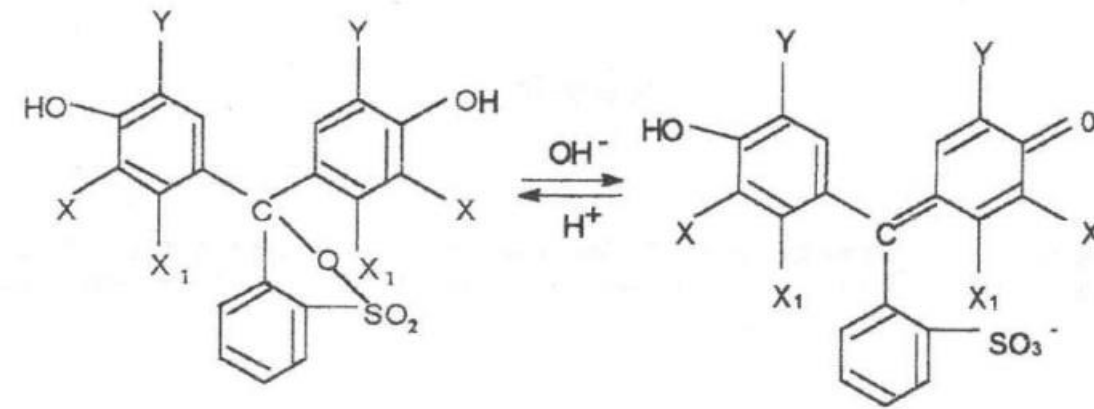
Для підвищення чутливості методу проводять руйнування іонних асоціатів розчинами лугів або кислот з подальшим посиленням забарвлення.

Екстракційна фотометрія характеризується високою чутливістю, надійністю, швидкістю, можливістю концентрувати мікрокількості препаратів, а також проводити аналіз без додаткового ретельного очищення, бо розчин порівняння - "холоста" проба.

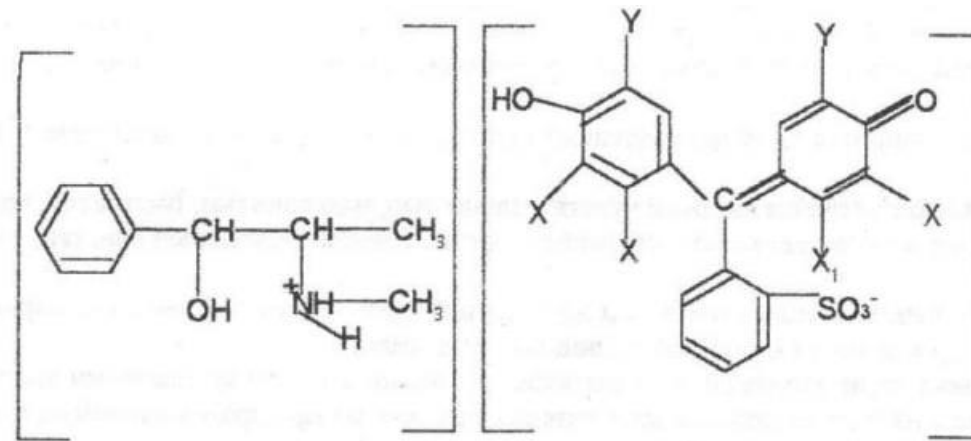
Серед кислотних індикаторів в аналізі наркотичних і одурманюючих препаратів основного характеру найчастіше використовують: метиловий помаранчевий, тропеолін ОО, сульффталеїнові барвники.

Здатність сульффталеїнових індикаторів утворювати іонні асоціати з лікарськими препаратами залежить від рН середовища, рН препарату і барвника, наявності та розташування заступників у молекулах препаратів і барвника, природи органічного розчинника.

Процес іонізації сульффталеїнових барвників:



Можливий склад іонного асоціату ефедрину та сульфопфталейнового індикатора:



В екстракційно-фотометричному аналізі широко використовують сульфопфталейнові барвники: бромтимоловий синій (ЕТС); бромфеноловий синій (БФС); тимоловий синій (ТС).

Замісники	БТС	БФС	ТС
X	-Br	-Br	-
X <sub>1</sub>	-CH <sub>3</sub>	-	-CH <sub>3</sub>
Y	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-Br	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

*Об'єкти аналізу:* стандартний водний розчин ефедрину гідрохлориду (200 мкг/мл).

*Реактиви:* 0,04% водні розчини БТС, БФС, ТС; фосфатний буферний розчин (рН 7,6); 0,02 М водний розчин гідроксиду.

*Оснащення:* фотоелектроколориметр КФК-2, розподільчі лійки.

#### Методика проведення аналізу

**I. Вибір найчутливішого індикатора** проводять у ділільних лійках, у які вносять 5 мл буферного розчину з рН 7,6; 1 мл 0,04% розчину індикатора, 1 мл стандартного розчину препарату і 5 мл хлороформу. Збовтують протягом 2-3 хвилин, відокремлюють хлороформний шар і вимірюють оптичну густина забарвленого в жовтий колір розчину на фотоелектроколориметрі КФК - 2, 2 мах  $440 \pm 10$  нм; кювета 10 мм; розчин порівняння - хлороформ. Результати вносять до таблиці 1.

#### Визначення чутливості індикатора

**Таблиця 1**

Індикатори	Оптична густина (А)
БТС	
БФС	
ТС	

На основі даних таблиці 1 вибрати найчутливіший індикатор, що утворює стійкі йонні асоціати, які легко екстрагуються хлороформом за рН 7,6.

**II Підвищення чутливості методики аналізу.** Жовте забарвлення екстракту зумовлене поглинанням однозарядженої форми барвника, який дисоціює за сульфогрупою. Для підвищення чутливості методу використовують 5 мл 0,02 М розчину гідроксиду натрію, під дією якого барвник переходить у водний розчин і забарвлює його в синій колір, оптична густина (А) цих розчинів має високе значення (таблиця 2).

Таблиця 2

Значення оптичної густини забарвлених водних і хлороформних розчинів

Вміст препарату в вихідному розчині, мкг/мл	Оптична густина забарвлених розчинів	
	Хлороформних (440 ± 10 нм)	Водних (590 ± 10 нм)
50		
100		

*Примітка:* розчин порівняння - суміш реактивів.

**III Вибір світлофільтра** проводиться за визначенням найбільшого значення оптичної густини розчинів різної концентрації. Результати вносять у таблицю 3.

**IV Вибір кювети.** Для розрахунку вмісту ефедрину гідрохлориду в розчинах використовують калібрувальний графік. Робоча довжина кювети впливає на кут нахилу калібрувального графіка до осі абсцис. Кювети підбирають так, щоб вимірювані оптичні густини вкладалися в інтервал значень від 0,1 до 1,0, що забезпечує достатню точність вимірювання величин оптичної густини. Для вимірювання використовувалися кювети з товщиною шару рідини 5,10 і 20 мм. Результати досліджень внести в таблицю 4.

Таблиця 3

Залежність величини оптичної густини забарвлених розчинів від використаного світлофільтра

$\lambda_{\text{эф. світлофільтра, нм}}$	Оптична густина забарвлених розчинів, отримана при вмісті препарату, мкг	
	50	100
$400 \pm 10$		
$440 \pm 10$		
$490 \pm 10$		
$540 \pm 10$		
$590 \pm 10$		
$670 \pm 10$		

Таблиця 4

Залежність величини оптичної густини забарвлених розчинів від товщини шару рідини

Взято препарату, мкг	Оптична густина розчинів з товщиною шару, мм		
	5	10	20
20			
50			

Висновок:

Дата

**ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ "ЛІКАРСЬКИХ" ОТРУТ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ**

**Імуноферментний метод аналізу на опіати**

№	Етапи імуноферментного аналізу	Схема перетворень
1.	Адсорбція модифікованого МБ ( зв'язаного з білком) на планшеті	$\begin{array}{c} \text{МБ} + \text{М} + \text{АТП} - \\ \underline{\text{МБАТП} + \text{МАТП}} \\ \downarrow \\ \text{відмивання кон'югату} \\ \underline{\text{МАТП}} \\ \downarrow \\ \text{МБАТП} + \text{H}_2\text{O}_2 + \\ \underline{+ \text{o-фенілендіамін}} \\ \downarrow \\ \text{Забарвлення, інтенсивність якого зменшується зі збільшенням вмісту морфіну в сечі} \end{array}$
2.	Промивання планшета	
3.	Внесення досліджуваних зразків сечі, які містять морфін (М)	
4.	Внесення антитіл мічених пероксидазою хрину (АТП) та інкубування	
5.	Промивання планшета	
6.	Внесення субстрату ( $\text{H}_2\text{O}_2$ + о-фенілендіамін)	
7.	Визначення оптичної густини забарвленого розчину	

Облік результатів аналізу

Результати аналізу оцінюють візуально, порівнюючи забарвлення лунок стандарту морфіну із забарвленням лунок у досліджуваних пробах, або спектрофотометрично за довжини хвилі 492 нм (плейтфотометр ІФКО-2).

Кількість морфіну в досліджуваних пробах визначають за градувальним графіком залежності середньої оптичної густини двох-трьох паралельних визначень від концентрації морфіну-стандарту в півлогарифмічних координатах: за віссю абсцис відкладають значення  $C$  ( $C$  - концентрація морфіну в нг/мл), за віссю ординат - відношення оптичної густини  $A/A_0$  ( $A$  - оптична густина стандартного розчину,  $A_0$  - оптична густина "сліпого" досліджу за відсутності морфіну).

Дані для побудови градувального графіка заносять у таблицю

Таблиця

Форма запису даних для побудови градувального графіка при ІФА

№	$C$ , нг/мл	$Lg C$	$A$	$A_0$	$A/A_0$
1.	500	2,7	0,40	0,88	0,47
2.	250				
3.	125				
4.	62				
5.	31				
6.	15				
7.	7,5	0,9	0,68	0,88	0,80

Виконати визначення вмісту опіатів методом ІФА в модельних зразках сечі при використанні градувального графіка.

Побудова градувального графіка





Дата

ТЕМА: СПЕКТРАЛЬНІ ТА ХІМІЧНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ОКСИДУ ВУГЛЕЦЮ (II) У КРОВІ  
ЗАЛІКОВЕ ЗАНЯТТЯ

№	Методика досліджень	Спостереження	Хімізм реакцій	Висновки
1.	<p><u>Спектральне дослідження крові</u></p> <p>Кров, що підлягає дослідженню, розбавляють водою доти, доки не буде отримано розчин, що має світло-рожеве забарвлення. При спектроскопічному дослідженні цього розчину чітко видно відповідні спектральні смуги.</p> <p>Спектр оксигемоглобіну крові має дві смуги поглинання між лініями Фраунгофера D і E при довжинах хвиль 577-589 і 536-556 нм. Спектр карбоксигемоглобіну має дві смуги поглинання при довжинах хвиль 564-579 і 523-536 нм.</p> <p>Після додавання одного об'єму свіжоприготованого розчину сульфиду амонію або інших відновників (гідразингідрат, дітїоніт натрію та ін.) до 4 об'ємів водного розчину досліджуваної крові оксигемоглобін перетворюється на дезоксигемоглобін, що має одну широку смугу поглинання при 543-596 нм. Карбоксигемоглобін не відновлюється сульфідом амонію та іншими відновниками. Тому після додавання відновників смуги поглинання карбоксигемоглобіну не зникають.</p>			

2.	<p><u>Хімічні методи дослідження</u></p> <p>Кров, що містить карбоксигемоглобін, від додавання певних реактивів не змінює або незначно змінює своє забарвлення, а нормальна кров, що не містить карбоксигемоглобіну, під впливом цих реактивів значно змінює своє забарвлення.</p> <p>2.1 Реакція з розчином їдкого натру (проба Гоппе-Зейнера).</p> <p>2.2 Реакція із сульфідом амонію (проба Сальковського-Катаяма).</p> <p>2.3 Реакція з хініном і сульфідом амонію (проба Хорошковича-Маркса).</p> <p>2.4 Реакція з гексаціано-(III)фератом калію і дихроматом калію (проба Сидорова).</p> <p>2.5 Реакція з гексаціано-(III)фератом калію (проба Бюркера).</p> <p>2.6 Реакція з гексаціано-(III)фератом калію та оцтовою кислотою (проба Ветцеля).</p> <p>2.7 Реакція з таніном (проба Кункеля-Ветцеля).</p>			
----	--	--	--	--

