

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ЦЕНТР СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ



Стандартные операционные процедуры
Методика экспертного исследования методом микродиффузии

СОСТАВИТЕЛЬ: Жуматаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно-медицинский эксперт высшей категории

Астана, 2016 год

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования методом микродиффузии
2. Шифр специальности методики	27.1
3. Информация об авторе (ах) (составителе (ях)) методики	Составитель: Жуматаева Г.С.
4. Сущность методики	<p>Для обнаружения исследуемых веществ методом микродиффузии применяют чашки Конвея или подобные им сосуды, в которых летучие вещества из исследуемых объектов сначала переходят в пространство прибора, а затем в соответствующий растворитель или в раствор реактивов, реагирующих с определяемыми веществами.</p> <p>Метод микродиффузии позволяет обнаружить летучие вещества, содержащиеся в небольших количествах исследуемых объектов.</p>
4.1 Экспертные задачи, решаемые методикой	Методика обнаружения отдельных летучих соединений: формальдегида, ацетона, метилового спирта, этилового спирта, сульфидов, фенолов, цианидов, оксида углерода (II)
4.2 Объекты исследования	Биологические жидкости и ткани внутренних органов, объекты не биологического происхождения (остатки жидкостей, одежда и т.п.)
4.3 Методы исследования	Химические реакции для определения токсических веществ в минимальных концентрациях.
4.4 Краткое поэтапное описание методики	<p>Методика обнаружения отдельных летучих соединений с помощью метода микродиффузии.</p> <p>Обнаружение формальдегида. Обнаружение альдегида уксусной кислоты. Обнаружение ацетона.</p>

<p>5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСМ МЮ РК</p>	<p>Обнаружение метилового спирта. Определение этилового спирта. Обнаружение сульфидов. Обнаружение фенолов. Обнаружение цианидов. Протокол № 1 от 07 «ноября» 2016г.</p>
<p>6. Информация о лице составившим паспорт методики</p>	<p>Составитель: Жуматаева Г.С. РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК», судебно- медицинский эксперт высшей категории</p>

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Область применения	6
3. Термины и обозначения	6
4. Основная часть	7
5. Заключение	10
6. Список использованных источников	10

1. Введение.

Метод микродиффузии широко используется в биохимических и некоторых токсикологических лабораториях для обнаружения химических соединений, имеющих большую упругость паров. Внедрение метода микродиффузии в практику химико-токсикологических лабораторий может облегчить выполнение ряда экспертиз, связанных с отравлениями некоторыми ядами.

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

Метод микродиффузии имеет ряд достоинств. Он позволяет обнаружить летучие вещества, содержащиеся в небольших количествах исследуемых объектов. При использовании этого метода не образуется пена (что возможно при перегонке летучих ядовитых веществ с водяным паром), определяемые вещества не подвергаются сильному разбавлению и т. д.

Скорость диффузии зависит от упругости пара исследуемого вещества, объема пробы, температуры, состава поглощающих жидкостей и т. д. На скорость перехода отдельных летучих веществ из исследуемых объектов в пространство прибора для микродиффузии влияют некоторые электролиты. Так, например, прибавление насыщенного раствора карбоната калия к крови, моче и гомогенатам тканей, содержащих этиловый спирт, ускоряет переход этого спирта в пространство прибора. Для ускорения перехода других соединений из исследуемых объектов в пространство прибора прибавляют кислоты, щелочи и др.

Прибор для микродиффузии (рис. 1) представляет собой небольшой круглый толстостенный сосуд 1 из стекла или пластмассы (наружный диаметр 60—70 мм, высота 10 мм). Внутри этого сосуда расположен второй круглый сосуд 2 меньшего размера (диаметр 30—35 мм, высота 5 мм). Таким образом, в приборе для микродиффузии имеется внутренняя круговая 3 и наружная кольцевая 4 камеры. Верхний край наружной камеры должен шлифоваться так, чтобы к нему плотно прилегала крышка 5.

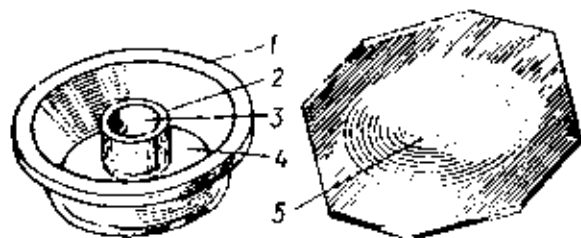


Рис. 1. Прибор для микродиффузии.

Для создания герметичности в приборе края наружной камеры слегка смазывают вазелином или силиконовой смазкой и плотно прижимают крышку.

2. Область применения.

Химико-токсикологическое исследование соответствующих объектов на наличие формальдегида, альдегида уксусной кислоты, ацетона, метилового спирта, сульфидов, фенолов, цианидов. Данные процедуры проводятся тогда, когда материалы дела указывают на возможность отравления этими веществами, а также в случае положительных результатов предварительных проб на указанные вещества газохроматографическим или другими методами в исследуемых объектах.

3. Термины и обозначения.

Диффузия (лат. *diffusio* — распространение, растекание, рассеивание, взаимодействие) — процесс взаимного проникновения молекул или атомов одного вещества между молекулами или атомами другого, приводящий к самопроизвольному выравниванию их концентраций по всему занимаемому объёму¹. В некоторых ситуациях одно из веществ уже имеет выравненную концентрацию и говорят о диффузии одного вещества в другое. При этом перенос вещества происходит из области с высокой концентрацией в область с низкой концентрацией (вдоль вектора градиента концентрации).

Исследуемые объекты вносят в наружную кольцевую камеру, а поглощающую жидкость — во внутреннюю камеру. К исследуемым объектам, находящимся в наружной камере прибора, на расстоянии 2—3 см помещают раствор вещества, способствующего переходу исследуемого соединения из объекта в пространство прибора. Затем прибор плотно закрывают крышкой и слегка наклоняют его для смешивания исследуемого объекта и раствора, способствующего переходу исследуемого вещества в пространство прибора. После этого прибор оставляют на определенное время, необходимое для диффузии. После окончания диффузии определяют исследуемое вещество в жидкости, находящейся во внутренней камере.

Окисление — это химический процесс, сопровождающийся увеличением степени окисления атома окисляемого вещества (восстановителя), посредством передачи одного или более электронов от атома восстановителя (донора электронов) к атому окислителя (акцептору электронов).

Окисление — потеря электронов окисляющимся веществом, причем электроны, отдаваемые атомами или молекулами окисляющегося вещества, присоединяются к атому или молекуле другого вещества, называемого окислителем. Таким образом, происходит окисление одного вещества и восстановление другого (реакция окисления-восстановления).

Восстановление, в химии, — это процесс, в результате которого частица (атом, ион или молекула) принимает один или несколько электронов; происходит понижение степени окисления какого-либо атома в данной частице;

органическое вещество теряет атомы кислорода и (или) приобретает атомы водорода.

Атом или ион, присоединяющий электроны, называется окислителем. Вещество, в состав которого входят такие атомы или ионы, также называется окислителем.

« (числовое значение) М раствора» - молярный раствор содержит 1 грамм-молекулярный вес (1 моль) растворенного вещества в литре раствора.

4. Операционные процедуры.

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

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

4.2. Обнаружение альдегида уксусной кислоты. Наружную и внутреннюю камеры прибора заполняют так, как и при обнаружении формальдегида методом микродиффузии. Время микродиффузии 4 ч.

Через 4 ч в пробирку вносят 1 мл жидкости, взятой из внутренней камеры прибора, прибавляют 9 мл воды, 1 каплю 4 %-го раствора сульфата меди, 6 мл концентрированной серной кислоты и 0,2 мл 1 %-го раствора п-гидроксидифенила в 0,5 н. растворе гидроксида натрия. После прибавления каждого реактива жидкость в пробирке хорошо взбалтывают, затем пробирку нагревают в течение 1,5 мин на кипящей водяной бане и охлаждают. При наличии альдегида уксусной кислоты в исследуемых объектах жидкость приобретает фиолетовую окраску. Такую же окраску дает и формальдегид.

4.3. Обнаружение ацетона. Заполнение наружной и внутренней камеры производят так, как при исследовании формальдегида. Время микродиффузии 4 ч.

После окончания микродиффузии из внутренней камеры прибора берут 1 мл жидкости и переносят ее в пробирку, в которую прибавляют 9 мл воды, 4 мл 40 %-го раствора гидроксида натрия, 1 мл 20 %-го свежеприготовленного раствора салицилового альдегида в этиловом спирте. Пробирку в течение трех минут нагревают на водяной бане (при 50—60 °С), а затем охлаждают до комнатной температуры. При наличии ацетона в пробе появляется красная окраска.

4.4. Обнаружение метилового спирта. Этот метод основан на окислении метилового спирта до формальдегида. При взаимодействии формальдегида с хромотроповой кислотой появляется фиолетовая окраска.

В наружную камеру прибора для микродиффузии вносят 1 мл крови или мочи либо 1 г гомогената ткани. Затем в наружную камеру вносят 1 мл насыщенного раствора карбоната калия. Во внутреннюю камеру прибора вносят 3 мл 10%-го раствора серной кислоты. Прибор закрывают крышкой и оставляют на 3 ч. При исследовании гомогената ткани время диффузии увеличивается до пяти часов.

К 1 мл раствора, взятого из внутренней камеры, прибавляют 1 каплю 5%-го раствора перманганата калия и оставляют на 10 мин, а затем прибавляют 1—2 капли насыщенного раствора гидросульфита или сульфита натрия. После исчезновения окраски перманганата калия к жидкости прибавляют 0,2 мл 0,5 %-го раствора хромотроповой кислоты в концентрированной серной кислоте. Жидкость в пробирке охлаждают в ледяной воде, а затем прибавляют 4 мл концентрированной серной кислоты и нагревают пробирку на кипящей водяной бане в течение 15 мин.

Появление красной или фиолетовой окраски жидкости указывает на наличие метилового спирта в исследуемой пробе. Эту пробу выполняют тогда, когда в исследуемом объекте отсутствует формальдегид.

4.5. Определение этилового спирта. Во внешнюю камеру прибора для микродиффузии вносят 0,8 мл крови или мочи либо 4 мл гомогената ткани и 1 мл насыщенного раствора карбоната калия. Во внутреннюю камеру вносят 2 мл раствора дихромата калия в серной кислоте. Сосуд плотно закрывают крышкой и оставляют на 3 ч при комнатной температуре. При исследовании гомогената ткани сосуд оставляют на 4 ч при 37 °С или же на 12 ч при комнатной температуре. Появление зеленой или зеленовато-оранжевой окраски жидкости во внутренней камере указывает на наличие этилового спирта в исследуемом объекте. Эта проба не специфична на этиловый спирт. Подобную окраску дают и другие вещества, окисляющиеся дихроматом калия.

Приготовление раствора дихромата калия (раствор). К 0,37 г дихромата калия прибавляют 15 мл воды. После растворения дихромата калия осторожно прибавляют 28 мл концентрированной серной кислоты. Раствор охлаждают и прибавляют воду до 65 мл.

4.6. Обнаружение сульфидов. В наружную камеру прибора для микродиффузии вносят 2—4 мл крови или мочи, или же 1 г гомогената ткани. Затем в ту же камеру вносят 3—4 капли 10 %-го раствора серной кислоты. Во внутреннюю камеру прибора вносят 3,3 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Прибор плотно закрывают крышкой и оставляют на 3—4 ч при комнатной температуре. Затем из внутренней камеры берут 1 мл жидкости, к которой прибавляют 1 мл раствора нитрата висмута в уксусной кислоте и 3 мл воды. При наличии сульфидов в исследуемых объектах

появляется коричнево-черная окраска или такого же цвета осадок сульфида висмута.

Приготовление раствора нитрата висмута (раствор). К 0,43 г нитрата висмута прибавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты и взбалтывают. К полученному раствору прибавляют воду до 150 мл.

4.7. Обнаружение фенолов. Наружную и внутреннюю камеры прибора для микродиффузии заполняют так, как и при исследовании сульфидов. Через 3—4 ч определяют наличие фенолов.

К 1 мл жидкости, взятой из внутренней камеры прибора, прибавляют 2—3 мл 10 %-го раствора гидроксида натрия и 0,5 мл фенолового реактива Фолина-Чиокальто, разбавленного водой (1:3). При наличии фенолов появляется синяя окраска.

Приготовление реактива Фолина — Чиокальто. К 100 г вольфрамата натрия прибавляют воду до растворения (раствор А). К 25 г молибдата натрия также прибавляют иоду до растворения (раствор Б). Растворы А и Б смешивают и прибавляют воду до 700 мл. Эту жидкость переносят в колбу вместимостью 1500 мл, в которую прибавляют 50 мл 85 %-го раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой, снабженной обратным холодильником, а затем содержимое колбы непрерывно кипятят в течение 10 ч. После указанного времени жидкость охлаждают, прибавляют 150 г сульфата лития, 50 мл дистиллированной воды и 3—5 капель брома. Жидкость в колбе кипятят без холодильника в течение 15 мин (для удаления избытка брома). После охлаждения жидкости ее переносят в колбу и добавляют воду до 1000 мл. Раствор хорошо взбалтывают и фильтруют. Фильтрат собирают в склянку из темного стекла с притертой пробкой. Реактив сохраняют в холодном месте. Он пригоден к употреблению в течение нескольких месяцев. Перед употреблением реактив разбавляют водой (1:3).

4.8. Обнаружение цианидов. В наружную камеру прибора для микродиффузии вносят 2—4 мл крови или мочи, или же 1 г гомогената ткани. Затем в ту же камеру вносят 3—4 капли 10 %-го раствора серной кислоты. Во внутреннюю камеру прибора вносят 3,3 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Прибор плотно закрывают крышкой и оставляют на 3—4 ч при комнатной температуре. Затем из внутренней камеры прибора берут 1 мл жидкости, к которой прибавляют 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, 2 мл 1 н. раствора двузамещенного фосфата натрия и 1 мл 0,25 %-го раствора хлорамина Т. Жидкость взбалтывают и через 2—3 мин прибавляют 3 мл реактива, содержащего барбитуровую кислоту и пиридин. Смесь взбалтывают и оставляют на 10 мин. Появление красной окраски указывает на наличие цианидов в исследуемой жидкости.

Приготовление реактива. Барбитуровая кислота (раствор в пиридине). В колбу вносят 3 г барбитуровой кислоты, прибавляют 15 мл свежесперегнанного пиридина и 3 мл концентрированной соляной кислоты.

Содержимое колбы хорошо взбалтывают, прибавляют воду до 50 мл и фильтруют. Этот реактив должен быть свежеприготовленным.

Приготовление свежеперегнанного пиридина. (Пиридин свежеперегнанный). В товарном пиридине могут быть примеси, мешающие обнаружению и количественному определению ряда веществ с помощью этого реактива. Для очистки пиридина от примесей применяется несколько способов. Приводим один из них. Пиридин в течение суток настаивают с гранулами гидроксида калия. После этого пиридин сливают в высушенную колбу аппарата для перегонки жидкостей. В эту колбу прибавляют оксид бария и отгоняют пиридин на глицериновой бане. Отогнанный пиридин сохраняют в склянках с притертой пробкой.

Другие способы получения очищенного свежеперегнанного пиридина подробно описаны (1).

4.9. Определение оксида углерода (II). Во внешнюю камеру прибора вносят 1 мл крови и 1 мл 10 %-го раствора серной кислоты. Во внутреннюю камеру помещают 2 мл 0,1 %-го раствора хлорида палладия в 0,1 н. растворе соляной кислоты. Прибор плотно закрывают крышкой и оставляют на 1 ч при комнатной температуре. При наличии оксида углерода (II) в крови во внутренней камере появляется серебристая пленка металлического палладия:

5. Заключение.

Описанная процедура является сводом методик используемых в химико-токсикологическом исследовании на данную группу веществ и предназначена для идентификации соответствующих веществ в биологических объектах и объектов не биологического происхождения.

6. Список использованных источников.

1. А. Губен-Вейль. Методы органической химии: В 2-х т.—М.: Химия, 1967.—Т. 2. 1032 с).
2. Крамаренко В. Ф. Химико-токсикологический анализ.— К: Вища шк. Головное изд-во, 1982 г.;