

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



МЕТОДИКА
ЭКСПЕРТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ МИКРОДИФФУЗИИ
(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика экспертного исследования методом микродиффузии
2. Шифр специальности методики	27.1(13)
3. Информация о разработчике методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»
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. Объекты исследования	Биологические жидкости и ткани внутренних органов, объекты не биологического происхождения (остатки жидкостей, одежда и т.п.)
4.2. Методы исследования	Химические реакции для определения токсических веществ в минимальных концентрациях
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<p>Методика обнаружения отдельных летучих соединений с помощью метода микродиффузии;</p> <p>Обнаружение формальдегида;</p> <p>Обнаружение альдегида уксусной кислоты;</p> <p>Обнаружение ацетона;</p> <p>Обнаружение метилового спирта;</p> <p>Определение этилового спирта;</p> <p>Обнаружение сульфидов;</p> <p>Обнаружение фенолов;</p> <p>Обнаружение цианидов</p>
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол № 1 от 07.11.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

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.

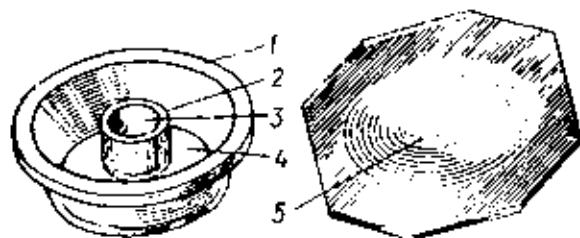


Рис. 1. Прибор для микродиффузии.

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 воду 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 свежеспергнанного 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.;