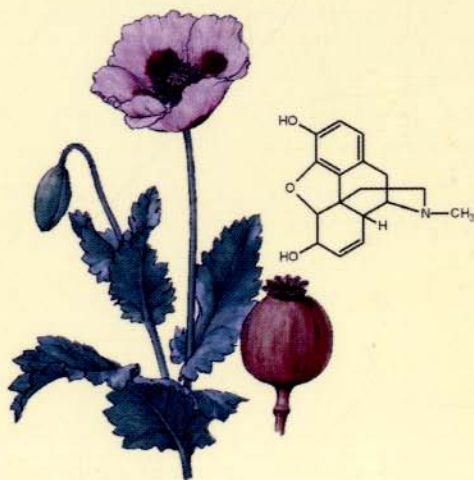


Andrzej Bajguz    Alicja Piotrowska

# ĆWICZENIA

Z

# TOKSYKOLOGII ŚRODOWISKA

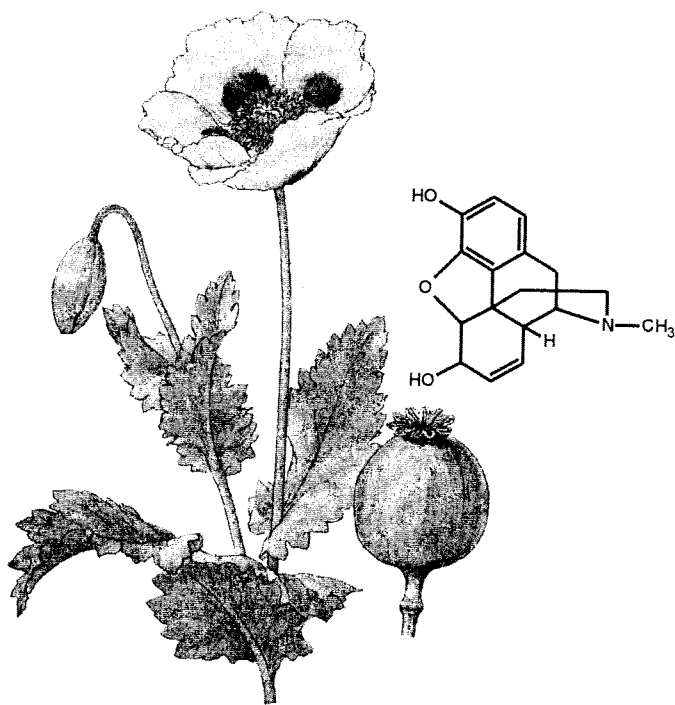


Białystok 2005

**Ćwiczenia  
z toksykologii środowiska**

Andrzej Bajguz    Alicja Piotrowska

# Ćwiczenia z toksykologii środowiska



Recenzent: prof. dr hab. Andrzej Tretyn



286560

502(07)

Wydanie publikacji sfinansowane przez  
Wydział Biologiczno-Chemiczny i Instytut Biologii  
Uniwersytetu w Białymstoku

© Copyright by Uniwersytet w Białymstoku

Białystok 2005

ISBN 83-7431-033-2

BIBLIOTEKA UNIWERSYTECKA  
Im. Jerzego Giedroycia w Białymstoku



FUW0172886

Wydawnictwo Uniwersytetu w Białymstoku  
15-097 Białystok, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 14  
tel. (085) 745 70 59  
e-mail: ac-dw@uwb.edu.pl  
http://wydawnictwo.uwb.edu.pl

Druk i oprawa: MZGraf. s.c. e-mail: drukarnia@mzgraf.pl

y/149/05p

## Spis treści

1. WPROWADZENIE .....	13
2. UWAGI PRAKTYCZNE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH .....	15
3. WYBRANE TERMINY TOKSYKOLOGICZNE .....	18
4. IZOLACJA NIEZNANEJ TRUCIZNY Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO .....	22
4.1. Próby wstępne w analizie toksykologicznej .....	24
4.2. Izolacja trucizn lotnych – destylacja z parą wodną .....	25
4.2.1. Destylacja z parą wodną z roztworu kwaśnego .....	26
4.2.1.1. Próba Schönbeina na cyjanki .....	27
4.2.2. Destylacja z parą wodną z roztworu alkalicznego .....	28
4.3. Izolacja trucizn lotnych – metoda mikrodyfuzji .....	28
4.4. Izolacja i oczyszczanie nielotnych trucizn organicznych .....	30
4.4.1. Ekstrakcja z materiału stałego o niewielkiej zawartości wody .....	32
4.4.2. Ekstrakcja z materiału płynnego .....	33
4.4.3. Ekstrakcja z materiałów bogatych w tłuszcze .....	33
4.4.4. Podział ekstraktów nielotnych trucizn organicznych .....	34
4.5. Metody mineralizacji materiału biologicznego .....	37
4.5.1. Mineralizacja metodą suchą .....	37
4.5.2. Mineralizacja metodą mokrą .....	38
4.5.3. Mineralizacja metodą ciśnieniową .....	39
4.5.4. Mineralizacja w atmosferze wzbudzonego tlenu .....	40
4.5.5. Mineralizacja przez naświetlanie promieniami UV .....	40
4.5.6. Mineralizacja mikrofalowa .....	41
4.6. Dializa .....	42
5. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN LOTNYCH .....	43
5.1. Aceton .....	43
5.1.1. Reakcja jodoformowa Liebena .....	43
5.1.2. Reakcja Legala .....	44
5.2. Aldehyd mrówkowy .....	44
5.2.1. Reakcja z kwasem chromotropowym .....	45
5.2.2. Reakcja z tiokolem .....	45
5.2.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera .....	45
5.2.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa .....	45
5.2.5. Reakcja z azotanem (V) srebra i wodorotlenkiem sodu .....	46
5.2.6. Reakcja Shryvera .....	46



5.2.7. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i morfiną.....	46	5.10.3. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	65
<b>5.3. Aldehyd trichlorooctowy.....</b>	<b>47</b>	5.10.4. Reakcja z 5-nitrozo-8-hydroksychinoliną .....	65
5.3.1. Reakcja izonitrylowa .....	47	5.10.5. Reakcja z odczynnikiem Millona .....	66
5.3.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu .....	47	5.10.6. Próba Melzera .....	66
5.3.3. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II) .....	47	5.10.7. Reakcja z dwuazowaną <i>p</i> -nitroaniliną .....	66
5.3.4. Reakcja z odczynnikiem Nesslera .....	47	5.10.8. Reakcja z metawanadanem (IV) amonu .....	66
<b>5.4. Alkohol etylowy .....</b>	<b>48</b>	<b>5.11. Ksylen.....</b>	<b>67</b>
5.4.1. Reakcja jodoformowa Liebena.....	48	5.11.1. Oznaczenie zawartości kwasu <i>m</i> -metylohipurowego (metabolit ksylenu) w moczu.....	67
5.4.2. Reakcja estryfikacji.....	49	<b>5.12. Kwas mrówkowy .....</b>	<b>69</b>
5.4.3. Reakcja z dichromianem (VI) potasu .....	49	5.12.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	69
5.4.4. Reakcja z chlorkiem benzoilu .....	50	5.12.2. Reakcja z chlorkiem rtęci (II) .....	69
5.4.5. Oznaczenie etanolu we krwi metodą Widmarka .....	50	5.12.3. Reakcja z azotanem (V) srebra .....	70
<b>5.5. Alkohol metylowy.....</b>	<b>51</b>	<b>5.13. Kwas octowy.....</b>	<b>70</b>
5.5.1. Reakcja estryfikacji.....	51	5.13.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	70
5.5.2. Reakcja utleniania metanolu do aldehydu mrówkowego.....	52	5.13.2. Reakcja z tritlenkiem arsenu (III) .....	70
5.5.3. Reakcja Denigesa .....	52	5.13.3. Reakcja estryfikacji.....	71
<b>5.6. Anilina .....</b>	<b>53</b>	<b>5.14. Nitrobenzen .....</b>	<b>71</b>
5.6.1. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z solą R.....	53	5.14.1. Redukcja do aniliny.....	72
5.6.2. Reakcja izonitrylowa .....	53	5.14.2. Reakcja z rezorcyną.....	72
5.6.3. Reakcja bromowania .....	54	<b>5.15. Pirydyna.....</b>	<b>72</b>
5.6.4. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i dichromianem (VI) potasu .....	54	5.15.1. Reakcja z aniliną i bromocyjanem .....	72
5.6.5. Reakcja z aldehydem mrówkowym.....	54	5.15.2. Reakcja z benzydyną .....	73
5.6.6. Próba indofenolowa .....	55	5.15.3. Reakcja z siarczanem (VI) miedzi (II) i tiocyjanianem potasu .....	73
5.6.7. Oznaczenie zawartości <i>p</i> -aminofenolu (metabolit aniliny) w moczu .....	55	5.15.4. Reakcja z 2,4-dinitrochlorobenzenem.....	73
<b>5.7. Benzen.....</b>	<b>58</b>	<b>5.16. Toluen .....</b>	<b>73</b>
5.7.1. Reakcja Friedela–Craftsa .....	58	5.16.1. Oznaczenie zawartości kwasu hipurowego (metabolit toluenu) w moczu .....	74
5.7.2. Reakcja nitrowania .....	58	<b>5.17. Trichloroetylen .....</b>	<b>75</b>
5.7.3. Reakcja z odczynnikiem Marquisa.....	59	5.17.1. Oznaczenie zawartości kwasu trichlorooctowego.....	76
5.7.4. Oznaczenie zawartości fenolu (metabolit benzenu) w moczu .....	59	5.17.2. Oznaczenie zawartości trichloroetanolu .....	76
<b>5.8. Chloroform .....</b>	<b>60</b>	5.17.3. Oznaczenie całkowitej zawartości związków trichlorowych .....	77
5.8.1. Reakcja izonitrylowa .....	60	<b>6. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH NIELOTNYCH TRUCIZN ORGANICZNYCH .....</b>	<b>79</b>
5.8.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu .....	61	<b>6.1. Kwas salicylowy .....</b>	<b>80</b>
5.8.3. Reakcja Fujiwary.....	61	6.1.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	81
5.8.4. Reakcja z $\alpha$ -naftolem.....	61	6.1.2. Reakcja z wodą bromową .....	81
5.8.5. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II) .....	61	6.1.3. Reakcja z alkoholem metylowym .....	81
<b>5.9. Cyjanowodór .....</b>	<b>62</b>	6.1.4. Reakcja z kwasem azotowym (V).....	81
5.9.1. Reakcja z siarczanem (VI) żelaza (II) i chlorkiem żelaza (III) .....	62	6.1.5. Reakcja Salfa.....	81
5.9.2. Reakcja z polisiarczkiem amonu .....	63	<b>6.2. Kwas acetylosalicylowy.....</b>	<b>82</b>
5.9.3. Reakcja z kwasem pikrynowym .....	63	6.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i kwasem siarkowym (VI) .....	82
5.9.4. Reakcja z azotanem (V) srebra .....	63	6.2.2. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	82
<b>5.10. Fenol.....</b>	<b>63</b>		
5.10.1. Reakcja z 4-aminoatrypiną.....	64		
5.10.2. Reakcja z wodą bromową .....	64		

6.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym .....	82	6.10.4. Reakcja z kwasem solnym .....	94
6.2.4. Reakcja z chlorkiem żelaza (III), octanem ołowiu (II) i siarczanem (VI) miedzi (II) .....	83	6.10.5. Reakcja z <i>p</i> -dimetyloaminobenzaldehydem .....	94
<b>6.3. Fenacetyna</b> .....	83	<b>6.11. Wykrywanie nielotnych substancji toksycznych metodą chromatografii cienkowsarstwowej</b> .....	94
6.3.1. Reakcja z kwasem chromowym (VI) .....	83	6.11.1. Chromatografia cienkowsarstwowa – podstawy teoretyczne .....	95
6.3.2. Reakcja z kwasem azotowym (V) .....	83	6.11.2. Wykrywanie środków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych .....	96
6.3.3. Reakcja estryfikacji .....	84	6.11.3. Wykrywanie barbituranów .....	97
6.3.4. Reakcja indofenolowa .....	84	<b>7. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN METALICZNYCH</b> .....	98
6.3.5. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z $\beta$ -naftolem .....	84	<b>7.1. Antymon</b> .....	99
6.3.6. Reakcja z wodorotlenkiem potasu .....	84	7.1.1. Reakcja z siarkowodorem .....	99
<b>6.4. Fenazon</b> .....	85	7.1.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu .....	99
6.4.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	85	7.1.3. Reakcja z tiosiarczanem .....	100
6.4.2. Reakcja z kwasem azotowym (V) .....	85	<b>7.2. Arsen</b> .....	100
6.4.3. Reakcja z taniną .....	85	7.2.1. Reakcja z siarkowodorem .....	101
6.4.4. Reakcja z odczynnikiem Millona .....	86	7.2.2. Reakcja z jodem .....	101
6.4.5. Reakcja z kwasem pikrynowym .....	86	7.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra .....	101
<b>6.5. Aminofenazon</b> .....	86	7.2.4. Reakcja z nadmanganianem (VII) potasu .....	101
6.5.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III) .....	86	7.2.5. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu .....	101
6.5.2. Reakcja z azotanem (V) srebra .....	87	7.2.6. Reakcja Bettendorffa .....	102
6.5.3. Odróżnienie fenazonu od aminofenazonu .....	87	<b>7.3. Bar</b> .....	102
<b>6.6. Barbiturany</b> .....	87	7.3.1. Reakcja z rozpuszczalnymi węglanami .....	102
6.6.1. Reakcja hydrolizy do amoniaku .....	89	7.3.2. Reakcje z chromianem (VI) lub dichromianem (VI) potasu .....	103
6.6.2. Reakcja tiocyjanianowa .....	89	7.3.3. Reakcja z rozpuszczalnymi siarczanami .....	103
6.6.3. Reakcja Zwickera .....	89	<b>7.4. Bizmut</b> .....	103
6.6.4. Reakcja z odczynnikiem Millona .....	89	7.4.1. Reakcja wodorotlenkiem sodu .....	103
6.6.5. Reakcja z chlorkiem sodu .....	89	7.4.2. Reakcja z siarkowodorem .....	104
<b>6.7. Meproamat</b> .....	90	7.4.3. Reakcja z ditionem .....	104
6.7.1. Reakcja z <i>p</i> -dimetyloaminobenzaldehydem .....	90	<b>7.5. Chrom</b> .....	105
<b>6.8. Kofeina</b> .....	90	7.5.1. Reakcja z siarczkiem sodu .....	105
6.8.1. Próba mureksydowa .....	91	7.5.2. Reakcja z amoniakiem .....	105
6.8.2. Reakcja z taniną .....	91	7.5.3. Reakcja z nadtlenkiem wodoru .....	106
6.8.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera .....	92	7.5.4. Reakcja z difenylokarbazydem (I) .....	106
<b>6.9. Chloropromazyna</b> .....	92	7.5.5. Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości związków chromu w ściekach .....	107
6.9.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) .....	92	<b>7.6. Cyna</b> .....	108
6.9.2. Reakcja z odczynnikiem Marquisa .....	93	7.6.1. Reakcja z siarkowodorem .....	108
6.9.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego .....	93	7.6.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu .....	108
6.9.4. Reakcja z kwasem azotowym (V) .....	93	7.6.3. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu .....	109
6.9.5. Reakcja z wodą bromową .....	93	<b>7.7. Miedź</b> .....	109
<b>6.10. Weratryna</b> .....	93	7.7.1. Reakcja z siarkowodorem .....	109
6.10.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) .....	93	7.7.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu .....	110
6.10.2. Reakcja z odczynnikiem Meckiego .....	94	7.7.3. Reakcja z amoniakiem .....	110
6.10.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego .....	94	7.7.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu .....	110

7.7.5. Reakcja z ditizonem .....	110
7.7.6. Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biologicznym .....	111
<b>7.8. Ołów</b> .....	112
7.8.1. Reakcja z kwasem solnym .....	112
7.8.2. Reakcja z jodkiem potasu .....	113
7.8.3. Reakcja z chromianem (VI) potasu .....	113
7.8.4. Reakcja z siarkowodorem .....	113
7.8.5. Reakcja z siarczanem (IV) sodu .....	113
7.8.6. Reakcja z ditizonem .....	113
7.8.7. Reakcja z wodorotlenkiem sodu .....	114
<b>7.9. Rtuć</b> .....	114
7.9.1. Reakcje z kwasem solnym i rozpuszczalnymi chlorkami .....	114
7.9.2. Reakcja z jodkiem potasu .....	115
7.9.3. Reakcja z siarkowodorem .....	115
7.9.4. Reakcja z chlorkiem cyny (II) .....	115
7.9.5. Reakcja z nitrobenzenem .....	115
7.9.6. Reakcja z difenylokarbazidem (I) .....	116
7.9.7. Reakcja z difenylokarbazonem (II) .....	116
7.9.8. Reakcja z ditizonem .....	116
<b>7.10. Identyfikacja trucizn metalicznych za pomocą Na-DDTK</b> .....	117
<b>7.11. Wykrywanie trucizn metalicznych metodą chromatografii cienkwarstwowej</b> .....	119
<b>7.12. Oddziaływanie ołowiu na wzrost roślin</b> .....	122
<b>7.13. Oznaczanie zawartości wybranych metali w materiale roślinnym metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej</b> .....	124
<b>8. WYBRANE SUBSTANCJE TOKSYCZNE POCHODZENIA ROŚLINNEGO</b> .....	126
<b>8.1. Alkaloidy</b> .....	126
8.1.1. Wykrywanie koniiny – alkaloidu cykuty .....	127
8.1.2. Wykrywanie nikotyny – alkaloidu tytoniu .....	127
8.1.3. Wykrywanie strychniny i brucyny – alkaloidów kulczyby .....	128
8.1.4. Wykrywanie alkaloidów glistnika jaskółczego ziela .....	129
8.1.5. Wykrywanie berberyny .....	130
8.1.6. Wykrywanie morfiny .....	130
8.1.7. Wykrywanie kolchicyny .....	131
8.1.8. Wykrywanie kofeiny .....	132
<b>8.2. Glikozydy</b> .....	132
8.2.1. Wykrywanie glikozydów kardenolidowych .....	133
8.2.2. Wykrywanie glikozydów flawonoidowych .....	133
8.2.3. Wykrywanie glikozydów fenolowych .....	134
8.2.4. Wykrywanie glikozydów antrachinonowych .....	134
8.2.5. Wykrywanie glikozydów kumarynowych .....	135

8.2.6. Wykrywanie glikozydów cyjanogennych .....	135
8.2.7. Wykrywanie saponin .....	136
<b>8.3. Olejki eteryczne</b> .....	136
8.3.1. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja z Sudanem III .....	137
8.3.2. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja Stahla .....	137
<b>9. PESTYCYDY</b> .....	138
<b>9.1. Podział i bezpieczeństwo stosowania pestycydów</b> .....	139
<b>9.2. Charakterystyka wybranych grup pestycydów</b> .....	143
9.2.1. Insektycydy fosforoorganiczne .....	143
9.2.2. Insektycydy karbaminianowe .....	145
9.2.3. Insektycydy polichlorowe .....	146
9.2.4. Insektycydy piretroidowe .....	146
9.2.5. Fungicydy .....	147
9.2.6. Herbicydy .....	149
9.2.7. Rodentycydy .....	150
<b>9.3. Identyfikacja wybranych grup pestycydów</b> .....	151
9.3.1. Wykrywanie insektycydów fosforoorganicznych .....	151
9.3.2. Wykrywanie insektycydów karbaminianowych .....	152
9.3.3. Wykrywanie insektycydów polichlorowych .....	153
9.3.4. Wykrywanie fungicydów .....	155
9.3.5. Wykrywanie herbicydów .....	156
<b>10. ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA</b> .....	158
<b>10.1. Źródła zanieczyszczeń środowiska</b> .....	158
<b>10.2. Wskaźniki jakości wody</b> .....	160
10.2.1. Oznaczanie zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie .....	161
10.2.2. Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen .....	164
10.2.3. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen .....	166
10.2.4. Oznaczenie zawartości ogólnej węgla organicznego w wodzie .....	169
10.2.5. Oznaczanie twardości wody oraz zawartości wapnia i magnezu w wodzie .....	171
10.2.6. Oznaczanie zasadowości ogólnej wody .....	176
10.2.7. Oznaczanie kwasowości ogólnej wody .....	177
10.2.8. Oznaczanie zawartości chlorków w wodzie .....	178
10.2.9. Oznaczanie zawartości ortofosforanów (V) w wodzie .....	179
10.2.10. Oznaczanie zawartości azotanów (V) i azotanów (III) w wodzie .....	181
10.2.11. Oznaczanie zawartości detergentów anionoaktywnych w wodzie .....	183
10.2.12. Oznaczanie zawartości wybranych metali w wodzie .....	186
<b>10.3. Badanie chemicznych zanieczyszczeń gleby</b> .....	187
10.3.1. Oznaczanie zasolenia w glebie .....	189
10.3.2. Oznaczanie zawartości chlorków w glebie .....	190
10.3.3. Oznaczanie kwasowości gleby .....	191

10.3.4. Oznaczanie zawartości wapnia i magnezu metodą wersenianową w glebie.....	193
10.3.5. Oznaczanie zawartości wybranych metali metodą AAS w glebie.....	195
<b>10.4. Badanie chemicznych zanieczyszczeń powietrza .....</b>	<b>197</b>
10.4.1. Oznaczanie zawartości ditlenku siarki w powietrzu.....	199
10.4.2. Oznaczanie zawartości tlenków azotu w powietrzu .....	202
10.4.3. Oznaczanie zanieczyszczeń pyłowych i zawartości wybranych metali w pyle.....	205
<b>11. TESTY TOKSYCZNOŚCI DLA ORGANIZMÓW .....</b>	<b>207</b>
11.1. Testy toksyczności na kręgowcach .....	207
11.2. Testy toksyczności na organizmach wodnych.....	210
11.2.1. Test toksyczności na rozwielitkach.....	211
11.2.2. Test toksyczności na glonach .....	212
<b>12. PROGRAM RAMOWY DO ZAJĘĆ Z TOKSYKOLOGII ŚRODOWISKA .....</b>	<b>215</b>
<b>13. INFORMACJE UZUPEŁNIAJĄCE .....</b>	<b>217</b>
<b>14. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>221</b>

*Wszystko jest trucizną i nic nią nie jest.  
Dawka decyduje tylko, czy coś nie jest trucizną.  
Paracelsus (1492–1541 r.)*

# 1 WPROWADZENIE

**Toksykologia** jest nauką o truciznach, której nazwa wywodzi się od greckiego słowa *toksikon* – trucizna i *logos* – wiedza, nauka. Do substancji toksycznych (trucizn) zaliczamy związki chemiczne, które powodują szkodliwe efekty biologiczne, zdrowotne w organizmach żywych lub ich śmierć. Bardzo toksyczna substancja powoduje skutki po podaniu małych ilości (dawek), natomiast substancja mało toksyczna oddziałuje szkodliwe dopiero w odpowiednio dużej ilości. **Toksyczność** jest jednym z czynników określających **ryzyko**, czyli prawdopodobieństwo wystąpienia w organizmie szkodliwych skutków. Do ilościowej oceny toksyczności niezbędne są dane na temat dawki, drogi, czasu i sposobu podania, rodzaju i ciężkości uszkodzeń, czasu potrzebnego do ich wywołania oraz gatunku organizmu. Niezmiernie ważnym jest poznanie wpływu na organizmy roślinne i zwierzęce zanieczyszczeń organicznych lub nieorganicznych będących obcymi składnikami dla tych organizmów i/lub środowiska – **ksenobiotyków**. Przykładami są insektycydy, herbicydy czy fungicydy. Często substancja może być ksenobiotykiem dla jednego gatunku, natomiast dla innego jest naturalnym składnikiem, np. alkaloidy czy glikozydy.

Niniejszy skrypt pt. „Ćwiczenia z toksykologii środowiska” jest adresowany do studentów biologii, chemii i ochrony środowiska. Zawiera podstawowe wiadomości z analizy toksykologicznej, sposobu wyodrębniania, identyfikacji oraz charakterystyki trucizn. Niektóre ćwiczenia dotyczą oznaczeń ilościowych substancji toksycznych. W skrypcie poruszane są również problemy związane z analizą wybranych zanieczyszczeń środowiska.

Autorzy pragną serdecznie podziękować Recenzentowi prof. dr hab. Andrzejowi Tretynowi z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz dr Annie Mical i dr Beacie Godlewskiej-Żytkiewicz z Uniwersytetu w Białymstoku za cenne uwagi i sugestie, dzięki którym możemy Czytelnikom przedstawić ostateczną wersję „Ćwiczeń z toksykologii środowiska”. Jednak nie ponoszą one odpowiedzialności za ewentualne uproszczenia lub przeoczenia, za które przepraszamy, licząc na wyrozumiałość Czytelników.

Prof. dr hab. Jacek Morzycki – Dziekan Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku, prof. dr hab. Jan Taylor – Dyrektor Instytutu Biologii UwB, prof. dr hab. Romuald Czerpak – Kierownik Zakładu Biochemii Roślin UwB zasługują na szczególne podziękowania za wsparcie finansowe w wydaniu niniejszej książki.

## 2 UWAGI PRAKTYCZNE DO ĆWICZEŃ LABORATORYJNYCH

Podczas ćwiczeń laboratoryjnych z toksykologii należy przestrzegać regulaminu pracowni oraz przepisów bezpieczeństwa pracy.

1. **W pracowni wolno przebywać** w godzinach określonych w rozkładzie zajęć, **wyłącznie w odzieży ochronnej** (bawełniany fartuch laboratoryjny).
2. Osoby posiadające długie włosy powinny je spiąć.
3. **Palenie tytoniu, spożywanie posiłków w laboratorium jest surowo wzbronione.**
4. Pamiętaj, że wiele odczynników chemicznych to potencjalne trucizny! **Substancjom i preparatom chemicznym** należącym do określonych kategorii niebezpieczeństwa, na podstawie ich właściwości fizykochemicznych oraz toksyczności, **przypisuje się odpowiednie symbole określające zagrożenie.** Piktogramy powinny być koloru czarnego umieszczone na żółtopomarańczowym tle (patrz rozdział 13).
5. **Pracując z substancjami łatwopalnymi (eter, benzen, aceton) nie zapalaj ognia.** Sprawdź czy wszystkie palniki i płytki elektryczne są wyłączone. W razie powstania pożaru na skutek zapalenia się rozpuszczalników nie należy go gasić wodą, tylko specjalną gaśnicą.
6. **Wszelkie czynności ze stężonymi kwasami, wodorotlenkami, amoniakiem i bromem przeprowadzaj pod sprawnie działającym wyciągiem.** Pamiętaj o włożeniu gumowego fartucha ochronnego, rękawic i okularów ochronnych.
7. **Nie wlewaj nigdy wody do stężonych kwasów,** ponieważ grozi to poparzeniem.
8. **Nie pipetuj ustami szkodliwych substancji** (stężonych kwasów, wodorotlenków, amoniaku, roztworów cyjanków i bromu). W tym celu używaj

- specjalnych, podpisanych pipet zaopatrzonych w gumowe gruszki lub nasadki.
9. **W przypadku oparzenia skóry kwasem lub zasadą** – oparzone miejsce opłucz dokładnie pod bieżącą zimną wodą i przemyj 2-3% roztworem  $\text{NaHCO}_3$  (po zadziałaniu kwasu) lub 1-2% roztworem  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (po zadziałaniu zasady). **W przypadku dostania się do oczu** jakiegokolwiek substancji organicznej lub nieorganicznej należy je szybko przemyć wodą. **W przypadku dostania się kwasu lub zasady do ust** – dokładnie opłucz je dużą ilością wody, następnie wspomnianymi roztworami  $\text{NaHCO}_3$  lub  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . **W przypadku połknięcia roztworu kwasu lub zasady** – wypij dużą ilość mleka lub wody z surowym białkiem jaja bądź oliwy. **W każdym z tych przypadków należy niezwłocznie powiadomić osobę prowadzącą ćwiczenia oraz natychmiast udać się do lekarza!**
  10. **W przypadku oparzenia termicznego skóry I stopnia** (zacerwienie, obrzęk, ból) – jej powierzchnię przemyj etanolem albo roztworem pioktaniny. Po powiadomieniu osoby prowadzącej ćwiczenia udaj się natychmiast do lekarza.
  11. **Zachowaj ostrożność pracując z rtęcią** – jej pary są niezwykle trujące.
  12. **Oszczędzaj szkło laboratoryjne i odczynniki chemiczne.**
  13. W analizie toksykologicznej posługuj się wyłącznie dokładnie wymyтым szkłem. Po zakończeniu doświadczenia **dokładnie umyj szkło laboratoryjne** ciepłym roztworem detergentu, używając czystej szczotki, starannie spłucz bieżącą wodą, a następnie 3-krotnie wodą destylowaną.
  14. Do każdego roztworu używaj oddzielnej pipety. **Nie wkładaj używanych pipet do statywów**, tylko bezpośrednio po użyciu przemyj dokładnie bieżącą wodą i spłucz 3-krotnie wodą destylowaną.
  15. Stosując pipety automatyczne zapoznaj się z instrukcją obsługi. Pipetując kolejne roztwory – zmieniaj końcówki.
  16. Nie uruchamiaj jakiegokolwiek aparatury bez zgody osoby prowadzącej ćwiczenia.
  17. Utrzymuj wagi w idealnej czystości. Przed przystąpieniem do ważenia zapoznaj się z jej obsługą. Po ważeniu usuń pędzelkiem wszelkie zanieczyszczenia.
  18. **Przed przystąpieniem do pomiarów spektrofotometrycznych zapoznaj się z obsługą aparatu.** Po zakończeniu pomiaru dokładnie umyj i przepłucz wodą destylowaną kuwety szklane lub kwarcowe, natomiast kuwety jednorazowego użytku wyrzuć do kosza. Uporządkuj miejsce pracy.

19. **Podczas wirowania** prób pamiętaj, że **próbówki muszą być idealnie zrównoważone** i ustawione naprzeciw siebie, poziom cieczy w próbówce powinien być poniżej 1 cm krawędzi próbówki. Sprawdź przed włączeniem wirówki czy jej pokrywa jest dokładnie zamknięta.
20. Podczas sączenia krawędź sączka z bibuły musi znajdować się około 0,5 cm poniżej krawędzi lejka. W celu przesączenia dużej ilości cieczy stosuj sączki pofalowane.
21. **Po zakończeniu ćwiczeń zawsze uporządkuj swoje miejsce pracy:**
  - a) odpady stałe (papier, końcówki do pipet, korki) wrzuć do koszy, pośluzzone szkło – do specjalnych pojemników;
  - b) stężone kwasy i zasady, zużyte odczynniki, mieszaniny po wykonanych doświadczeniach chemicznych wylewaj do specjalnego zlewu kamionkowego, odkręć kran i strumieniem wody rozcieńczaj związek, a następnie dokładnie spłucz zlew;
  - c) ustaw na właściwym miejscu szkło laboratoryjne i odczynniki chemiczne;
  - d) sprawdź czystość stołu laboratoryjnego.
21. Wychodząc z pracowni sprawdź czy są wyłączone wszystkie palniki gazowe i aparaty elektryczne.



# 3 WYBRANE TERMINY TOKSYKOLOGICZNE

**Biomarker** – odpowiedź biologiczna na działanie substancji chemicznej na poziomie osobniczym lub komórkowym wskazująca na odchylenie od stanu prawidłowego.

**Czas śmiertelności medialny** (ang. *lethal time*) ( $LT_{50}$ ) – statystycznie obliczony czas, w którym po podaniu substancji w określonej dawce ginie 50% organizmów testowych.

**Dawka** – ilość podanej substancji wyrażona w jednostce wagowej (mg) lub jako masa substancji w przeliczeniu na jednostkę masy ciała organizmu testowego (mg/kg).

**Dawka-odpowiedź** – zależność pomiędzy dawką a częścią populacji wykazującej określony skutek.

**Dawka powodująca inhibicję** (ang. *inhibition dose*) (ID) – dawka substancji powodująca określone zahamowanie danego parametru, np. wzrostu rośliny czy aktywności enzymu.

**Dawka progowa (graniczna)** – ilość substancji, która wywołuje pierwsze spostrzegalne skutki biologiczne.

**Dawka skuteczna medialna** (ang. *efficient dose*) ( $ED_{50}$ ) – statystycznie obliczona dawka substancji wywołująca określony skutek u 50% organizmów testowych w określonych warunkach; wyrażona jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki masy ciała organizmu doświadczalnego (mg/kg).

**Dawka-skutek** – zależność pomiędzy dawką a wielkością określonego skutku biologicznego u osobnika lub populacji.

**Dawka śmiertelna bezwzględna** (ang. *lethal dose*) ( $LD_{100}$ ) – minimalna ilość substancji powodująca śmierć 100% testowych organizmów; wyrażona jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki masy ciała organizmu doświadczalnego (mg/kg).

**Dawka śmiertelna medialna** ( $LD_{50}$ ) – statystycznie obliczona dawka powodująca śmierć 50% testowych organizmów; wyrażona jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki masy ciała organizmu doświadczalnego (mg/kg).

**Dawka śmiertelna najniższa** ( $LD_{min}$ ) – minimalna ilość substancji powodująca śmierć pojedynczych testowych organizmów; wyrażona jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki masy ciała organizmu doświadczalnego (mg/kg).

**Dawka toksyczna** (ang. *toxic dose*) (TD) – ilość substancji wywołująca objawy zatrucia oraz odwracalne zaburzenia czynnościowe organizmu.

**FEL** (ang. *frank effect level*) – poziom narażenia, przy którym stwierdza się ewidentne efekty toksyczne prowadzące do zmian patologicznych z zaburzeniami czynnościowymi narządów, często prowadzące do śmierci lub wyraźnego skrócenia okresu przeżywalności.

**LOAEL** (ang. *lowest observable adverse effect level*) **najniższy obserwowalny efekt szkodliwy** – najniższa dawka lub poziom narażenia w badaniach umożliwiających wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź, przy którym jeszcze występuje statystycznie lub biologicznie istotny wzrost częstości występowania szkodliwych skutków działania substancji u badanych organizmów w stosunku do grupy kontrolnej.

**LOEC** (ang. *lowest observable effect concentration*) – poziom najniższego stężenia, przy którym występuje istotny wzrost częstości lub nasilenie skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do grupy kontrolnej.

**MTD** (ang. *maximal tolerated dose*) **maksymalnie tolerowana dawka** – najwyższa dawka substancji chemicznej, która nie wywołuje śmierci badanych organizmów. Często oznaczona jest symbolem  $LC_0$  jako stężenie tolerowane najwyższe, wyraża masę badanej substancji w standardowej objętości powietrza ( $mg/dm^3$ ) lub jako części na milion (ppm).

**Najwyższe dopuszczalne stężenie** (NDS) – wartość średnia ważona stężenia, którego oddziaływanie na pracownika w ciągu 8-godzinnego dobowego i przeciętnego tygodniowego wymiaru czasu pracy, określonego w Kodeksie pracy, przez okres jego aktywności zawodowej nie powinno spowodować ujemnych zmian w jego stanie zdrowia oraz w stanie zdrowia jego przyszłych pokoleń.

**Najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe** (NDSCh) – wartość średnia stężenia, które nie powinno spowodować ujemnych zmian w stanie zdrowia pracownika, jeżeli występuje w środowisku pracy nie dłużej niż 15 minut i nie częściej niż 2 razy w czasie zmiany roboczej, w odstępie czasu nie krótszym niż 1 godzina.

**Najwyższe dopuszczalne stężenie pułapowe (NDSP)** – wartość stężenia, która ze względu na zagrożenie zdrowia lub życia pracownika nie może być w środowisku pracy przekroczona w żadnym momencie.

**NOAEL** (ang. *no-observable adverse effect level*) **nieobserwowalny efekt szkodliwy** – najwyższa dawka lub poziom narażenia w badaniach umożliwiających wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź, przy którym nie występuje statystycznie lub biologicznie istotny wzrost częstości lub nasilenia szkodliwych skutków działania substancji u badanych organizmów w stosunku do grupy kontrolnej.

**NOEC** (ang. *no-observable effect concentration*) – największe stężenie, przy którym nie występuje istotny wzrost częstości lub nasilenie skutków działania danej substancji u badanych organizmów w stosunku do grupy kontrolnej.

**Ryzyko** – prawdopodobieństwo wystąpienia w organizmie szkodliwych skutków w wyniku działania określonego czynnika biologicznego, chemicznego lub fizycznego.

**Selektywna toksyczność** – różnica w toksyczności danej substancji chemicznej dla różnych gatunków, płci, szczepów lub grup wiekowych; wyrażana jest stosunkiem selektywności, np.  $LD_{50}$  dla gatunku A /  $LD_{50}$  dla gatunku B.

**Stężenie śmiertelne bezwzględne** (ang. *lethal concentration*) ( $LC_{100}$ ) – najniższe stężenie substancji chemicznej w środowisku powodujące śmierć 100% organizmów danej populacji w określonych warunkach; wyrażone jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki objętości powietrza ( $mg/dm^3$ ).

**Stężenie śmiertelne medialne** ( $LC_{50}$ ) – statystycznie obliczone stężenie powodujące śmierć 50% badanych organizmów; wyrażone jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki objętości powietrza ( $mg/dm^3$ ).

**Stężenie tolerowane najwyższe** ( $LC_0$ ) – najwyższe stężenie substancji chemicznej w środowisku, które nie wywołuje śmierci badanych organizmów; wyrażone jest stosunkiem masy badanej substancji do jednostki objętości powietrza ( $mg/dm^3$ ).

**Toksyczność ostra** – zdolność substancji do wywołania efektu toksycznego po jej podaniu (wchłonięciu) do organizmu w dawce jednorazowej lub po jednorazowym narażeniu.

**Toksykodynamika** – bezpośrednie działanie substancji chemicznej lub jej metabolitu na poziomie komórki i narządu docelowego organizmu.

**Toksykokinetyka** – ilościowa charakterystyka procesów wchłaniania, rozmieszczenia, biotransformacji i wydalania substancji chemicznej lub jej metabolitu z organizmu.

**Toksykometria** – dział toksykologii zajmujący się ilościową oceną toksyczności substancji chemicznych.

**Tolerancja** – zdolność organizmu do przetrwania i funkcjonowania w warunkach szkodliwego oddziaływania zanieczyszczeń.

**Współczynnik biokoncentracji** (ang. *bioconcentration factor*) (**BCF**) – stosunek stężenia substancji chemicznej w organizmie zwierzęcia do stężenia tej samej substancji w otaczającym środowisku.

**Współczynnik biokumulacji** (ang. *bioaccumulation factor*) (**BAF**) – stosunek stężenia substancji chemicznej w organizmie zwierzęcia do stężenia tej samej substancji w pożywieniu.



# 4 IZOLACJA NIEZNANEJ TRUCIZNY Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Obiektem analiz toksykologicznych są różnorodne materiały: krew, moczu i inne wydaliny, włosy, materiał sekcyjny, części roślin, próby wody, powietrza, gleby, artykuły żywnościowe i napoje, leki i preparaty chemiczne stosowane w gospodarstwie domowym, rolnictwie czy ogrodnictwie. Wybranie odpowiedniego materiału, w którym przypuszczamy, że znajduje się największa ilość poszukiwanej trucizny, ma istotnie znaczenie w analizie jakościowej i ilościowej. Specyfiką analizy toksykologicznej jest często niepewność materiału i jego ograniczona ilość. Metody stosowane w analizie toksykologicznej powinny być specyficzne, wypróbowane i czułe. Charakterystyczną cechą jest konieczność wykrywania i oznaczenia trucizny w materiale biologicznym. Sprawia to dużą trudność, ponieważ trucizna może występować w połączeniu z różnymi związkami organicznymi, ulegać biotransformacji czy rozkładowi. W zależności od stanu skupienia, właściwości fizykochemicznych trucizn oraz rodzaju badanego materiału stosuje się odpowiednie metody wyodrębniania substancji toksycznych. Podział trucizn według metody ich izolacji z materiału biologicznego jest następujący:

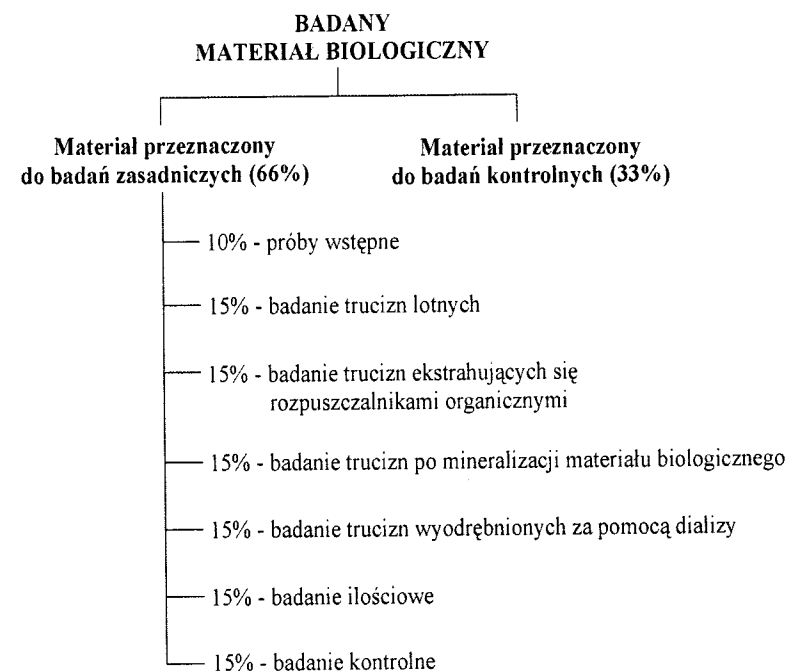
1. trucizny lotne,
2. trucizny rozpuszczalne w wodzie,
3. nielotne trucizny organiczne,
4. trucizny metaliczne.

W analizie toksykologicznej, obok barwnych reakcji charakterystycznych z odczynnikami chemicznymi lub testów biologicznych, stosuje się następujące metody analityczne: spektrofotometrię w świetle widzialnym, nadfiolecie i podczerwieni, metody elektrometryczne, chromatografię cienkowarstwową, gazową, wysokosprawną chromatografię cieczową, atomową spektrometrię absorpcyjną, spektrometrię masową, metody enzymatyczne i immunologiczne. Charakterystykę wybranych metod analitycznych w toksykologii przedstawia tabela 4.1. Materiał biolo-

giczny przeznaczony do analiz toksykologicznych jest zazwyczaj dzielony według schematu przedstawionego na rycinie 4.1.

Tabela 4.1. Porównanie wybranych metod analitycznych według Bäumlera.

Metoda	Wykrywalność (µg)	Specyficzność	Czasochłonność	Koszt	Wymagania w zakresie oczyszczania prób
Metody fizykochemiczne	500-1000	+	+	+	+++
Spektrofotometria w zakresie UV	10-15	+	+	+	+
Spektrofotometria w zakresie IR	20-1000	++++	+++	+	+++
Chromatografia cienkowarstwowowa	0,1-20	+++	+	+	-
Chromatografia gazowa	0,01-1	+	+	+++	+
Spektrometria masowa	0,01-1	++++	+++	++++	+
++++, wartość najwyższa					



Ryc. 4.1. Podział materiału biologicznego przeznaczonego do analiz toksykologicznych.

## 4.1. Próby wstępne w analizie toksykologicznej

Badania wstępne posiadają bardzo istotne znaczenie, gdyż wynik dodatni może ułatwić i skrócić czas analiz. Polegają one na określeniu cech zewnętrznych badanego materiału (stan skupienia, barwa, woń, odczyn) oraz wykonaniu prostych testów chemicznych w badanym materiale bezpośrednio identyfikujące:

- **związki arsenu** – reakcja arsenowodoru z  $\text{AgNO}_3$  (zabarwienie żółte) – próba Gutzeita;
- **sole rtęci (I)** – reakcja z 1M KOH (zabarwienie czarne);
- **sole rtęci (II)** – reakcja z 1M KOH (zabarwienie żółtoczerwone);
- **morfina** – reakcja z odczynnikiem Marquisa: 1  $\text{cm}^3$  stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 2-3 krople 40% formaliny (zabarwienie purpurowoczerwone przechodzące w niebieskofioletowe);
- **fenol** – reakcja z 2%  $\text{FeCl}_3$  (zabarwienie niebieskie lub fioletowe).

Ponadto można wykonać próby na obecność substancji toksycznych w analizowanym materiale poprzez obserwacje zjawisk zachodzących przy podwyższonej temperaturze lub odpowiednim zabarwieniu płomienia utleniającego:

- niewielką ilość badanego materiału umieścić w próbówce i ogrzewać aż do wyprężenia. Obserwować zmiany zachodzące w badanym materiale (Tabela 4.2);

Tabela 4.2. Zjawiska obserwowane podczas ogrzewania substancji.

Efekt ogrzewania	Obecność w próbce
Zwęglenie	substancje organiczne
Żółty nalot	S, $\text{As}_2\text{S}_3$
Szary nalot	Hg, As
Czarny nalot, po potarciu czerwony	HgS
Zapach $\text{NH}_3$	sole amonowe
Zapach $\text{H}_2\text{S}$	S
Zapach octu	$\text{CH}_3\text{COO}^-$
Białe dymy	$\text{SO}_4^{2-}$
Brunatne dymy	$\text{NO}_x$

- pozostałość po wyprężeniu zwilżyć wodą destylowaną. Ezę platynową, zwilżoną stężonym HCl, zanurzyć w próbce i wprowadzić do płomienia utleniającego. Obserwować zmiany płomienia (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Barwienie płomienia podczas spalania związków metalicznych.

Zabarwienie płomienia	Obecność w próbce
Żółte	Na
Ceglastoczerwone	Ca
Karmazynowe	Sr
Niebieskie	Hg, As, Sb, Bi
Niebieskozielone	Cu
Żółtozielone	Ba

Zgodnie z przyjętym podziałem trucizn z otrzymanego do badań materiału wyodrębnia się trucizny lotne z parą wodną poprzez destylację najpierw z kwaśnego, a następnie zasadowego środowiska (patrz rozdział 4.2) lub za pomocą mikrodyfuzji (patrz rozdział 4.3). Destylat poddaje się analizie na poszczególne trucizny. Nową porcję materiału lub pozostałość po destylacji należy poddać dializie (patrz rozdział 4.6), zaś otrzymany dializat zbadać na obecność substancji dających się wylugować wodą. Z kolejnej porcji materiału izoluje się alkaloidy, leki, pestycydy i inne nielotne, hydrofobowe substancje organiczne według metody Stass-Otto (wytrawianie zakwaszonym alkoholem, oczyszczanie otrzymanego wyciągu, ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi) (patrz rozdział 4.4). Trucizny metaliczne wyodrębnia się z materiału po uprzednim jego zmineralizowaniu za pomocą dobranej odpowiednio metody opisanej w rozdziale 4.5, natomiast ich jakościowe i ilościowe analizy zostały przedstawione w rozdziale 7.

## 4.2. Izolacja trucizn lotnych – destylacja z parą wodną

Trucizny lotne, takie jak: cyjanowodór, metanol, aceton, chloroform, anilina, można wyodrębnić z materiału biologicznego za pomocą destylacji z parą wodną, mikrodyfuzji lub aeracji. Najczęściej stosowaną metodą izolowania trucizn lotnych w analizie toksykologicznej jest destylacja z parą wodną. Metoda ta pozwala na wyodrębnianie trucizn, które występują w badanym materiale w niewielkich ilościach oraz ulegają rozkładowi w czasie ogrzewania w niższej temperaturze niż podczas normalnej destylacji. Destylacja z parą wodną polega na zmianie stanu skupienia substancji toksycznej zawartej w wodzie w stan gazowy strumieniem doprowadzonej pary wodnej. Wykorzystywane jest tu zjawisko sumowania się prężności par cząstkowych substancji (wody i oznaczanej trucizny), co znacznie obniża temperaturę wrzenia analizowanych związków toksycznych. Umożliwia to oczyszczanie wysoko wrzących substancji przez destylację w stosunkowo niskiej temperaturze.

W zależności od odczynu (pH) wyodrębnianych substancji destylację z parą wodną można prowadzić ze środowiska kwaśnego (trucizny o charakterze kwaśnym) lub ze środowiska zasadowego (trucizny o charakterze zasadowym). Niekiedy stosuje się również typ destylacji mieszanej tej samej próby badanego materiału, który składa się z dwóch etapów. Najpierw przeprowadza się destylację z roztworu kwaśnego, a następnie po zalkalizowaniu – z roztworu zasadowego.

Destylację z parą wodną można prowadzić pod normalnym ciśnieniem lub w próżni, używając zarówno pary nasyconej, jak i przegrzanej. Przy wyodrębnianiu substancji nietrwałych szczególnie polecany jest typ destylacji z parą wodną w próżni.

Typowy zestaw do destylacji z parą wodną składa się z następujących elementów:

1. **kolby okrągłodennej**, w której umieszcza się materiał przeznaczony do destylacji (mieszanka lub związek stały z niewielką ilością wody), przez który zostaje przepuszczony gorący strumień pary wodnej;
2. **nasadki tzw. „łapacza cieczy”**, w którą jest zaopatrzona kolba (jej rola polega na zapobieganiu przerzucania zawartości kolby do odbieralnika);
3. **kolby połączonej rurką z kolbą destylacyjną, ustawionej nad palnikiem lub w płaszczu grzejnym** (ogrzana w kolbie woda paruje, a strumień pary jest kierowany za pomocą rurki bocznej do kolby zawierającej materiał do destylacji);
4. **odbieralnika**;
5. **chłodnicy**.

#### 4.2.1. Destylacja z parą wodną z roztworu kwaśnego

Ten rodzaj destylacji stosuje się przede wszystkim dla trucizn o charakterze kwaśnym. Materiał do badania należy starannie rozdrobnić, zmieszać z wodą destylowaną i przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 1 litra. Jeżeli badany materiał ma odczyn obojętny lub alkaliczny zakwasza się 5% roztworem kwasu winowego do odczynu wyraźnie kwaśnego. Postępowanie to ma na celu przeprowadzenie nielotnych soli w lotne kwasy. Natomiast, jeżeli odczyn jest kwaśny dodaje się 5% wodny roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w ilości potrzebnej do zobojętnienia badanego materiału. Następnie dodaje się kwas winowy w nadmiarze, około 1-2% w stosunku do użytej ilości węglanu w celu neutralizacji mocnych kwasów nieorganicznych, które mogą spowodować rozkład analizowanych substancji.

Po uzyskaniu odczynu kwaśnego przed przystąpieniem do destylacji z parą wodną zaleca się przeprowadzenie orientacyjnej próby wstępnej Schönbeina na obecność cyjanowodoru i cyjanków (patrz rozdział 4.2.1.1).

Destylację należy rozpocząć natychmiast po dołączeniu kolby z badaniem roztworem do aparatu w celu uniknięcia strat i zapobiegnięcia ewentualnych zmian

zachodzących w materiale biologicznym. W zależności od wyniku próby wstępnej na obecność cyjanków destylację przeprowadza się następująco:

- a) **gdy próba na cyjanki jest dodatnia** koniec przedłużacza zanurzyć w 5% wodnym roztworze NaOH i zebrać około 5 cm<sup>3</sup> destylatu (**frakcja I**). Dzięki temu obecny cyjanowodór zostanie całkowicie związany w roztworze pochłaniającym.

Następnie zmieniając odbieralniki zebrać kolejne frakcje destylatu o podanych objętościach:

- **frakcja II** – od 20 do 25 cm<sup>3</sup>,
- **frakcja III** – od 20 do 30 cm<sup>3</sup>,
- **frakcja IV** – około 30 cm<sup>3</sup>.

- b) **gdy próba na cyjanki jest ujemna** zbiera się tylko frakcje II, III i IV.

W ten sposób oddziela się od siebie substancje toksyczne różniące się lotnością, punktem wrzenia, ciężarem właściwym, zapachem i rozpuszczalnością w wodzie.

Przybliżona kolejność destylacji najczęściej spotykanych trucizn przedstawia się następująco:

- **destylat I** – cyjanki;
- **destylat II** – metanol, aceton, etanol, benzen, nitrobenzen;
- **destylat III** – chloroform, anilina, fenol, pirydyna;
- **destylat IV** – aldehyd mrówkowy, aldehyd trichlorooctowy.

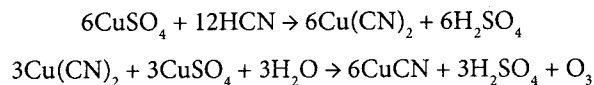
Wykonując reakcje charakterystyczne na obecność substancji toksycznych, należy zwrócić uwagę na wygląd, barwę i zapach destylatu. **Destylaty jednorodne** mogą wskazywać na obecność związków rozpuszczalnych w wodzie, takich jak: cyjanki, aceton, alkohole, kwasy, aldehyd mrówkowy, lub nieznaczne ilości aniliny lub fenolu. **Destylaty niejednorodne** charakteryzują się tym, że eter i węglowodory zbierają się na powierzchni wody, natomiast chloroform, nitrobenzen, anilina i disiarczek węgla – pod warstwą wody. Nitrobenzen posiada barwę żółtą. Anilina, fenol i krezole powodują zmętnienie destylatu. Większość lotnych trucizn ma charakterystyczny zapach, co pozwala na ich szybką identyfikację.

##### 4.2.1.1. Próba Schönbeina na cyjanki

1/10 badanego materiału o kwaśnym odczynie umieścić w kolbce o pojemności 50 cm<sup>3</sup>, zamknąć korkiem, w którym wcześniej należy umieścić papierek wskaźnikowy Schönbeina. Kolbkę ogrzewać w łaźni wodnej przez 5 minut. Zabarwienie się papierka na kolor niebieski wskazuje na obecność cyjanowodoru.

**Papierek wskaźnikowy Schönbeina:** pasek bibuły nasycić świeżo sporządzonym etanolem roztworem żywicy gwajakolowej (1:10), wysuszyć. Przed użyciem zwilżyć rozcieńczonym (1:2000) 10% roztworem  $\text{CuSO}_4$ .

W wyniku reakcji siarczanu (VI) miedzi (II) i cyjanowodoru powstaje ozon, który utlenia żywicę gwajakolową, dając w ten sposób niebieskie zabarwienie:



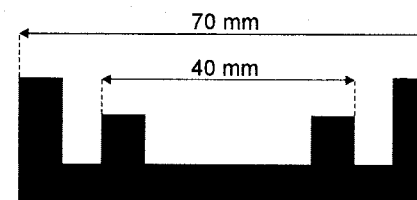
Dodatni wynik próby może również wskazywać na obecność takich związków jak:  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ , pary chloru i amoniak.

#### 4.2.2. Destylacja z parą wodną z roztworu alkalicznego

Do grupy trucizn destylujących ze środowiska alkalicznego należą substancje o charakterze zasadowym, takie jak: koniina, anilina, efedryna, nikotyna czy amfetamina. Destylacja z roztworu alkalicznego może być prowadzona z tego samego materiału badanego po zakończeniu destylacji kwaśnej lub też wyłącznie jako alkaliczna. W obu przypadkach zawartość kolby destylacyjnej alkalizuje się roztworem  $\text{NaOH}$  lub stałym  $\text{MgO}$  do  $\text{pH}=10$ . Destylat zbiera się do odbieralnika, do którego należy wcześniej dodać  $5 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ M}$  roztworu  $\text{HCl}$ , dzięki czemu badane substancje przeprowadza się w chlorowodorki. Po zakończonej destylacji uzyskany destylat odparowuje się do sucha w łaźni wodnej, a pozostałe w ten sposób chlorowodorki rozpuszcza się w minimalnej ilości wody. Dzieli się na dwie części, w pierwszej – po przeprowadzonej dializie bada się zawartość anionów, a w drugiej – trucizny metaliczne.

### 4.3. Izolacja trucizn lotnych – metoda mikrodyfuzji

Proces mikrodyfuzji przeprowadza się w specjalnych naczynkach Conwaya (Ryc. 4.2) lub kolbach Widmarka, które umożliwiają przenikanie lotnych substancji do roztworu rozpuszczalnika. Metoda ta polega na umieszczeniu w zewnętrznym przedziale naczynka Conwaya badanego materiału biologicznego, np. krwi, osocza, moczu, homogenatu tkankowego, z którego będzie dyfundować substancja lotna, a w drugim wewnętrznym przedziale odpowiedni, czysty rozpuszczalnik. Naczynko należy nakryć szklaną przykrywką i uszczelnić je wazeliną lub silikonem. Przygotowaną w ten sposób próbę pozostawić na kilka godzin. Substancja lotna zaczyna dyfundować do rozpuszczalnika i po pewnym czasie ustala się stan równowagi. Otrzymany w ten sposób roztwór lotnych substancji w czystym rozpuszczalniku służy do identyfikacji i/lub ilościowego oznaczania trucizn w próbce.



Ryc. 4.2. Przekrój poprzeczny przez naczynko Conwaya.

W przypadku mikrodyfuzji można również zastosować rozpuszczalnik, który łatwo wiąże się z lotną substancją, tworząc w tym przypadku nielotny związek. Do badanego materiału biologicznego należy często dodać substancję, które mają właściwości uwalniania związków toksycznych z nielotnych połączeń. Na przykład cyjanki z postaci nielotnej po zakwaszeniu przechodzą w cyjanowodór, który w tej postaci swobodnie dyfunduje do drugiego przedziału naczynka Conwaya, gdzie zostaje związany przez roztwór  $\text{NaOH}$ .

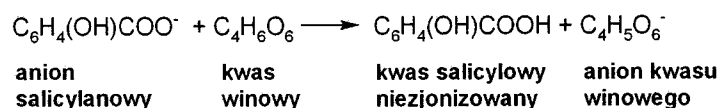
Przebieg procesu mikrodyfuzji może zależeć od następujących czynników:

- ciśnienia par substancji lotnej (substancje odznaczające się większym ciśnieniem par dyfundują znacznie szybciej),
- objętości roztworu (mniejsza objętość roztworu znacznie skraca czas dyfuzji),
- właściwości substancji absorbujących,
- temperatury, przy której zachodzi mikrodyfuzja (podwyższenie temperatury znacznie przyspiesza proces dyfuzji),
- stężenia soli w roztworze (duże stężenie soli przyspiesza proces dyfuzji, np. alkohol etylowy znacznie szybciej dyfunduje z nasyconego roztworu węgla potasu).

Metoda mikrodyfuzji charakteryzuje się łatwością wykonania i możliwością otrzymania roztworu badanej, lotnej trucizny w czystym rozpuszczalniku. Pozwala ona na sporządzenie dużej ilości prób z małych ilości materiału biologicznego. Metoda ta eliminuje także takie czynniki jak: pienienie się badanego materiału w czasie destylacji oraz nadmierne jego rozcieńczenie.

## 4.4. Izolacja i oczyszczanie nielotnych trucizn organicznych

Metody izolacji nielotnych trucizn organicznych opierają się na ekstrakcji za pomocą dwóch niemieszających się ze sobą faz: wodnej i organicznej, do której podczas ekstrakcji przechodzą substancje obojętne oraz związki kwaśne lub zasadowe wyłącznie w formie niezjonizowanej. Forma niezjonizowana kwasów i zasad jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, natomiast dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych. Ekstrakcję kwasu organicznego eterem przeprowadza się za pomocą kwasu winowego, siarkowego lub fosforowego. Kwas organiczny nierozpuszczający się w eterze przechodzi w postać niezjonizowaną:



W podobny sposób ekstrahuje się zasady organiczne, które za pomocą wodorotlenku sodu, węgla sodu, wodorowęglanu sodu lub wodorotlenku amonu przechodzą w formę niezjonizowaną.

Bardzo słabe zasady organiczne, jak: kofeina, fenazon, papaweryna trudno przyjmują protony. Można je ekstrahować ze środowiska kwaśnego, gdy pH fazy wodnej nie jest niższe od wartości określonej przez wykładnik kwasowości kationu  $pK_z$ . Z kolei bardzo słabe kwasy można wyekstrahować ze środowiska alkalicznego, gdy pH fazy wodnej jest niższe od wykładnika kwasowości  $pK_k$ .

Istnieją alkaloidy oraz inne zasady organiczne, których charakter elektrochemiczny jest zdeterminowany nie tylko zasadowym azotem w cząsteczce, ale także obecnością grup fenolowych, enolowych i karboksylowych. W obecności kwasu następuje asocjacja protonu przy azocie, natomiast pod wpływem zasady zachodzi dysocjacja protonu grupy o charakterze kwasowym. Związek w obu przypadkach przechodzi w postać niezjonizowaną, która nie daje się wyekstrahować organicznym rozpuszczalnikiem. Związki tego typu można wyekstrahować tylko w wąskim zakresie pH wokół ich punktu izoelektrycznego.

W analizie toksykologicznej stosuje się ekstrakcję kolejno ze środowiska kwaśnego i alkalicznego następujących substancji toksycznych:

1. ze środowiska zakwaszonego kwasem winowym ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi:
  - słabe kwasy organiczne i związki fenolowe,

- bardzo słabe zasady,
  - hydrofobowe substancje obojętne,
2. ze środowiska zalkalizowanego wodorowęglanem sodu ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi:
    - zasady organiczne (alkaloidy i leki syntetyczne),
  3. ze środowiska amoniakalnego ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi:
    - słabe zasady organiczne o charakterze amfoterycznym, np. morfinę,
  4. w warstwie wodnej pozostają:
    - silne kwasy i zasady w formie zjonizowanej,
    - hydrofilowe substancje obojętne.

W celu wyodrębnienia z badanego materiału w/w trucizn stosuje się najczęściej **metodę Stass-Otto** lub jej modyfikację. Zasada tej metody opiera się na założeniach, że substancje tej grupy rozpuszczają się niemal bez wyjątku w alkoholu lub gorącej wodzie i można je wyekstrahować z wodnych roztworów o odpowiednim pH przez wytrząsanie rozpuszczalnikami organicznymi. W związku z tym, że metoda ta posiada liczne wady (niewystarczająca wykrywalność, długi czas analizy, niski stopień oczyszczenia substancji, konieczność pobierania dużych ilości materiału do badań i kosztownych rozpuszczalników) wprowadzono jej liczne modyfikacje.

Jedną z najczęściej stosowanych modyfikacji metody Stass-Otto jest izolacja trucizn organicznych poprzez ekstrakcję ciągłą etanolem (**metoda Curry**). Polega ona na zhomogenizowaniu materiału biologicznego w 95% alkoholu etylowym w temperaturze pokojowej. W specjalnym aparacie próżniowym następuje odparowanie alkoholu i wytrącenie białek bezwodnym etanolem. Suchą pozostałość wymywa się etanolem i poddaje się analizom (reakcje barwne próbówkowe lub analiza chromatograficzna).

Innym sposobem usprawnienia metody Stass-Otto jest zastosowanie ekstrakcji ciągłej rozpuszczalnikami organicznymi w specjalnych aparatach, co znacznie skraca czas analizy. Rozdrobniony materiał oczyszcza się od ciał balastowych w temperaturze 100 °C za pomocą  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i rozcieńczonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Oczyszczony wyciąg wodny poddaje się 2-krotnie ekstrakcji ciągłej, początkowo eterem ze środowiska kwaśnego, a następnie chloroformem ze środowiska zasadowego (**metoda Borkowskiego**).

Rzadziej stosowane metody izolacji i oczyszczania nielotnych trucizn, zwłaszcza termolabilnych, organicznych opierają się na enzymatycznym rozkładzie balastów (za pomocą pepsyny), powolnym zamrażaniu i szybkim rozmrażaniu tkanek, zastosowaniu ultradźwięków czy dializie (patrz rozdział 4.6).

Tok postępowania przy oznaczaniu trucizn ekstrahujących się rozpuszczalnikami organicznymi sprowadza się do trzech etapów:

1. ekstrakcji z badanego materiału biologicznego i oczyszczenia,
2. podziału ekstraktu na odpowiednie grupy,
3. reakcji identyfikacji.

Badany materiał należy wytrawić za pomocą zakwaszonego etanolu, aby oddzielić substancje trujące od ciał balastowych: białek, tłuszczu i węglowodanów. W przypadku syntetycznych leków (tabletek, pastylek, aerozoli, kropli, roztworów iniekcyjnych, niektórych surowców i wyciągów z surowców leczniczych) wytrawianie nie jest konieczne, gdyż substancje te nie zawierają związków emulgujących. Materiały takie przed ekstrakcją należy rozpuścić w wodzie destylowanej zakwaszonej 10% roztworem kwasu winowego i wykonać odpowiednie reakcje identyfikacji. W pozostałych przypadkach (materiał pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego) konieczna jest ekstrakcja za pomocą etanolu i oczyszczenie wyciągów etanolowych.

#### 4.4.1. Ekstrakcja z materiału stałego o niewielkiej zawartości wody

Materiał biologiczny w postaci stałej o niewielkiej zawartości wody (surowce sproszkowane, pigułki, drażetki, sucha żywność, kał, części zwłok) wymaga 2-krotnego wytrawienia 95% etanolem. Ekstrakcję należy rozpocząć od rozdrobnienia i zakwaszenia materiału 10% roztworem kwasu winowego i roztarcia w moździerzu. Następnie badany materiał przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> połączonej z chłodnicą powietrzną lub zwrotną i dodać co najmniej podwójną ilość 95% etanolu. Kolbę należy zamknąć korkiem zaopatrzonej w chłodnicę i ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze 50-55 °C przez 2-2,5 godziny. W czasie ekstrakcji należy unikać wyższych temperatur, gdyż szereg związków (kokaína, atropina, glikozydy, apomorfina) może ulec rozkładowi. Gdy celem ekstrakcji są substancje niewrażliwe na działanie wysokich temperatur, warunki reakcji mogą ulec zaostrzeniu do temperatury wrzenia. W przypadku, gdy podejrzewamy obecność w materiale strychniny, zaleca się aby próba była ogrzewana ze stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> przez okres 2 godzin we wrzącej łaźni wodnej.

Podczas ekstrakcji należy w odstępach 30 minutowych sprawdzać kwasowość odczynu. Po zakończeniu ekstrakcji zawartość kolby przesączyć przez karbowany sączek zwilżony etanolem, przelać do parownicy i ostrożnie odparować alkohol w łaźni wodnej w temperaturze 50 °C do uzyskania syropowatej konsystencji ekstraktu. Następnie ekstrakt poddać procesowi oczyszczania, aby wyeliminować substancje balastowe, takie jak: żywice, tłuszcze czy białka. Do zagęszczonego ekstraktu dodawać kroplami 96% etanol, ciągle mieszając. Powoduje to ścięcie białek i wydzielanie ich z roztworu, który należy przesączyć, zagęścić i ponownie dodać etanol. Czynność tę powtarzać kilkakrotnie do momentu całkowitego usunięcia

białek. Do ostatniego oczyszczania zaleca się zastosowanie alkoholu absolutnego. W kolejnym etapie dodawać kroplami zimną wodę destylowaną do łącznej objętości 25 cm<sup>3</sup>, aby wytrącić resztki tłuszczu i żywicy, które po odstaniu przesączają się. W miarę potrzeby czynność powtarzać, aż do uzyskania klarownego roztworu wodnego, który po zagęszczeniu do 20 cm<sup>3</sup> poddać ekstrakcji (patrz rozdział 4.4.4).

#### 4.4.2. Ekstrakcja z materiału płynnego

Materiał biologiczny w postaci cieczy i roztworów poddany badaniom toksykologicznym to najczęściej: napary, odwary, wyciągi płynne, nalewki, emulsje, mleko, krew, mocz, treść żołądkowa lub jelitowa oraz pozostałość po destylacji z parą wodną. Materiał ten nie nadaje się bezpośrednio do ekstrakcji za pomocą rozpuszczalników organicznych ze względu na tworzenie się emulsji, wymaga więc przed ekstrakcją dodatkowego przygotowania.

W pierwszym etapie należy sprawdzić pH analizowanej próby. Jeżeli odczyn jest kwaśny zalkalizować 5% roztworem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i następnie zakwasić 10% roztworem kwasu winowego. Jeżeli natomiast odczyn jest obojętny lub alkaliczny zakwasić stałym kwasem winowym do odczynu kwaśnego. Następnie płynny materiał zagęścić do konsystencji syropu, dodać podwójną ilość 95% etanolu i przenieść do kolby okrągłodennej zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną. Proces ekstrakcji prowadzić w temperaturze 50 °C, ogrzewając w łaźni wodnej przez 20 minut. Uzyskany w ten sposób wyciąg alkoholowy przesączyć przez sączek zwilżony etanolem, przelać do parownicy i ostrożnie odparować alkohol w łaźni wodnej w temperaturze 50 °C. Dalsze postępowanie – dodawanie etanolu i wody z naprzemiennym sączeniem i odparowywaniem – jest analogiczne jak w rozdziale 4.4.1.

#### 4.4.3. Ekstrakcja z materiałów bogatych w tłuszcze

Materiały zasobne w tłuszcze (kremy, emulsje, maści, mydła, pasty, plastry, czopki, oleje, śmietana, majonez) zaleca się wytrawiać 60% alkoholem etylowym, który jest wystarczający do rozpuszczenia poszukiwanych trucizn i oddzielenia balastowych ciał tłuszczowych. Dobrym sposobem na usunięcie nadmiernej ilości tłuszczu z badanego materiału jest jego wymrożenie lub ekstrakcja benzyną w kwaśnym środowisku (część związków rozpuszcza się w benzynie, np. insektycydy polichlorowe).

Do badanego materiału dodać 3-krotną objętością 60% etanolu i ogrzewać pod chłodnicą zwrotną w łaźni wodnej. Do tłuszczu płynnych należy dodać nieco stałej parafiny. Po zakończeniu ekstrakcji ciepły wyciąg alkoholowy przelać do parownicy i oziębić. Po oddzieleniu się warstwy tłuszczowej roztwór przesączyć przez sączek zwilżony etanolem i zagęścić do konsystencji gęstego syropu. Dalsze postępowanie jest analogiczne jak w rozdziale 4.4.1.

#### 4.4.4. Podział ekstraktów nielotnych trucizn organicznych

Uzyskany wodny, kwaśny roztwór (patrz rozdział 4.4.1) poddać ekstrakcji w celu wyodrębnienia z niego trucizn. Ekstrakcję prowadzić w różnych środowiskach z użyciem różnych rozpuszczalników, co pozwoli na rozdzielanie poszczególnych grup trucizn o odmiennych właściwościach kwasowo-zasadowych i innej rozpuszczalności. Ekstrakcja trucizn z wodnego roztworu polega na tym, że roztwór ten przenosi się do rozdzielacza i wytrząsa 2-3-krotnie z równymi objętościami rozpuszczalnika organicznego (rozdzielacz napełniamy mieszaniną do 1/3 jego objętości). Wytrząsanie prowadzić przez około 10 minut, zwracając uwagę, aby nie powstała emulsja. Po oddzieleniu wody warstwę rozpuszczalnika suszyć, wytrząsając z odrobiną  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , przesączyć i odparować do sucha w łaźni wodnej. Suszenie warstwy rozpuszczalnika z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  jest szczególnie zalecane w przypadku ekstrakcji eterem, gdyż rozpuszczalnik ten łatwo miesza się z wodą, z której do eteru mogą przedostawać się związki (mocznik, kwas winowy) utrudniające identyfikację toksyn.

W zależności od pH środowiska ekstrakcji i od zastosowanego rozpuszczalnika ekstrahuje się różnorodne substancje toksyczne:

1. za pomocą eteru ze środowiska kwaśnego ekstrahuje się związki o charakterze kwaśnym, obojętnym, fenolowym lub słabo zasadowym, takie jak: kwas salicylowy, acetanilid, fenacetyna, fenazon, aminofenazon, dulcyna, kwas pikrynowy, barbiturany, meprobumat, kofeina, piramidon, antypiryna, weronal, ewipan, dial, luminal, kolchicina, alkaloidy sporyszu, glikozydy digitalis, insektycydy fosforoorganiczne i polichlorowe. Mogą znajdować się również ślady atropiny, papaweryny i weratryny. Po oddzieleniu warstwę eterową odparowuje się do sucha na szkiełku zegarkowym i przeprowadza reakcje identyfikacji (**grupa A**);
2. z warstwy wodnej usuwa się resztki eteru i ekstrahuje się gorącym chloroformem. Następnie warstwę chloroformową odparowuje się do sucha na szkiełku zegarkowym, a z suchej pozostałości otrzymuje się: kofeinę, aminofenazon, fenazon i pozostałe substancje (**grupa B**), które nie zostały całkowicie wyekstrahowane eterem (grupa A);
3. pozostały roztwór winianów alkaloidów po oddzieleniu resztek chloroformu alkalizuje się roztworem  $\text{NaHCO}_3$  i wytrząsa kilkakrotnie eterem. Połączone wyciągi eterowe należy osuszyć bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , przesączyć i odparować do sucha. Do alkalicznego ekstraktu eterowego przechodzą związki o charakterze zasadowym, tzn. większość alkaloidów: strychnina, brucyna, weratryna, atropina, skopolamina, chinina, kodeina, papaweryna, pilokarpina, emetyna, kokaina, koniina, nikotyna, narkotyna, tebaina, heroina, akonityna, nowokaina, anilina czy dionina (**grupa C**);

4. alkaliczny wodny roztwór uwalnia się z resztek eteru poprzez podgrzanie, zakwasza się lekko wobec papierka wskaźnikowego HCl i alkalizuje amoniakiem. Roztwór po oddzieleniu warstwy eterowej ekstrahuje się kilkakrotnie gorącym chloroformem w nadmiarze (mała rozpuszczalność morfiny w chloroformie). Wyciągi chloroformowe osusza się bezwodnym siarczanem sodu, sączy i odparowuje. W suchej pozostałości wykonuje się reakcję na identyfikację morfiny (**grupa D**);
5. alkaliczny wodny roztwór zakwasza się 10% HCl, a następnie alkalizuje amoniakiem. Zmiana zabarwienia z zielonego po dodaniu HCl oraz na różowe po dodaniu amoniaku świadczy o obecności apomorfiny. Roztwór po oddzieleniu warstwy eterowej ekstrahuje się kilkakrotnie eterem. W ekstrakcie poza apomorfiną może znajdować cefalina;
6. wiele trucizn w wyniku procesów detoksykacji zachodzących w organizmie ulega wydaleniowi z moczem w postaci połączeń z  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lub kwasem glukuronowym, których ze względu na niewielką rozpuszczalność nie da się wyekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi. Metabolity te przed ekstrakcją muszą ulec hydrolizie. W tym celu wodną pozostałość, po oddzieleniu chloroformu, należy zalać stężonym HCl (w 1/10 objętości) i ogrzewać w łaźni wodnej o temperaturze 80 °C przez 15 minut. Następnie oziębic i doprowadzić 1 M NaOH do pH=8-9 i ekstrahować 3-krotnie 30 cm<sup>3</sup> octanu etylu. Połączone wyciągi odparować do sucha;
7. w warstwie wodnej po oddzieleniu octanu etylu pozostają substancje, które nie ekstrahują się rozpuszczalnikami organicznymi, np. kumaryna.

Uzyskane ekstrakty eterowe i chloroformowe po odparowaniu służą do identyfikacji trucizn za pomocą odpowiednich reakcji barwnych i osadowych, prób biologicznych lub metod chromatograficznych (najczęściej stosuje się chromatografię cienkowarstwową), analizy właściwości fizykochemicznych, np. oznaczenie punktu topnienia. Przed przystąpieniem do wykrywania związków toksycznych należy sprawdzić czy w otrzymanym osadzie występują alkaloidy. Używa się do tego odpowiednich odczynników chemicznych:

1. **10% wodny roztwór taniny** w reakcji z alkaloidami tworzy białe lub żółtawe osady, z kofeiną powstaje osad barwy cielistej rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika;

**ODCZYNNIK:** 1 g taniny rozpuścić w 8 g wody i 1 g etanolu.

2. **1% wodny roztwór kwasu pikrynowego** daje osady z prawie wszystkimi alkaloidami, z wyjątkiem następujących: akonityny, kofeiny, teobrominy, koniiny, morfiny;

3. **odczynnik Dragendorffa** tworzy z alkaloidami osady barwy ceglastej;

**ODCZYNNIK:** 8 g zasadowego azotanu (V) bizmutu (III) rozpuścić w 20 g  $\text{HNO}_3$  i wlać do stężonego wodnego roztworu KI zawierającego 27,2 g KI w niewielkiej ilości wody. Po kilku dniach przesączyć, a klarowny przesącz uzupełnić wodą do objętości 100  $\text{cm}^3$ . Można zakupić gotowy odczynnik Dragendorffa.

4. **odczynnik Bouchardta** z alkaloidami oraz syntetycznymi związkami miejscowo znieczulającymi tworzy osady żółte lub żółtobrunatne strącające się w kwaśnych roztworach;

**ODCZYNNIK:** 1 g jodu i 2 g KI rozpuścić w 250  $\text{cm}^3$  wody destylowanej.

5. **odczynnik Sonnenscheina** tworzy z alkaloidami osady o barwie od białżółtej do jasnobrunatnej;

**ODCZYNNIK:** do 10% roztworu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dodać 10% roztwór molibdenianu (VI) amonu w  $\text{HNO}_3$ . Powstały osad po zdekantowaniu rozpuścić w możliwie jak najmniejszej ilości roztworu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Otrzymany roztwór odparować do sucha i wyprażyć do całkowitego pozbycia się amoniaku. Pozostałość rozpuścić w 10-krotnej ilości wody i następnie dodać taką objętość  $\text{HNO}_3$ , aby tworzący się początkowo osad uległ całkowitemu rozpuszczeniu.

6. **5% wodny roztwór kwasu krzemowowolframowego** ( $\text{H}_4\text{SiO}_4 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) tworzy z alkaloidami nierozpuszczalne w wodzie osady o zabarwieniu białym, żółtym lub czerwonym.

Podczas wykonywania reakcji charakterystycznych dla poszczególnych grup związków należy pamiętać o następujących zasadach:

- używać niewielkich ilości substancji badanej (kilka kryształów lub 1-2 kropli roztworu), do których dodaje się po kropli lub dwóch odpowiedniego odczynnika;
- zmianę barwy należy obserwować na zimno, a następnie po ogrzaniu;
- obok reakcji z substancją badaną należy wykonywać próby ze znanymi (wzorcowymi) substancjami w tych samych warunkach, najlepiej na porcelanowej płytce z wgłębieniami, gdzie obok siebie można umieścić kilka znanych substancji z próbą badaną i jednocześnie przeprowadzić reakcje;
- reakcje z odczynnikami osadowymi są najlepiej widoczne na ciemnych szklanych płytkach.

## 4.5. Metody mineralizacji materiału biologicznego

Mineralizacja ma na celu rozkład substancji organicznych oraz przeprowadzenie połączeń nieorganicznych w postaci jonową, co pozwala na wyodrębnienie związku metalicznego z badanego materiału. W praktyce analitycznej stosowane są najczęściej dwie podstawowe metody mineralizacji: metoda sucha i metoda mokra. Coraz większe znaczenie wykazują następujące metody mineralizacji: metoda mineralizacji ciśnieniowej, w strumieniu wzbudzonego tlenu, przez nasświetlanie promieniami UV oraz metoda mikrofalowa. Wybór sposobu mineralizacji zależy od rodzaju badanego obiektu i od właściwości przypuszczalnie zawartego w nim związku. Każda metoda mineralizacji powinna być wcześniej sprawdzona ze względu na możliwość strat oznaczanego związku, co ma istotne znaczenie w oznaczeniach ilościowych.

### 4.5.1. Mineralizacja metodą suchą

Polega na spaleniu próbki w piecu muflowym lub specjalnie do tego celu przystosowanej rurze kwarcowej. Dobór właściwej temperatury odbywa się zazwyczaj eksperymentalnie w zależności od oznaczanych pierwiastków i rodzaju próbki. Optymalna temperatura dla mineralizacji metodą suchą dla związków organicznych wynosi 550  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatury poniżej 450  $^{\circ}\text{C}$  mogą nie wystarczyć do pełnego spalenia wielu substancji, z kolei temperatura przekraczająca 650  $^{\circ}\text{C}$  może doprowadzić do ulotnienia się i strat wielu związków. Przy prowadzeniu mineralizacji tą metodą przyczyną błędów mogą być: zanieczyszczenie próbek w czasie spalania w piecu muflowym, straty w wyniku rozpryskiwania próbki zawierającej wodę (eliminacja przez wstępne osuszenie i stopniowe ogrzewanie próbki), straty wywołane rozpyleniem próbki (eliminacja przez przykrywanie tygielka przed wyjęciem z pieca muflowego), straty w wyniku oddziaływania metalu z materiałem tygla, np. adsorpcja metalu na ściankach tygla (eliminacja przez stapianie pozostałości z  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  lub  $\text{KHSO}_4$ ) czy straty pierwiastka w wyniku lotności jego związków. Podczas oznaczania cynku często głównym powodem strat tego pierwiastka jest tworzenie  $\text{SnCl}_2$  lotnego już w temperaturze 400  $^{\circ}\text{C}$ . Na lotność tego pierwiastka mają wpływ także inne substancje zawarte w próbce. Znaczne straty  $\text{Sn}(\text{NO}_3)_2$  zaobserwowano w czasie ogrzewania próbki w obecności chlorków amonu, magnezu, wapnia.

Otrzymaną po mineralizacji próbkę w postaci stałej należy rozpuścić w kwasie, którego dobór zależy od dalszego toku analizy. Czasami podczas prowadzenia mineralizacji suchej stosowany jest dodatek  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , które po-



wodują przeprowadzenie jonów poszczególnych metali w związki mniej lotne lub przyspieszają proces rozkładu. Mogą one przyczynić się do zanieczyszczenia próbki, a tym samym do błędów analizy. Metodę suchą z dodatkiem  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  stosuje do mineralizacji tkanek zwierzęcych. Przyspieszenie i polepszenie procesu suchej mineralizacji uzyskuje się przez rozdrobnienie analizowanego materiału i umieszczenie go w postaci cienkiej warstwy w tyglu lub parownicze. Do zalet tej metody mineralizacji można zaliczyć: możliwość stosowania dużych prób, łatwo dostępne wyposażenie oraz względnie mały nakład pracy.

#### 4.5.2. Mineralizacja metodą mokrą

Mineralizacja metodą mokrą opiera się na utleniających właściwościach kwasów: siarkowego (VI), chlorowego (VII), azotowego (V). Próbkę umieszcza się wraz z substancją utleniającą w tygielkach lub parowniczkach (system otwarty) lub w kolbie z chłodnicą (system zamknięty), następnie ogrzewa się na płycie grzewczej w temperaturze wrzenia kwasu. Jako substancje utleniające używane są również mieszaniny kwasów lub kwasu z dodatkiem utleniacza:  $\text{H}_2\text{O}_2$  lub  $\text{KMnO}_4$ . Dobór środka utleniającego zależy od rodzaju próbki. W mineralizacji mokrej najczęściej stosuje się mieszaniny kwasów:  $\text{HClO}_4$  z  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$  z  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  z  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Możliwa jest także mineralizacja przy użyciu tylko jednego z tych kwasów. Proces rozkładu z użyciem  $\text{H}_2\text{SO}_4$  przebiega powoli, ponieważ usunięcie jego nadmiaru wymaga czasu oraz tworzy on z niektórymi metalami trudno rozpuszczalne osady. Kwas ten posiada wysoką temperaturę wrzenia. Pomimo tych niedogodności stosuje się go przy mineralizacji organicznych związków krzemu. Stosując  $\text{HNO}_3$  należy się liczyć z koniecznością powtórzenia całego procesu mineralizacji z uwagi na niepełne rozłożenie próbki w czasie ogrzewania. Dwustopniowe ogrzewanie próbek z  $\text{HNO}_3$  stosuje się przy mineralizacji surowicy i tkanki wątroby. Powtórne ogrzewanie może być jednak przyczyną błędów oznaczania. W czasie mineralizacji tkanek zwierzęcych stwierdzono w czasie długiego ogrzewania próbki z  $\text{HNO}_3$  straty żelaza, strontu, kobaltu, cynku, manganu.

Kwas chlorowy (VII) wykazuje wysoki potencjał utleniający. Jednak nie jest powszechnie używany ze względu na możliwość wybuchu, a tym samym strat analitu przy odparowaniu substancji do sucha. Duże znaczenie w mineralizacji próbek zdobyła mieszanina  $\text{HNO}_3$  z  $\text{HClO}_4$ . Substancje utleniające mogą być dodawane do próbki jednocześnie lub stopniowo. Najpierw próbka ogrzewana jest z  $\text{HNO}_3$ , a następnie z  $\text{HClO}_4$ . Pierwszy ze sposobów znalazł zastosowanie przy oznaczaniu rtęci w materiale biologicznym oraz przy mineralizacji włosów. Włosy mineralizowane są mieszaniną spektralnie czystych w/w kwasów w stosunku objętościowym

5:2. Proces prowadzi się w temperaturze wrzenia mieszaniny kwasów, oddestylowując wodę i nadmiar kwasu do około 1/3 pierwotnej objętości próbki. Często stosuje się proces dwuetapowy mineralizacji, ponieważ daje lepszy efekt niż mineralizacja jednostopniowa mieszaniną w/w kwasów. W pierwszym etapie próbkę ogrzewa się z  $2 \text{ cm}^3 \text{ HNO}_3$ , a następnie z  $1 \text{ cm}^3 \text{ HClO}_4$ . Dzięki temu w pierwszym etapie są utleniane bardziej reaktywne związki matrycy, zaś pozostałość zawierająca bardzo odporne związki jest rozkładana przez  $\text{HClO}_4$ .

#### 4.5.3. Mineralizacja metodą ciśnieniową

W mineralizacji metodą ciśnieniową czynnikiem wspomagającym rozkład próbki jest wysokie ciśnienie, które powstaje w wyniku ogrzewania szczelnie zamkniętego w korpusie ze stali kwasoodpornej naczynia teflonowego, w którym umieszczona jest próbka wraz z kwasem. Zaletą tej metody jest niska temperatura procesu, duża efektywność rozkładu oraz brak strat spowodowanych lotnością niektórych związków, ponieważ próbka jest szczelnie zamknięta. Możliwe jest oznaczenie pierwiastków lotnych, takich jak: arsen, selen w próbkach biologicznych (włosy, moczu). Szczelne zamknięcie próbki dodatkowo chroni substancje przed zanieczyszczeniami w czasie mineralizacji. Niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki pojawia się wyłącznie w czasie rozhermetyzowania aparatu.

Przy stosowaniu naczyń teflonowych należy pamiętać, że maksymalna temperatura ogrzewania nie może przekroczyć  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  – temperatury topnienia tworzywa. W przypadku niektórych materiałów jest to temperatura zbyt niska, by uległy one rozłożeniu. Czasami teflon jest zastępowany węglem szklistym – materiałem o wysokiej odporności termicznej. Temperatura prowadzonego procesu może wówczas dochodzić do  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . W czasie mineralizacji dojdzie może do adsorpcji oznaczanych substancji na teflonie, bądź ich dyfuzji pod ciśnieniem. Wielkość tych strat zależy do gatunku teflonu, sposobu wykonania naczynia. W celu zmniejszenia tego rodzaju strat stosowane są wkładki kwarcowe.

Odmianą mineralizacji ciśnieniowej jest mineralizacja fazą gazową. Próbka umieszczona w naczyniu teflonowym zawieszona jest w bombie teflonowej na dnie której znajduje się kwas. W czasie ogrzewania kwas ulatnia się, a jego pary mineralizują próbkę. Zaletą tej metody jest zerowa lub bardzo mała wartość ślepej próby, gdyż zanieczyszczenia zawarte w roztworze kwasu nie są lotne w temperaturze, w której paruje kwas. Metodę tę można zastosować do mineralizacji próbek włosów (czas mineralizacji wynosi 3 godziny, temperatura  $130 \text{ }^\circ\text{C}$ , substancja utleniająca: pary  $\text{HNO}_3$ ).

#### 4.5.4. Mineralizacja w atmosferze wzbudzonego tlenu

Podczas przepuszczania tlenu pod niewielkim ciśnieniem przez pole elektryczne o wysokiej częstotliwości następuje jego wzbudzenie. W tej postaci tlen dostarczany jest do rury kwarcowej, gdzie w łódeczce znajduje się mineralizowana próbka, np. krew, włosy, mleko w proszku. Mineralizacji tej mogą być poddane bardzo małe próbki, umieszczone w łódeczce w postaci bardzo cienkiej warstwy. Takie przygotowanie próbki poprawia szybkość mineralizacji, gdyż metoda ta jest stosunkowo powolna z uwagi na niskie ciśnienie tlenu (rozkład 1 g próbki trwa do kilku godzin lub nawet dni). Metoda ta nie jest jednak powszechnie stosowana ze względu na duże koszty.

Wzbudzony tlen powoduje mineralizację związków organicznych. Metoda ta nazywana jest mineralizacją w plazmie niskotemperaturowej, gdyż temperatura mineralizacji wynosi 150-200 °C. Jest to bardzo czysty sposób rozkładu próbek bez stosowania odczynników. Dzięki odizolowaniu próbek od powietrza laboratoryjnego zmniejsza się możliwość kontaminacji. Metodą tą prowadzi się rozkład próbek organicznych, takich jak surowica, włosy. Dzięki tej metodzie możliwe jest oznaczenie w wymienionych próbkach lotnych pierwiastków, takich jak arsen, kadm, antymon. Nieuniknione są jednak straty niektórych substancji, np. bromu, rtęci w przypadku mineralizacji włosów, a złota i srebra w przypadku surowicy krwi. Straty bromu i rtęci są spowodowane ulatnianiem się tych pierwiastków z próbki. Trudno jest jednak wyjaśnić straty srebra i złota, a także w przypadku mineralizacji innych materiałów fosforu i krzemu. Przypuszcza się, że jest to spowodowane efektem unoszenia, w postaci bardzo małych cząstek, ze strefy reakcji.

#### 4.5.5. Mineralizacja przez naświetlanie promieniami UV

Przed wykonaniem mineralizacji przez naświetlanie promieniami UV najpierw należy próbkę przeprowadzić do roztworu, następnie umieścić w tyglach, probówkach lub parowniczkach kwarcowych z kwarcową lub teflonową przykrywką. Naczynko naświetla się lampą rtęciową nisko lub wysokociśnieniową. Do poprawienia efektywności mineralizacji próbki i przyspieszenia zachodzących procesów rozkładu często wprowadza się do próbki substancje utleniające, np.  $H_2O_2$ . Mineralizacja UV znalazła zastosowanie do rozkładu kompleksów metali ciężkich znajdujących się w próbkach wód czy ścieków. Może też być stosowana jako mineralizacja uzupełniająca po mineralizacji suchej lub mokrej.

#### 4.5.6. Mineralizacja mikrofalowa

W ostatnim czasie coraz częściej wykorzystywana jest mineralizacja mikrofalowa. Źródłem energii w tej metodzie są mikrofały – fale elektromagnetyczne o częstotliwości 2450 MHz. Cząsteczki chemiczne obdarzone momentem dipolowym poddane promieniowaniu mikrofalowemu ulegają polaryzacji i zaczynają drgać. Skutkiem poruszania się cząsteczek jest tarcie, a tym samym wzrost energii wewnętrznej próbki. Do całkowitego rozłożenia próbki niezbędna jest reakcja chemiczna z kwasami. Przy konwencjonalnych metodach ogrzewania energia stopniowo przenika w głąb roztworu, a przekazanie energii odbywa się dzięki zderzeniu cząstek. Stosując mikrofały ogrzewanie odbywa się równocześnie w całej objętości próbki. Mikrofały mają tę właściwość, że oddziałują jednocześnie ze wszystkimi dipolami w roztworze. Dzięki absorpcji promieniowania w całym roztworze eliminowana jest faza przewodzenia ciepła, co prowadzi do skrócenia czasu mineralizacji. Silne tarcie wewnętrzne oraz polaryzacja cząsteczek ma na celu mechaniczne poruszenie próbki i poprzez zerwanie jej zewnętrznej warstwy wyeksponowanie warstwy wewnętrznej na działanie kwasu. Mineralizację całkowitą osiąga się w przeciągu kilku minut lub sekund, co jest bardzo korzystne i zdecydowanie wygodniejsze od prowadzenia konwencjonalnych procesów mineralizacji przez kilka godzin czy dni. Mineralizacja mikrofalowa prowadzona jest w specjalnych urządzeniach o dużej mocy. Proces ten może być prowadzony w systemie otwartym pod ciśnieniem atmosferycznym lub pod zwiększonym ciśnieniem w naczyniach zamkniętych. W obu przypadkach posługujemy się takimi samymi reagentami, np.  $HNO_3$ ,  $HClO_4$ ,  $H_2SO_4$ . Często do osiągnięcia pełnej mineralizacji próbek konieczne jest stosowanie mieszaniny kwasów zawierającej kwas fluorowodorowy ( $HNO_3 + HClO_4 + HF$ ).

W przypadku mineralizacji mikrofalowej w systemie otwartym konieczna jest kontrola, aby nie dopuścić do błędnego wyniku analizy spowodowanego systematycznymi błędami kontaminacji lub stratami pierwiastków. Wymagane jest stosowanie zabezpieczeń pieca mikrofalowego przed szkodliwym działaniem par kwasów, które mogą doprowadzić do korozji wyposażenia, a tym samym uszkodzić magnetron – próżniową lampę elektronową – źródło fal elektromagnetycznych w zakresie mikrofały. Problemów tych unika się stosując metodę z użyciem zamkniętych naczyń.

Stosowanie mineralizacji mikrofalowej wiąże się nie tylko ze skróceniem procesu rozkładu, ale również z mniejszym zużyciem reagentów, mniejszą wartością próby odnośnikowej, lepszą dokładnością i precyzją. Metodą tą można mineralizować próbki różnych materiałów, o różnej masie (w systemie otwartym masa próbki może wynosić 5-10 g) przez dobór odpowiednich parametrów, tj.: składu mieszaniny kwasów lub substancji utleniających, mocy i czasu grzania.

## 4.6. Dializa

Niewielka zawartość substancji toksycznych w materiale biologicznym często wymaga przygotowania do analizy zagęszczonych roztworów. Osiąga się to wypłukując substancje toksyczne w procesie dializy. Rozdrobniony materiał biologiczny umieszcza się w błonie półprzepuszczalnej (celofan lub pęcherz zwierzęcy) i zanurza się w naczyniu z wodą destylowaną. Przez błonę przenikają krystaloidy, a wewnątrz błony pozostają koloidy. Proces dializy trwa zależnie od próby, przeciętnie od kilkudziesięciu minut do kilku godzin. Otrzymany dializat poddaje się analizie toksykologicznej na zawartość kationów i anionów substancji rozpuszczalnych w wodzie (patrz rozdział 4.2).

# 5 IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN LOTNYCH

## 5.1. Aceton

### Właściwości fizyko-chemiczne

**Aceton** ( $H_3C-CO-CH_3$ ) – bezbarwna ciecz o charakterystycznym, eterycznym zapachu. Miesza się w każdym stosunku z wodą, alkoholem etylowym, eterem i chloroformem.

### Działanie szkodliwe

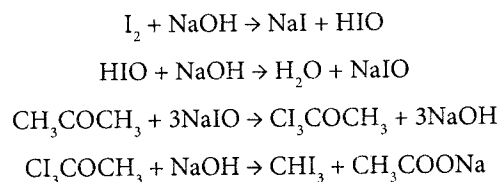
Działa narkotycznie na centralny układ nerwowy. Jest inhibitorem wielu przemian biochemicznych oraz działa silnie drażniąco na błony śluzowe jamy nosowo-gardłowej, powoduje podrażnienie i pieczenie oczu. W wyniku silnego zatrucia acetonem może nastąpić uszkodzenie wątroby i nerek, znieczulenie ogólne, a nawet śmierć na skutek porażenia ośrodka oddechowego. Przewlekłe zatrucia acetonem prowadzą do nieżyty górnych dróg oddechowych, niedokrwistości, osłabienia, zapalenia spojówek. Około 7% acetonu wchłoniętego do organizmu wydala się w postaci niezmienionej, natomiast około 50% utlenia się do  $CO_2$ . Metabolizm acetonu polega na wbudowaniu jego węgla do glikogenu, mocznika, hemu oraz szeregu aminokwasów. Przy dużych dawkach acetonu prawie cała jego ilość jest wydalana w stanie niezmienionym.

### Wartości toksyczne

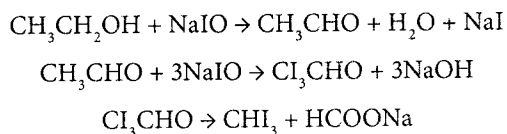
NDS: 600 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 1800 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5800 mg/kg;  
**LD<sub>100</sub> (doustnie, człowiek): 5,34 g/kg.**

### 5.1.1. Reakcja jodoformowa Liebena

Do 0,5 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli jodu w jodku potasu. Następnie kroplami dodawać 10% roztwór NaOH do momentu całkowitego odbarwienia się mieszaniny lub przynajmniej do uzyskania barwy jasnożółtej. W przypadku obecności acetonu wydziela się charakterystyczny zapach jodoformu. Przy większych ilościach acetonu tworzy się jasnożółty osad widoczny pod mikroskopem w postaci kryształów w kształcie sześciobocznych tabliczek i gwiazdek.



Reakcja jest również pozytywna w obecności I-rzędowych alkoholi (z wyjątkiem metanolu), kwasu mlekowego i aldehydu octowego.



### 5.1.2. Reakcja Legala

Do 2 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,5 cm<sup>3</sup> świeżo przygotowanego 3% roztworu nitroprusydku sodu, następnie zalkalizować 10% roztworem NaOH. W obecności acetonu powstaje czerwone zabarwienie, które po dodaniu nadmiaru kwasu octowego przechodzi w karminowoczerwone, a po ogrzaniu w fioletowe.

Reakcja ta nie jest specyficzna dla acetonu. Aldehyd octowy i *p*-krezol dają także czerwoną barwę, która jednak po dodaniu kwasu octowego blednie, a po ogrzaniu przechodzi w zieloną.

## 5.2. Aldehyd mrówkowy



Synonim: **metanal, formaldehyd (HCHO)** – bezbarwny gaz o ostrym przenikliwym zapachu. Jest łatwo rozpuszczalny w wodzie, etanolu i węglowodorach. **40% wodny roztwór aldehydu mrówkowego to formalina**, która dzięki zdolnościom ścinania białka służy jako środek dezynfekujący oraz powszechnie jest wykorzystywana do konserwacji preparatów anatomicznych.



Jest substancją silnie drażniącą błony śluzowe, spojówki oczu oraz wywołującą duszność, kaszel, bezsenność i ból głowy. W ciężkich zatruciach parami formaldehydu może dojść do obrzęku płuc i niewydolności oddechowej, ataków astmy i chronicznego zapalenia oskrzeli. Prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi.



NDS: 0,5 mg/m<sup>3</sup>; NDSch: 1 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 100 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 203 mg/m<sup>3</sup>;  
LD<sub>50</sub> (naskórnice, królik): 270 mg/kg; LC<sub>50</sub> (96 godzin, naskórnice, pstrąg tęczowy): 440 mg/dm<sup>3</sup>; LC<sub>50</sub> (inhalacja, myszy): 0,48 mg/dm<sup>3</sup> przez 4 godziny.

### 5.2.1. Reakcja z kwasem chromotropowym

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,2 cm<sup>3</sup> 1% roztworu kwasu chromotropowego (kwas 4,5-dihydroksy naftaleno-2,7-disulfonowy). Wstrząsnąć i dodać 5 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po wymieszaniu w obecności aldehydu mrówkowego tworzy się czerwono-fioletowe zabarwienie mieszaniny.

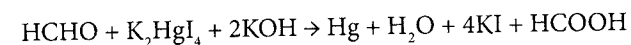
### 5.2.2. Reakcja z tiokolem

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) wlać delikatnie po ściankach probówki roztwór tiokolu w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na granicy zetknięcia się płynów pojawia się fioletowoczerwony pierścień świadczący o obecności aldehydu mrówkowego.

### 5.2.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera

Do kilku kropli frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2-3 krople odczynnika Nesslera. Dokładnie wymieszać. W przypadku obecności aldehydu mrówkowego pojawia się żółte zabarwienie, które z czasem ciemnieje i w końcu wytrąca się szary osad rtęci.

Aldehyd mrówkowy utleniony pod wpływem odczynnika Nesslera do kwasu mrówkowego redukuje HgI<sub>4</sub><sup>2-</sup> do HgO, a następnie do metalicznej Hg zgodnie z reakcją:



**ODCZYNNIK NESSLERA:** 6g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> ciepłej wody i dodać 50 cm<sup>3</sup> 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm<sup>3</sup>, dodać 60 cm<sup>3</sup> 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslera.**

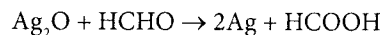
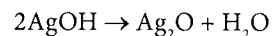
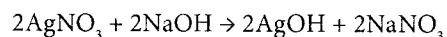
### 5.2.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm<sup>3</sup> 25% roztworu HCl i 2-3 cm<sup>3</sup> odczynnika Schiffa. Wymieszać. W przypadku występowania aldehydu mrówkowego w destylacie pojawia się zabarwienie od różowego do czerwono-fioletowego.

**ODCZYNNIK SCHIFFA:** 1 g krystalicznej fuksyny rozpuścić w 300 cm<sup>3</sup> gorącej wody, a po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodać 12,5 g NaHSO<sub>3</sub> rozpuszczonego w 300 cm<sup>3</sup> wody, a następnie 10 cm<sup>3</sup> 1M HCl. Całość rozcieńczyć wodą do 1000 cm<sup>3</sup>. Po kilku godzinach całkowicie bezbarwny odczynnik gotowy jest do użycia. **Można zakupić gotowy odczynnik Schiffa.**

### 5.2.5. Reakcja z azotanem (V) srebra i wodorotlenkiem sodu

Do kilku kropli 10% AgNO<sub>3</sub> dodać kilka kropli 10% NaOH. Powstały osad rozpuścić w 25% roztworze amoniaku. Następnie dodać 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) i podgrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności aldehydu mrówkowego na ściankach probówki tworzy się lustro srebrne lub czarny osad. W przypadku małych ilości aldehydu mrówkowego w destylacie tworzy się tylko czarne zmętnienie. W reakcji tej wykorzystuje się właściwości redukujące aldehydu mrówkowego.



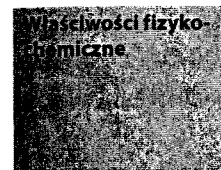
### 5.2.6. Reakcja Shryvera

1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać do uprzednio przygotowanej mieszaniny składającej się z 2 cm<sup>3</sup> 0,5% roztworu chlorowodoru fenylhydrazyny, 1 cm<sup>3</sup> 5% heksacyjanożelazianu (III) potasu i 5 cm<sup>3</sup> stężonego HCl. Powstałe różowe zabarwienie świadczy o obecności aldehydu mrówkowego w destylacie.

### 5.2.7. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i morfiną

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać ostrożnie 4 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Delikatnie wymieszać przy jednoczesnym starannym chłodzeniu. Po ostudzeniu po ściance probówki wlewać 0,2 cm<sup>3</sup> roztworu morfiny w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,2 g morfiny w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). W miejscu zetknięcia się obu płynów zaobserwować powstawanie fioletowego pierścienia, który przy dużych ilościach aldehydu mrówkowego tworzy się natychmiast, a przy małych dopiero po 20 minutach. Zabarwienie powstające po 30 minutach jest nieswoiste i nie należy interpretować jako wynik dodatni reakcji.

## 5.3. Aldehyd trichlorooctowy



Synonim: **chloral bezwodny (CCl<sub>3</sub>CHO)** – bezbarwna, oleista ciecz o przenikliwym zapachu. Pod wpływem zasad rozkłada się na chloroform i mrówczan. Aldehyd trichlorooctowy jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, glicerynie, etanolu, chloroformie, natomiast słabo w benzenie i disiarczku węgla. W organizmie ulega przemianom do trichloroetanolu, a następnie jest utleniany z utworzeniem kwasu trichlorooctowego.



Szybko wchłania się w przewodzie pokarmowym wywołując sen. Objawy zatrucia to: głęboka narkoza, upośledzenie ośrodkowego mięśnia sercowego, zaburzenia żołądkowe i skórne. Śmierć następuje na skutek porażenia ośrodkowego i czynności serca.



NDS: nieustalone.

**Dawka śmiertelna dla człowieka wynosi 8-15 g.**

### 5.3.1. Reakcja izonitrylowa

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę nasyconego roztworu aniliny oraz 2-3 krople 10% roztworu NaOH. Ogrzewać aż do momentu powstania zmętnienia. W obecności aldehydu trichlorooctowego wystąpi charakterystyczny ostry, nieprzyjemny zapach izonitrylu.

### 5.3.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kryształków rezorcyny i kilka kropli 10% roztworu NaOH. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Pojawienie się różowego zabarwienia świadczy o obecności aldehydu trichlorooctowego. Zabarwienie to może również wystąpić w obecności tetrachloru węgla lub aldehydu mrówkowego.

### 5.3.3. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II)

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać w nadmiarze 10% roztwór NaOH, a następnie po kropli 5% roztwór CuSO<sub>4</sub>, do momentu pojawienia się zmętnienia. W przypadku obecności aldehydu trichlorooctowego nadmiar wodorotlenku miedzi (II) ulega odwodnieniu i tworzy się czerwony osad tlenku miedzi (I).

### 5.3.4. Reakcja z odczynnikiem Nesslera

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> odczynnika Nesslera i wymieszać. Pojawienie się ceglastoczerwonego osadu przechodzącego w brunatnozielony świadczy o obecności aldehydu trichlorooctowego.

**ODCZYNNIK NESSLERA:** 6 g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> ciepłej wody i dodać 50 cm<sup>3</sup> 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm<sup>3</sup>, dodać 60 cm<sup>3</sup> 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslera.**

## 5.4. Alkohol etylowy

### Właściwości fizykochemiczne

**Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)** – bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu i palącym smaku. Pali się bladoniebieskim płomieniem. Dobrze miesza się z wodą, eterem, gliceryną i większością rozpuszczalników organicznych.

### Działanie szkodliwe

Etanol posiada działanie depresyjne, narkotyczne i hepatotoksyczne (marskość wątroby). Uszkadza strukturę i czynność komórek nerwowych centralnego układu nerwowego, prowadząc do ich niedotlenienia. Podczas przemian etanolu w organizmie dochodzi do nagromadzenia zredukowanych nukleotydów (NADH, NADPH) i jonów wodoru co jest przyczyną silnego deficytu tlenowego w komórkach. Szczególnie niebezpieczne są metabolity alkoholu etylowego: aldehyd octowy jest związkiem denaturującym białka i enzymy, natomiast kwas octowy prowadzi do kwasicy. Ciężkie zatrucia etanolem charakteryzują się upośledzeniem widzenia, utratą przytomności, hipoglikemią z hipotermią, zaburzeniami koordynacji mięśniowej. Około 90% wchłoniętej dawki etanolu utlenia się poprzez aldehyd octowy do CO<sub>2</sub> i wody.

**Stężenie fizjologiczne etanolu we krwi wynosi poniżej 0,01% (0,1 g/dm<sup>3</sup> lub 0,1‰), a po spożyciu lub ekspozycji na pary wzrasta. W wyniku spożycia ponad 5 g/dm<sup>3</sup> etanolu następuje śpiączka, a nawet – śmierć.**

### Wartości toksyczne

NDS: 1900 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 7060 mg/kg.

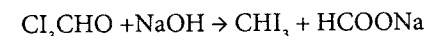
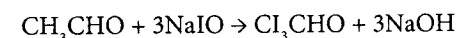
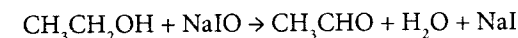
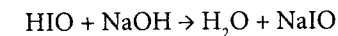
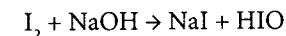
Etanol najczęściej oznacza się we krwi oraz w wydychanym powietrzu. Większość reakcji mających na celu wykrycie etanolu w materiale biologicznym polega na utlenianiu go za pomocą nadmanganianu (VII) potasu lub dichromianu (VI) potasu.

### 5.4.1. Reakcja jodoformowa Liebena

Do części frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli roztworu jodu lub odrobinę sproszkowanego jodu. Następnie dodać kroplami 10% roztwór NaOH do odbarwienia roztworu lub przynajmniej jasnożółtego zabarwienia. Płyn ogrzewać w łaźni wodnej o temperaturze ≤60 °C. W przypadku małych obec-

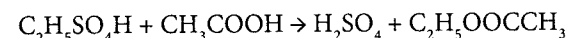
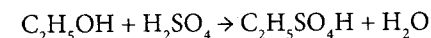
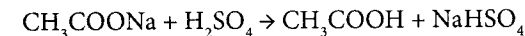
ności etanolu wydziela się charakterystyczny zapach jodoformu, a przy większych – jasnożółty, krystaliczny osad.

Reakcja ta jest bardzo czuła, jednak na zimno zachodzi również w obecności acetonu i aldehydu octowego. Wynik ujemny tej reakcji wyklucza obecność etanolu w badanym materiale.



### 5.4.2. Reakcja estryfikacji

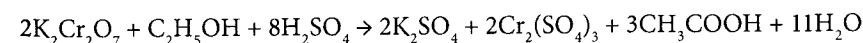
Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kilka kryształków octanu sodu i następnie ogrzewać. W obecności alkoholu etylowego tworzy się charakterystyczny octowy zapach estru etylowego kwasu octowego (octanu etylu), wyczuwalny również po oziębieniu lub po wylaniu go na zimną wodę.



### 5.4.3. Reakcja z dichromianem (VI) potasu

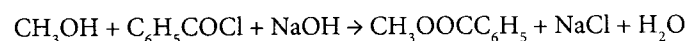
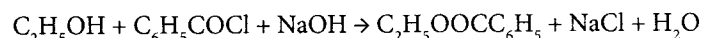
1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ogrzewać z 1 cm<sup>3</sup> 10% roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Następnie dodać 1-2 krople 0,05 M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. W wyniku obecności etanolu początkowe żółte zabarwienie roztworu zmienia się na zielone. Pojawia się zapach aldehydu octowego.

Związki chromu Cr<sup>6+</sup> utleniają etanol do aldehydu octowego, a następnie do kwasu octowego, jednocześnie same redukują się do Cr<sup>3+</sup>. Reakcja ta nie jest specyficzna dla etanolu, daje ją wiele substancji organicznych, które same łatwo utleniają się i jednocześnie redukują kwas chromowy (VI).



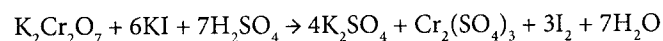
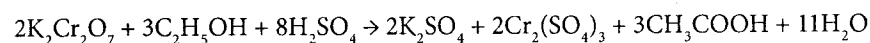
#### 5.4.4. Reakcja z chlorkiem benzoilu

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli wodnego roztworu chlorku benzoilu (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COCl). Wymieszać. Następnie kroplami dodawać 10% roztwór NaOH i wstrząsać do momentu zniknięcia duszącego zapachu chlorku benzoilu. W obecności etanolu w destylacie powstaje charakterystyczny zapach estru etylowego kwasu benzooesowego. Zbliżony zapach wykazuje także ester utworzony przez metanol z chlorkiem benzoilu.



#### 5.4.5. Oznaczanie etanolu we krwi metodą Widmarka

W wyniku reakcji dichromianu (VI) potasu z parami etanolu zachodzi utlenianie alkoholu do kwasu octowego i redukcja chromu Cr<sup>6+</sup> do Cr<sup>3+</sup>. Nadmiar dichromianu należy oznaczyć jodometrycznie.



##### ODCZYNNIKI:

1. roztwór dichromianu (VI) potasu: 0,25 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> rozpuścić w 1 cm<sup>3</sup> wody i dopełnić w kolbie miarowej do pojemności 100 cm<sup>3</sup> stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztwór przygotować wcześniej, co najmniej dwa dni przed użyciem,
2. 0,1 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> rozpuścić w 1 cm<sup>3</sup> wody i dopełnić w kolbie miarowej do pojemności 100 cm<sup>3</sup> stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (używa się przy mniejszej zawartości alkoholu etylowego we krwi),
3. roztwór tiosiarczuanu sodu: 0,25 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O rozpuścić w kolbie miarowej na 1 litr, dodać 0,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i dopełnić wodą do kreski. Oznaczyć miano roztworu na dichromian (VI) potasu i rozcieńczyć przed użyciem,
4. 5% roztwór KI. Przechowywać w ciemnej butelce z kroplą rtęci,
5. 1% roztwór skrobi, konserwowany kilkoma mg jodku rtęci (II).

Do suchej kolbki Widmarka (patrz rozdział 4.3) wprowadzić 1 cm<sup>3</sup> roztworu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, a na łyżeczkę naczynka odmierzyć 0,1-0,15 cm<sup>3</sup> krwi i zważyć. W celu uszczelnienia naczynka szlif zwilżyć stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i natychmiast zamknąć, zabezpieczając sprężynkami lub gumkami. Przygotowaną próbę inkubować w cieplarni w temperaturze 60 °C przez 2 godziny. Po tym czasie otworzyć naczynko i zawartość kolbki uzupełnić wodą destylowaną do objętości 25 cm<sup>3</sup>. Następnie

dodać 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu KI i natychmiast miareczkować 0,01 M roztworem tiosiarczuanu sodu wobec roztworu skrobi jako wskaźnika. Podobnie, ale bez krwi wykonać 3-krotnie próbę kontrolną dla ustalenia ilości zużytego tiosiarczuanu.

Stężenie etanolu w próbce (x) w mg% (tzn. mg/100 g) obliczyć ze wzoru:

$$x = \frac{0,113 \cdot (b - a) \cdot 100000}{m}$$

gdzie:

- b – średnia ilość (cm<sup>3</sup>) zużytego tiosiarczuanu sodu potrzebna do miareczkowania próby kontrolnej,
- a – średnia ilość (cm<sup>3</sup>) zużytego tiosiarczuanu sodu potrzebna do miareczkowania próby badanej,
- m – naważka krwi (mg).

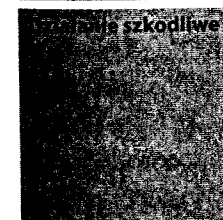
Uwagi:

1. Zużycie podczas miareczkowania 1 cm<sup>3</sup> 0,01 M tiosiarczuanu sodu odpowiada 0,113 mg alkoholu etylowego we krwi.
2. Metoda ta nie jest specyficzna dla etanolu, ponieważ lotne substancje występujące we krwi mogą redukować dichromian (VI) potasu, co fałszuje wynik analizy.

## 5.5. Alkohol metylowy



**Metanol (CH<sub>3</sub>OH)** – bezbarwna, łatwo lotna ciecz o charakterystycznym zapachu podobnym do etanolu. Pali się niebieskim płomieniem. Miesza się z wodą w każdym stosunku oraz dobrze rozpuszcza się w estrach, ketonach, chlorowcopochodnych węglowodorach, a trudno w tłuszczach.



Działanie toksyczne metanolu związane jest z jego metabolitami: aldehydem mrówkowym (powoduje zmiany zwyrodnieniowe komórek wątroby, nerek i serca) i kwasem mrówkowym (prowadzi do ciężkiej kwasicy metabolicznej i charakterystycznego uszkodzenia oczu, głównie siatkówki, nabłonka rogówki oraz nerwu wzrokowego – może to być przyczyną utraty wzroku). Ciężkie zatrucia metanolem prowadzą do sinicy, spadku ciśnienia krwi, niewydolności oddechowej, śpiączki i śmierci. Zgon występuje u około 25% osób ciężko zatrutych metanolem.



NDS: 100 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 300 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5628 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 64000 ppm/4 h;  
LD<sub>100</sub> (doustnie, człowiek): 100 cm<sup>3</sup>.

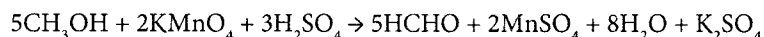
### 5.5.1. Reakcja estryfikacji

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 4 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i odrobinę sproszkowanego kwasu salicylowego. Następnie ostrożnie pod-

grzewać do temperatury 60 °C. Pojawienie się charakterystycznego zapachu estru metylowego kwasu salicylowego świadczy o obecności metanolu w destylacie. Alkohol etylowy również daje ester etylowy kwasu salicylowego, jednak o zapachu mniej intensywnym. Wobec tego należy wcześniej wykluczyć obecność etanolu.

### 5.5.2. Reakcja utleniania metanolu do aldehydu mrówkowego

Metanol reagując z nadmanganianem (VII) potasu w środowisku kwaśnym utlenia się do aldehydu mrówkowego:



Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> rozcieńczonego wodą w stosunku 11:1 oraz 2 krople 5% roztworu KMnO<sub>4</sub>. Wymieszać. Po 5 minutach nadmiar KMnO<sub>4</sub> zredukować dodając 2 krople nasyconego roztworu siarczanu (IV) sodu. Otrzymany w ten sposób roztwór aldehydu mrówkowego podzielić na dwie części, z którymi należy wykonać następujące reakcje:

#### a) z kwasem chromotropowym

Do części utlenionego roztworu dodać 0,2 cm<sup>3</sup> 1% roztworu kwasu chromotropowego (kwas 4,5-dihydroksy naftaleno-2,7-disulfonowy). Wstrząsnąć i dodać 5 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po wymieszaniu w obecności metanolu tworzy się czerwonofioletowe zabarwienie mieszaniny.

#### b) z tiokolem

Do części utlenionego roztworu dodać delikatnie po ściance probówki roztwór tiokolu w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Na granicy zetknięcia się płynów pojawia się fioletowoczerwony pierścień świadczący o obecności aldehydu mrówkowego.

### 5.5.3. Reakcja Denigesa

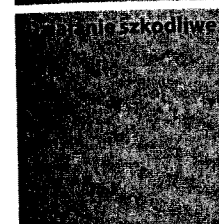
Do 2 cm<sup>3</sup> zagęszczonej frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 krople 5% roztworu KMnO<sub>4</sub> i 0,2 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po dokładnym wymieszaniu próbę odstawić na 3 minuty. Następnie dodawać kroplami nasycony roztwór kwasu szczawiowego w 60% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do chwili zabarwienia się na kolor jasnożółty. Wówczas dodać 1 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wymieszać i dodać 5 cm<sup>3</sup> odczynnika Schiffa. W obecności metanolu powstaje fioletowe zabarwienie.

**ODCZYNNIK SCHIFFA:** 1 g krystalicznej fuksyny rozpuścić w 300 cm<sup>3</sup> gorącej wody, a po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodać 12,5 g NaHSO<sub>3</sub> rozpuszczonego w 300 cm<sup>3</sup> wody, a następnie 10 cm<sup>3</sup> 1M HCl. Całość rozcieńczyć wodą do 1000 cm<sup>3</sup>. Po kilku godzinach całkowicie bezbarwny odczynnik gotowy jest do użycia. **Można zakupić gotowy odczynnik Schiffa.**

## 5.6. Anilina



**Anilina (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>)** – oleista, bezbarwna ciecz o nieprzyjemnym, słabym zapachu. Słabo rozpuszcza się w wodzie, natomiast dobrze w etanolu, acetonie, disiarczku węgla i olejach. Barwa brunatna technicznej aniliny wskazuje na obecność zanieczyszczeń w produkcie.



Działanie toksyczne aniliny polega na powstaniu mało wartościowej metemoglobinie co prowadzi do ograniczenia transportu tlenu i niedotlenienia komórek, tkanek, narządów organizmu (głównie mięśnia sercowego, mózgu, nerek) oraz zaburzenia w krążeniu. Jest inhibitorem utleniających układów enzymatycznych na poziomie komórkowym, np. cytochromu P-450. Następstwem ostrego zatrucia aniliną jest żółtaczka, niedokrwistość, dolegliwości sercowe, obniżenie ciśnienia krwi, zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym, osłabienie i utrata przytomności, czasami zgon.



NDS: 5 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 20 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 250 mg/kg.

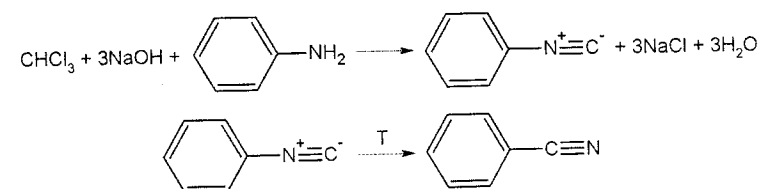
Metody identyfikacji aniliny w badanym materiale opierają się na reakcji utleniania jej do *p*-aminofenolu lub dwuazowania i sprzęgnięcia z odpowiednimi komponentami.

### 5.6.1. Reakcja dwuazowania i sprzęgnięcia z solą R

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm<sup>3</sup> roztworu do dwuazowania (jest to 2 M roztwór HCl i 3,5% roztwór NaNO<sub>2</sub> zmieszany bezpośrednio przed użyciem w stosunku 1:2). Próbę dokładnie wymieszać i oziębić w lodzie do temperatury 0 °C. Następnie należy zubożyć nasyconym roztworem NaHCO<sub>3</sub> do pH=6-8 i dodać 2 krople roztworu soli R (sól sodowa kwasu 2-hydroksy-3,6-naftalenodisulfonowego). Pojawienie się pomarańczowej barwy świadczy o obecności aniliny w destylacie.

### 5.6.2. Reakcja izonitrylowa

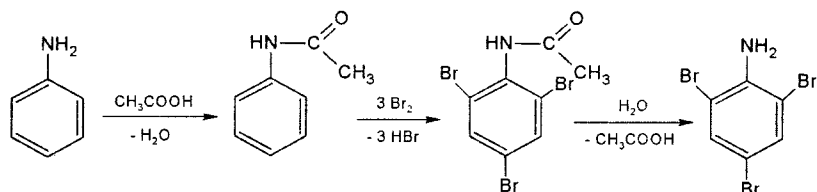
Do 0,5 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 krople chloroformu oraz 2-3 krople 10% NaOH. Mieszaninę ogrzewać do wrzenia. W obecności aniliny można wyczuć nieprzyjemny zapach izonitrylu. Reakcja ta jest charakterystyczna dla amin I-rzędowych.





### 5.6.3. Reakcja bromowania

Do 0,5 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli CH<sub>3</sub>COOH i 0,5 cm<sup>3</sup> wody bromowej i wymieszać. W przypadku obecności aniliny pojawia się osad tribromoaniliny o barwie cielistej. Reakcja ta może być wykorzystana do oznaczeń ilościowych.

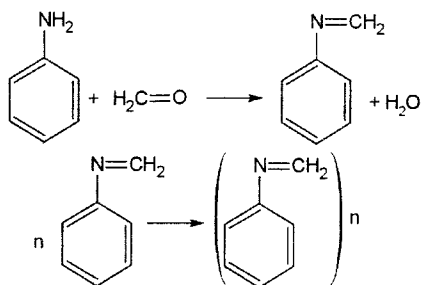


### 5.6.4. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i dichromianem (VI) potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> 10% roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i parę kropli 0,05 M roztworu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Powstaje zielony osad, który następnie przybiera barwę niebieską, a ostatecznie czarną. W ten sposób tworzy się nierozpuszczalny barwnik, zwany czernią anilinową.

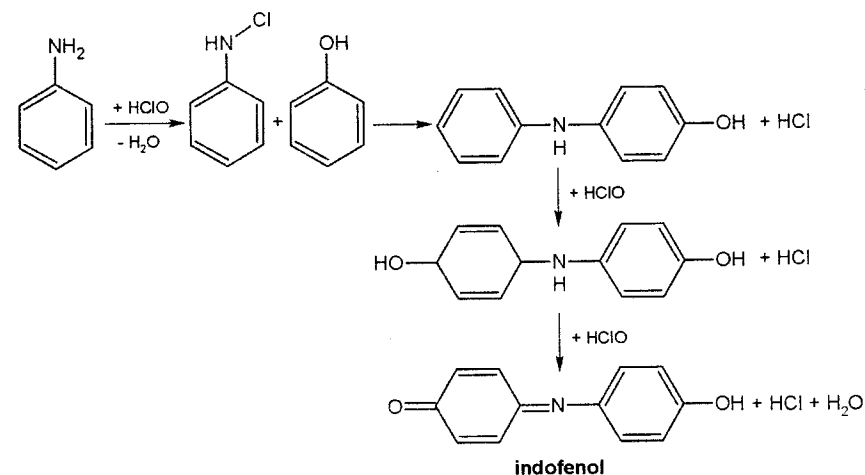
### 5.6.5. Reakcja z aldehydem mrówkowym

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> aldehydu mrówkowego. W przypadku obecności aniliny w badanym materiale tworzy się zmętnienie lub biały osad. Jest to produkt kondensacji aniliny z aldehydem mrówkowym przebiegający zgodnie z reakcją chemiczną:



### 5.6.6. Próba indofenolowa

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać parę kropli świeżo przygotowanej wody chlorowej. Na skutek reakcji powstaje zabarwienie fioletowo-niebieskie do purpurowofioletowego. Następnie dodać nasycony roztwór fenolu, a na końcu ostrożnie nawarstwić po ściankach probówki stężonym amoniakiem. W obecności aniliny tworzy się niebieska, dosyć trwała barwa. Czułość tej metody wynosi 1 μg aniliny w badanym materiale.



### 5.6.7. Oznaczanie zawartości *p*-aminofenolu (metabolit aniliny) w moczu

W organizmie ludzkim anilina jest utleniana do *p*-aminofenolu. Proces ten zachodzi w kilku etapach, a przejściowymi metabolitami są fenylohydroksylamina oraz *p*-iminochinon, który tworzy z *p*-aminofenolem układ red-oks, odpowiedzialny za przejście hemoglobiny w methemoglobinę. Zwiększona zawartość methemoglobiny powoduje sinicę, hemolizę (wysypka, obrzęk) i inne objawy zaburzenia utleniania komórkowego, np. niedotlenienie. W następnej fazie przemian *p*-aminofenol ulega sprzęganiu z H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lub kwasem glukuronowym i jest stosunkowo szybko wydalany z ustroju wraz z moczem. Niezmieniona anilina jest usuwana w ilości poniżej 1% wchłoniętej dawki.

Mocz należy ogrzewać ze stężonym HCl we wrzącej łaźni wodnej. W czasie ogrzewania zachodzi hydroliza związanego *p*-aminofenolu. Wolny *p*-aminofenol oznacza się kolorymetrycznie reakcją indofenolową po sprzęgnięciu z fenolem w środowisku amoniakalnym. Powstające niebieskie zabarwienie roztworu jest proporcjonalne do ilości *p*-aminofenolu w próbce.

**ODCZYNNIKI:**

1. stężony HCl cz.d.a.,
2. 5% wodny roztwór fenolu,
3. stężony roztwór amoniaku cz.d.a.,
4. roztwór wzorcowy *p*-aminofenolu (100 mg *p*-aminofenolu cz.d.a. rozpuścić w 3 cm<sup>3</sup> stężonego HCl, po czym uzupełnić w kolbie miarowej wodą destylowaną do 100 cm<sup>3</sup>),
5. mocz zebrany po 3-4 godzinie od rozpoczęcia ekspozycji na anilinę lub po przyjęciu leku – fenacetyny.

Oznaczenie *p*-aminofenolu w badanym moczu należy rozpocząć od pomiaru objętości i ciężaru właściwego moczu. Następnie odmierzyć do probówki 10 cm<sup>3</sup> moczu. Dodać 5 cm<sup>3</sup> stężonego HCl i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 1,5 godziny. Po ostudzeniu roztwór przesączyć do kolby miarowej o pojemności 100 cm<sup>3</sup> i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Po wymieszaniu pobrać objętość roztworu (V) określoną według wzoru:

$$V = 2 \cdot \frac{24}{n} \text{ (cm}^3\text{)}$$

gdzie:

n – oznacza tysięczne części ciężaru właściwego badanego moczu.

Następnie roztwór uzupełnić wodą w probówce do 7 cm<sup>3</sup>. Dodać 1 cm<sup>3</sup> 5% roztworu fenolu i 2 cm<sup>3</sup> stężonego amoniaku. Dokładnie wymieszać i odstawić próbę na 30 minut do wytworzenia i utrwalenia się barwy. Po tym okresie odczytać absorbancję przy długości fali  $\lambda = 620$  nm wobec próby ślepej, którą jest woda destylowana.

Przygotowane próby do wykonania krzywej wzorcowej (Tabela 5.1) należy poddać hydrolizie. Dalszy sposób postępowania jak w przypadku oznaczania *p*-aminofenolu w próbce badanej. Odczytać absorbancję dla prób wzorcowych i na podstawie uzyskanych wyników sporządzić wykres zależności wartości absorbancji od ilości *p*-aminofenolu w końcowym roztworze barwnym.

Tabela 5.1. Objętości badanego moczu, roztworu wzorcowego i odczynników niezbędne do wykonania krzywej wzorcowej.

Roztwory	Objętości roztworów (cm <sup>3</sup> )							
	0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,5
wzorzec	0	10	10	10	10	10	10	10
mocz	10	10	10	10	10	10	10	10
stężony HCl	5	5	5	5	5	5	5	5
1 cm <sup>3</sup> hydrolizatu zawiera <i>p</i> -aminofenol (μg)	0	1	2	3	5	7	10	15

Zawartość *p*-aminofenolu w próbce badanej odczytać z wykresu wzorcowego, po czym obliczyć stężenie *p*-aminofenolu w badanym moczu uwzględniając, że 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczonego hydrolizatu pobranego z kolbki miarowej odpowiada 0,1 cm<sup>3</sup> pierwotnego moczu. Zgodnie z podanym wyżej sposobem postępowania stężenie (x) *p*-aminofenolu w badanym moczu wynosi:

$$x = \frac{10 \cdot C}{V} \text{ (mg/godz.)}$$

gdzie:

C – ilość *p*-aminofenolu w końcowej barwnej próbce (μg),  
V – objętość hydrolizatu pobranego do oznaczenia (cm<sup>3</sup>).

Oznaczone stężenie *p*-aminofenolu w moczu można przeliczyć na szybkość wydalania (W) *p*-aminofenolu w mg/godzinę według następującego wzoru:

$$W = \frac{a \cdot b}{2 \text{ godz.}} \text{ (mg/godz.)}$$

gdzie:

a – stężenie *p*-aminofenolu w moczu (μg/cm<sup>3</sup>),  
b – objętość próbki w moczu (cm<sup>3</sup>).

Test oparty na oznaczaniu *p*-aminofenolu nie jest specyficzny, ponieważ niektóre związki, np. fenacetyna, dimetyloanilina, nitrobenzen, po dostaniu się do organizmu są metabolizowane do *p*-aminofenolu. Należy jednak zwrócić uwagę, że *p*-aminofenol może występować normalnie w ustroju (3,2-3,7 μg/cm<sup>3</sup> moczu). Niskie ilości nie przeszkadzają w interpretacji wyniku, ponieważ czułość metody wynosi 10 μg/cm<sup>3</sup> moczu. Wyniki dodatnie można również uzyskać, w przypadku gdyby badana osoba zażywała tabletki od bólu głowy, ponieważ ich składnik – fenacetyna metabolizuje się do *p*-aminofenolu.

## 5.7. Benzen

### Właściwości fizykochemiczne

**Benzen** (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) – bezbarwna, przezroczysta ciecz o charakterystycznym zapachu. Dobrze rozpuszcza się w etanolu, chloroformie, eterze, disiarczku węgla i acetonie.

### Działanie szkodliwe

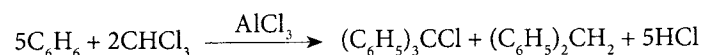
Benzen wykazuje silne powinowactwo do związków lipidowych w organizmie. Łączy się z otoczką sfigomielinową układu nerwowego, co powoduje jej uszkodzenie i zmiany przewodnictwa. W szpiku kostnym benzen uszkadza młode, proliferujące komórki krwinek czerwonych i białych, co w konsekwencji prowadzi do niedokrwistości aplastycznej lub białaczki. Posiada działanie rakotwórcze, ponieważ w organizmie ssaków tworzy duże ilości związków epoksydowych i wolnych rodników oraz łatwo łączy się związaniami kowalencyjnymi z DNA i RNA. Benzen i jego metabolity są inhibitorami enzymów komórkowych biorących udział w replikacji. Zatrucia benzenem objawiają się zaburzeniami w widzeniu, osłabieniem, bólami i zawrotami głowy, niewydolnością oddechową, zaburzeniami rytmu serca, utratą przytomności, porażeniem i śpiączką. Posiada działanie narkotyczne. Długotrwałe zatrucie benzenem prowadzi do niedokrwistości, zmian w tkance mózgowej, zwyrodnienia mięśnia sercowego, wątroby i nadnerczy oraz zmian nowotworowych wątroby i płuc.

### Wartości toksyczne

NDS: 1,6 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 930 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 10000 ppm/7h.

### 5.7.1. Reakcja Friedela–Craftsa

W probówce umieścić 2 cm<sup>3</sup> chloroformu i dodać 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1). Dokładnie wymieszać i wsypać kilka kryształków AlCl<sub>3</sub> jako katalizatora. Zabarwienie roztworu od żółtego do brązowego wskazuje na obecność benzenu w badanym materiale.



### 5.7.2. Reakcja nitrowania

2-3 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ekstrahować z 2 cm<sup>3</sup> chloroformu. Następnie do warstwy chloroformowej dodać 2 cm<sup>3</sup> mieszaniny nitrującej (10% roztwór NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Silnie wstrząsać przez 2 minuty. Podczas reakcji nitrowania można wyczuć zapach gorzkich migdałów. Mieszaninę ochłodzić i przelać do drugiej probówki zawierającej 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Zobojętnić stężonym amoniakiem i po wytrząśnięciu oddzielić warstwę chloroformową. Suchą pozostałość uzyskaną po odparowaniu chloroformu rozpuścić w metylo-etyloketonie i następnie dodać 1 cm<sup>3</sup> 70% roztworu KOH. Powstanie fioletowego zabarwienia w warstwie metylo-etyloketonu świadczy o obecności benzenu.

## 5.7. BENZEN

### 5.7.3. Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,5 cm<sup>3</sup> odczynnika Marquisa. Delikatnie ogrzewać w łaźni wodnej przez 2-3 minuty. Po tym czasie zaobserwować powstanie czerwonego zabarwienia, wskazującego na obecność benzenu w destylacie. Czułość metody wynosi 2 μg.

**ODCZYNNIK MARQUISA:** 0,2 cm<sup>3</sup> 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 5.7.4. Oznaczanie zawartości fenolu (metabolit benzenu) w moczu

Benzen w organizmie człowieka jest metabolizowany poprzez formę epoksydową do fenolu i wydalany z moczem w postaci sprzężonej z H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lub kwasem glukuronowym (30-80%).

Próbkę moczu po zakwaszeniu destyluje się z parą wodną (patrz rozdział 4.2). Fenol w otrzymanym destylacie oznacza się kolorymetrycznie z 2,6-dibromochinonochlorimidem.

#### ODCZYNNIKI:

1. stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cz.d.a.,
2. roztwór buforowy o pH=10,15 (10,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·10H<sub>2</sub>O i 2,8 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> rozpuścić w 500 cm<sup>3</sup> wody destylowanej),
3. alkoholowy roztwór 2,6-dibromochinonochlorimidu (15 mg związku rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> etanolu).

Do 10 cm<sup>3</sup> badanego moczu dodać 1 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i destylować z parą wodną z szybkością 10 cm<sup>3</sup>/min. Zebrać 50 cm<sup>3</sup> destylatu. Następnie pobrać 10 cm<sup>3</sup> destylatu do kolbki miarowej o pojemności 25 cm<sup>3</sup>, dodać 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu buforowego o pH=10,15 oraz 0,25 cm<sup>3</sup> alkoholowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości 25 cm<sup>3</sup>. Po godzinie zmierzyć absorbancję barwnego roztworu przy długości fali wynoszącej λ=610 nm.

**Wykres wzorcowy:** do 10 cm<sup>3</sup> próbek moczu fizjologicznego dodać wzrastające ilości roztworu wzorcowego fenolu od 0 do 5 cm<sup>3</sup>. Dalsza procedura postępowania destylacji i oznaczania zawartości fenolu jak opisano wyżej. Sporządzić wykres wzorcowy. Zawartość fenolu w próbce badanej odczytać z wykresu wzorcowego. Wchłoniętą dawkę benzenu można wyliczyć uwzględniając jeden z przedstawionych w tabeli 5.2 wariantów ekspozycji.

Należy zwrócić uwagę, że średnie fizjologiczne stężenie fenolu w moczu wynosi około 7±3 μg/cm<sup>3</sup>. Stężenie fenolu powyżej 15 μg/cm<sup>3</sup> wskazuje na zwiększone wchłanianie benzenu, jednak przekroczenie tej wartości może być związane z zażywaniem niektórych leków, które są metabolizowane do fenolu.

Tabela 5.2. Warianty testu ekspozycji na fenol.

Warianty wskaźników wchłaniania benzenu	Obliczanie wchłoniętej dawki
1. Stężenie fenolu w moczu ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) zebrany między 6 a 8 godziną od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 1,96 \cdot y$
2. Szybkość wydalania fenolu w moczu ( $\mu\text{g}/\text{h}$ ) zebrany między 6 a 8 godziną od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 27,4 \cdot y$
3. Poziom fenolu w dobowej porcji moczu ( $\mu\text{g}$ ):	$x = 2,27 \cdot y$
x – wchłonięta dawka benzenu ( $\mu\text{g}$ ), y – zawartość fenolu w moczu ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ).	

## 5.8. Chloroform

### Właściwości fizykochemiczne

**Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ )** – bezbarwna ciecz o charakterystycznym słodkawym zapachu i smaku. Jest trudno rozpuszczalny w wodzie, natomiast dobrze miesza się z rozpuszczalnikami organicznymi: benzenem, benzyną i etanolem.

### Działanie szkodliwe

Powoduje nieodwracalne uszkodzenie nerek i wątroby człowieka. Działa narkotycznie, prowadzi do zaburzeń psychicznych i beśsenności. Wywołuje głębokie znieczulenie ogólne. Zgon w ostrym zatruciu chloroformem następuje na skutek zatrzymania czynności serca. Należy do grupy 2B substancji rakotwórczych wobec myszy i szczurów. Wobec tych zwierząt jest również teratogenem. 80-95% wchłoniętego chloroformu jest wydalana z organizmu w postaci niezmięnionej, a tylko nieznaczna jego część ulega przemianie, polegającej na odszczepieniu chloru.

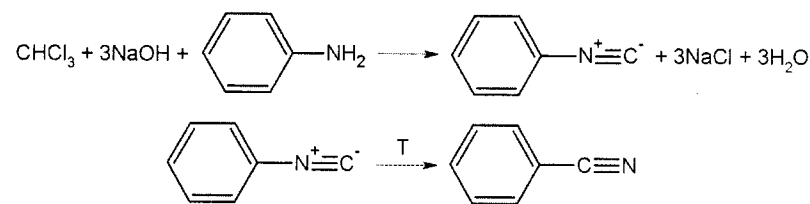
### Wartości toksyczne

NDS:  $8 \text{ mg}/\text{m}^3$ .  
 $\text{LD}_{50}$  (doustnie, szczury):  $908 \text{ mg}/\text{kg}$ ;  $\text{LC}_{50}$  (inhalacja, szczury):  $75 \text{ mg}/\text{kg}$ .  
**Doustna dawka śmiertelna dla osoby dorosłej wynosi około  $10 \text{ cm}^3$ .**

### 5.8.1. Reakcja izonitrylowa

Do  $1 \text{ cm}^3$  frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę nasyconego roztworu aniliny oraz 2-3 krople 10% roztworu NaOH. Ogrzewać do momentu powstania zmętnienia. W obecności chloroformu wystąpi charakterystyczny ostry, nieprzyjemny zapach izonitrylu. Podczas ogrzewania izonitryle ulegają izomeryzacji przechodząc w nitryle.

Reakcja ta nie jest specyficzna dla chloroformu, bowiem w tych samych warunkach dają ją również bromoform, jodoform lub tetrachlorek węgla.



### 5.8.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu

Do  $1 \text{ cm}^3$  frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kryształków rezorcyny i kilka kropli 10% roztworu NaOH. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Pojawienie się różowego zabarwienia świadczy o obecności chloroformu. Zabarwienie to może również wystąpić w obecności tetrachloru węgla lub aldehydu mrówkowego. Natomiast wynik ujemny wyklucza obecność chloroformu.

### 5.8.3. Reakcja Fujiwary

Do  $0,5 \text{ cm}^3$  frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 krople pirydyny i kroplę  $0,02 \text{ M}$  roztworu NaOH. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Pojawienie się czerwono-fioletowego zabarwienia świadczy o obecności chloroformu. Dłuższe ogrzewanie zawartości próbki powoduje osłabienie barwy lub jej przejście w brązową lub żółtą.

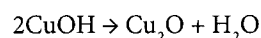
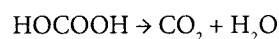
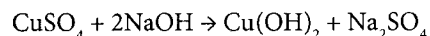
Metoda ta pozwala wykryć  $1 \mu\text{g}$  chloroformu w badanym materiale.

### 5.8.4. Reakcja z $\alpha$ -naftolem

$1 \text{ cm}^3$   $\alpha$ -naftolu rozpuszczonego w stężonym roztworze KOH należy ogrzewać przez 1-2 minuty w łaźni wodnej w temperaturze  $50^\circ\text{C}$ . Następnie dodać kilka kropli frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1). W przypadku obecności chloroformu pojawia się przejściowe zabarwienie niebieskie. Po zakwaszeniu roztworu wytrąca się ceglastoczerwony osad.

### 5.8.5. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II)

Do  $1 \text{ cm}^3$  frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać w nadmiarze roztwór NaOH, a następnie po kropli 1% roztwór  $\text{CuSO}_4$  do momentu pojawienia się zmętnienia. Następnie zawartość próbki ogrzewać do wrzenia w łaźni wodnej. W obecności chloroformu powstaje kwas mrówkowy, który redukuje wodorotlenek miedzi (II), a w następnym etapie daje żółty osad wodorotlenku miedzi (I) lub czerwony osad tlenku miedzi (I).



## 5.9. Cyjanowodór

### Właściwości fizykochemiczne

**Cyjanowodór (HCN)** – bezbarwna i lotna ciecz o zapachu gorzkich migdałów. Dobrze miesza się z wodą, etanolem i eterem.

### Działanie szkodliwe

Cyjanowodór i jego sole łatwo wchłaniają się do ustroju przez błony śluzowe przewodu pokarmowego i dróg oddechowych. Cyjanki wprowadzone do organizmu ulegają przemianie do rodanów i w tej postaci są wydalane z moczem. Cyjanowodór łączy się z wieloma metalami tworząc estry. Wszystkie związki, z których w organizmie łatwo uwalnia się HCN są silnymi truciznami. HCN hamuje aktywność oksydazy cytochromowej, co uniemożliwia wykorzystanie tlenu przez komórki. Przyczyną śmierci może być niedotlenienie tkanek, prowadzące do zmian zwyrodnieniowych w centralnym układzie nerwowym, porażenie ośrodka oddechowego i czynności serca. Prawdopodobnie cyjanki posiadają działanie mutagenne i teratogenne.

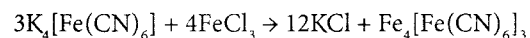
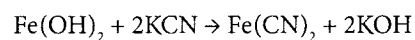
### Wartości toksyczne

NDSP: 5 mg/m<sup>3</sup> (dla HCN).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury) dla KCN: 5 mg/kg. **Śmiertelna dawka HCN dla człowieka wynosi około 1 mg/kg, KCN: 150-250 mg/70 kg.**

### 5.9.1. Reakcja z siarczanem (VI) żelaza (II) i chlorkiem żelaza (III)

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę świeżo przygotowanego 0,5% roztworu FeSO<sub>4</sub>, dokładnie wymieszać i następnie dodać kroplę 0,5% roztworu FeCl<sub>3</sub>. Po wymieszaniu lekko podgrzać i ostrożnie zakwaszyć 10% roztworem HCl.

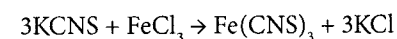
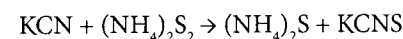
W wyniku reakcji związków żelaza z cyjanowodorem powstaje kompleksowy związek o niebieskim zabarwieniu tzw. błękit pruski. Metoda ta pozwala na wykrycie około 2 μg HCN w próbie. Małe stężenia HCN dają zabarwienie zielone lub niebieskozielone, natomiast przy większych jego stężeniach tworzy się niebieski osad błękitu pruskiego. Przy śladowych ilościach HCN zabarwienie powstaje dopiero po upływie 24 godzin.



### 5.9.2. Reakcja z polisiarczkiem amonu

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1), umieszczonego na szkiełku zegarkowym lub w parownicze, dodać 1 cm<sup>3</sup> 5% roztworu polisiarczku amonu i odparować do sucha w łaźni wodnej. Następnie zakwaszyć 10% roztworem HCl i dodać kroplę 5% roztworu FeCl<sub>3</sub>. W przypadku obecności cyjanów powstaje krwistoczerwone zabarwienie. Metoda ta pozwala wykryć 0,1 μg HCN w badanej próbie.

W wyniku reakcji cyjanowodoru z polisiarczkiem amonu powstaje tiocyjanian, który z FeCl<sub>3</sub> w środowisku kwaśnym daje krwistoczerwone zabarwienie.



### 5.9.3. Reakcja z kwasem pikrynowym

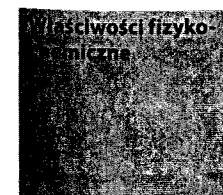
Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> 5% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oraz 2 cm<sup>3</sup> 5% roztworu kwasu pikrynowego. Dobrze wymieszać i ogrzewać w łaźni wodnej przez 5 minut. Po oziębieniu próby powstaje zabarwienie pomarańczowe świadczące o obecności cyjanów w badanym materiale. Próbę należy wykonać jednocześnie z próbą kontrolną (zamiast destylatu do wykonania reakcji użyć wodę destylowaną).

Cyjanowodór w reakcji z kwasem pikrynowym w środowisku kwaśnym tworzy kwas pikro-cyjaminowy o barwie pomarańczowej.

### 5.9.4. Reakcja z azotanem (V) srebra

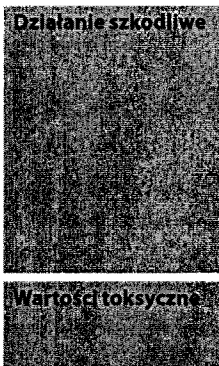
1 cm<sup>3</sup> frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) zakwaszyć rozcieńczonym HNO<sub>3</sub> i dodać AgNO<sub>3</sub> w nadmiarze. W obecności cyjanów w destylacie powstaje biały osad AgCN, który jest łatwo rozpuszczalny w amoniaku.

## 5.10. Fenol



### Właściwości fizykochemiczne

**Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH)** w stanie stałym jest bezbarwnym krystalicznym związkiem o nieprzyjemnym zapachu i palącym smaku. Z wodą tworzy wodzian fenolu. Rozpuszczalność w wodzie wzrasta wraz z podwyższaniem temperatury. Powyżej temperatury 65,7 °C fenol miesza się z wodą w każdym stosunku. Łatwo rozpuszcza się w olejach i rozpuszczalnikach organicznych, np. etanolu, chloroformie, eterze. Fenol w roztworach wodnych jest często stosowany jako środek odkażający.



Wchłania się przez skórę, drogi oddechowe, przewód pokarmowy. Fenol zaliczany jest do trucizn działających totalnie, ponieważ powoduje denaturację białek komórkowych. Przy zetknięciu ze skórą powoduje jej oparzenia z wytworzeniem pęcherzy oraz zaczerwienienia. Podczas długiego kontaktu ze skórą może dojść do powstania martwicy nawet tkanek podskórnych. Wywołuje hemolizę krwinek. Fenol wykazuje również działanie narkotyczne, powoduje osłabienie mięśni, bóle i zawroty głowy, obniżenie temperatury ciała, zaburzenia oddechu, spadek ciśnienia krwi. Przyczynia się do powstania zmian zwyrodnieniowych mięszu nerek i serca. Porażenie ośrodka oddechowego przez fenol prowadzi do śmierci.

NDS: 7,8 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 317 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 316 mg/m<sup>3</sup>; LD<sub>50</sub> (naskórnice, szczury): 669 mg/kg.

Obecność fenolu we frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) można już stwierdzić po ostrym charakterystycznym zapachu. Destylat jest poza tym mętny, a przy większych jego ilościach na dnie widoczne są kropelki zabarwione na kolor lekko czerwony. Kropelki rozpuszczają się w roztworze NaOH. W przypadku obecności kwasu salicylowego destylat należy zalkalizować Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, z którym kwas salicylowy reaguje tworząc sól sodową. Natomiast fenol nie daje tej reakcji z węglanem. Następnie roztwór należy wytrząsać z eterem i odparować w temperaturze pokojowej. Pozostałe w ten sposób tłuste krople o silnym zapachu fenolu rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór służy do wykonania reakcji identyfikacji.

### 5.10.1. Reakcja z 4-aminoatrypiną

Do 0,5 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 3 cm<sup>3</sup> wody destylowanej oraz 2-3 krople 0,75 M roztworu amoniaku. Dobrze wymieszać. Następnie dodać kroplę 0,6% roztworu 4-aminoatrypiny i kroplę 2% roztworu heksacyjanożelazianu (III) potasu. W przypadku obecności fenolu w destylacie tworzy się czerwone zabarwienie.

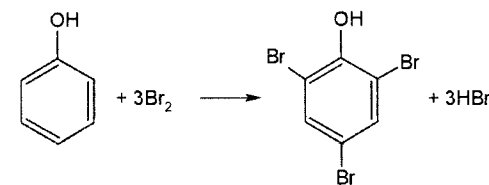
W wyniku reakcji z 4-aminoatrypiną w środowisku alkalicznym, przy udziale heksacyjanożelazianu (III) potasu jako środka utleniającego, powstaje związek o barwie czerwono-fioletowej. Metoda ta pozwala na wykrycie do 2 μg fenolu w badanej próbce.

### 5.10.2. Reakcja z wodą bromową

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodawać kroplami wodę bromową do otrzymania trwałego żółtego zabarwienia. W obecności fenolu powstaje natychmiast lub po pewnym czasie żółtawobiały, krystaliczny osad tribromo-

fenolu o temperaturze topnienia 94 °C.

Tribromopochodne mogą również tworzyć inne związki, takie jak: alkohol etylowy, aldehyd i kwas salicylowy.



### 5.10.3. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> świeżo przygotowanego 2% roztworu FeCl<sub>3</sub>. W obecności fenolu występuje zabarwienie niebieskie do niebieskofioletowego, które znika po dodaniu etanolu. W przypadku kwasu salicylowego, w odróżnieniu od fenolu, zabarwienie utrzymuje się po dodaniu alkoholu etylowego.

### 5.10.4. Reakcja z 5-nitrozo-8-hydroksychinoliną

1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) zalkalizować 10% roztworem NaOH i odparować do sucha. Oziębic i do otrzymanej w ten sposób pozostałości dodać 3 krople 1% roztworu 5-nitrozo-8-hydroksychinoliny w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Lekko ogrzewać w łaźni wodnej. 5-nitrozo-8-hydroksychinolina w postaci oksymu w środowisku stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaguje z fenolami dając barwnik indofenolowy. Metoda ta pozwala wykryć różnorodne związki aromatyczne w zależności od powstałego zabarwienia roztworu, co przedstawia tabela 5.3.

Tabela 5.3. Zabarwienie roztworu powstałe na skutek reakcji związków organicznych z 5-nitrozo-8-hydroksychinoliną.

Związek aromatyczny	Barwa roztworu
1 μg fenolu	ciemnobrunatna
2 μg rezorcyny	czerwonofioletowa
7 μg pirogallolu	czarna
4 μg pirokatechiny	ciemnozielona
5 μg nitrofenolu	zielonożółta
5 μg o-krezolu	ciemnobrązowa
5 μg ksylenu	fioletowa
10 μg α-naftolu	ciemnobrązowa

### 5.10.5. Reakcja z odczynnikiem Millona

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli odczynnika Millona. Wymieszać i odstawić na kilka minut. Przy braku zabarwienia ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej. Pojawienie się czerwonego koloru świadczy o obecności fenolu.

**ODCZYNNIK MILLONA:** 14 g rtęci metalicznej rozpuścić w 14 cm<sup>3</sup> stężonego HNO<sub>3</sub> i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

### 5.10.6. Próba Melzera

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz 1-2 krople aldehydu benzoesowego. Następnie próbę zagotować do jednorazowego wrzenia. Roztwór pierwotnie żółtawobrunatny pod wpływem ogrzewania przyjmuje barwę ciemnoczerwoną. Po oziębieniu dodać 10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i zalkalizować 10% roztworem KOH. W obecności fenolu mieszanina barwi się na kolor niebieskofioletowy.

### 5.10.7. Reakcja z dwuazowaną *p*-nitroaniliną

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm<sup>3</sup> odczynnika do sprzęgania (20 cm<sup>3</sup> 0,3% roztworu *p*-nitroaniliny zmieszane z 0,75 cm<sup>3</sup> 10% roztworu NaNO<sub>2</sub>). Po upływie 1 minuty dodać 2 cm<sup>3</sup> 20% roztworu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Wymieszać. Pojawienie się czerwonego zabarwienia po rozcieńczeniu próby wodą wskazuje na obecność fenolu w destylacie.

### 5.10.8. Reakcja z metawanadaniem (IV) amonu

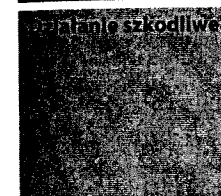
Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli świeżo przygotowanego 5% roztworu metawanadanu (IV) amonu w stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po wystąpieniu zabarwienia należy rozcieńczyć otrzymany roztwór wodą i dodać w nadmiarze 10% roztwory NaOH i KOH. W zależności od pojawiającej się barwy roztworu można zidentyfikować następujące związki:

- fenol** – po ochłodzeniu próby barwa staje się intensywnie niebieska, po rozcieńczeniu wodą przyjmuje kolor jasnej, oliwkowej zieleni, a po zalaniu roztworami NaOH i KOH zmienia się na pomarańczowoczerwoną;
- pirokatechina** – barwa intensywnie zielona;
- rezorcyna** – barwa niebieska, a po dodaniu NaOH i KOH – żółta;
- hydrochinon** – barwa brunatnożółta, ponadto tworzy się brunatny osad.

## 5.11. Ksylen



Bezbarwna, łatwo palna ciecz o charakterystycznym zapachu zbliżonym do benzenu. Ksylen jest około 4,5-krotnie mniej lotny od benzenu. Występuje w trzech izomerach: *orto*, *meta* i *para*.



Mechanizm toksycznego działania ksylenu związany jest z jego powinowactwem do tkanki tłuszczowej, nerwowej i do szpiku. Powoduje to działanie narkotyczne ksylenu. Może się też kumulować w nadnerczach i śledzionie. Zatrucie ksylenem prowadzi do zmian hematologicznych, niedokrwistości, białkomoczu, utraty przytomności, bólu głowy, bezsenności, zaburzeń nerwowych, przewodzenia pokarmowego i oddychania. Na skórze mogą pojawić się wypryski lub nawet stany zapalne.



NDS (dla mieszanin izomerów ksylenu): 100 mg/m<sup>3</sup>.  
***p*-ksylen** – LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 4550 ppm/4h; ***o*-ksylen** – LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; ***m*-ksylen** – LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; LD<sub>50</sub> (naskórnica, królik): 14100 mg/kg.

### 5.11.1. Oznaczanie zawartości kwasu *m*-metylohipurowego (metabolit ksylenu) w moczu

U ludzi ksylen ulega przemianom głównie przez utlenienie jednej z grup metylowych do kwasów toluilowych, które po połączeniu się z glicyną, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lub kwasem glukuronowym są wydalane z moczem. Ksylen w niewielkim stopniu może ulec przemianom do związków fenolowych, ksylenoli oraz kwasów hydroksytoluilowych. W badaniach przeprowadzonych na królikach i szczurach, stwierdzono że 60% *o*-ksylenu jest przekształcane w kwas toluilowy, który następnie jest wydalany z moczem w postaci wolnej lub związanej z kwasem glukuronowym. Po sprzęgnięciu z glicyną może być również wydalany jako kwas *o*-metylohipurowy. U ludzi około 80-90% *m*-ksylenu wchłoniętego w postaci par jest usuwane z organizmu jako kwas *m*-metylohipurowy. Część ksylenu może być wydalona przez płuca w postaci niezmienionej.

Oznaczanie zawartości kwasu *m*-metylohipurowego polega na ciągłej ekstrakcji moczu eterem etylowym w środowisku kwaśnym. Następnie przeprowadza się oddzielenie kwasu *m*-metylohipurowego od kwasu hipurowego metodą chromatografii bibułowej. Po wywołaniu chromatogramów uzyskane plamy należy wyluować etanolem. Pomiar absorbancji barwnego eluatu wykonuje się przy długości fali λ = 470 nm.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,1 M wodny roztwór HCl,
- eter etylowy cz.d.a.,
- 96% etanol,

4. bezwodnik kwasu octowego cz.d.a.,
5. 25% roztwór  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,
6. wywoływacz (4 g aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego rozpuścić w 100  $\text{cm}^3$  bezwodnika kwasu octowego z dodatkiem 10 g octanu sodu),
7. butanol I-rzędowy cz.d.a.,
8. roztwór wzorcowy kwasu *m*-metylohipurowego (1 g kwasu *m*-metylohipurowego rozpuścić w 100  $\text{cm}^3$  96% alkoholu etylowego),
9. bibuła chromatograficzna Whatman nr 4, komora chromatograficzna.

15  $\text{cm}^3$  moczu zakwasić do  $\text{pH}=2-2,5$ . Następnie poddać ekstrakcji ciągłej za pomocą eteru etylowego przez 4 godziny. Po ekstrakcji eter odparować, a pozostałość rozpuścić w 3  $\text{cm}^3$  etanolu. Za pomocą pipety pobrać 0,01  $\text{cm}^3$  otrzymanego roztworu etanolowego i nanieść na pasek bibuły chromatograficznej o wymiarach 3,5×58 cm. Rozdział prowadzić w komorze chromatograficznej przez 40 godzin. Jako fazę ruchomą stosuje się mieszaninę *n*-butanolu i 25% roztworu  $\text{NH}_4\text{OH}$  w stosunku 4:1. Po rozwinięciu chromatogram należy wysuszyć przez 15 minut na powietrzu, a następnie w suszarce w temperaturze 60 °C przez 1-2 godziny. Po wysuszeniu chromatogram wywołać przez zanurzenie w wywoływaczu. Po wstępnym wysuszeniu między arkuszami bibuły, umieścić w suszarce o temperaturze 140 °C na 3 minuty. Uzyskuje się plamy koloru pomarańczowego o następujących wartościach  $R_f$ : 0,31 dla kwasu hipurowego i 0,40 dla kwasu *m*-metylohipurowego. Plamy kwasu *m*-metylohipurowego po wycięciu wyluować za pomocą 5  $\text{cm}^3$  etanolu przez okres 2 godzin. Pomiaru absorbancji dokonać przy długości fali  $\lambda=470$  nm wobec próby ślepej będącej eluatem bibuły zanurzonej uprzednio w odczynniku wywołującym i wysuszonym w temperaturze 140 °C.

**Wykres wzorcowy:** do 15  $\text{cm}^3$  moczu fizjologicznego dodawać kolejno: 0,75, 1,5, 2,25, 3,0 i 3,75  $\text{cm}^3$  roztworu wzorcowego kwasu *m*-metylohipurowego. Dalsze postępowanie jak z próbą badaną. Zawartość kwasu *m*-metylohipurowego w badanej próbce odczytać z krzywej wzorcowej.

Obliczanie wchłoniętej dawki ksyleny dokonać przy zastosowaniu jednego z przedstawionych w tabeli 5.4. wariantów ekspozycji. Ocenę narażenia na ksylen można oprzeć na najwyższej dopuszczalnej dziennej dawce *m*-ksylenu, gdyż izomer ten stanowi 60-75% mieszaniny trzech izomerów występujących w preparacie handlowym. Najwyższa dawka dzienna wynosi 300 mg uwzględniając 65% zawartości *m*-ksylenu w mieszaninie. **W moczu osób nienarażonych na działanie *m*-ksylenu nie stwierdza się obecności kwasu *m*-metylohipurowego.**

Tabela 5.4. Warianty ekspozycji na ksylen.

Wariant testu	Obliczenie wchłoniętej dawki
1. Szybkość wydalania kwasu <i>m</i> -metylohipurowego (mg/h):	
a) w moczu zebrany w ciągu 24 godzin od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 14,87 \cdot y$
b) w moczu zebrany między 6 a 8 godziną od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 4,94 \cdot y$
c) w moczu zebrany między 8 a 12 godziną od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 17,1 \cdot y$
2. Ilość kwasu <i>m</i> -metylohipurowego w moczu zebrany między 6 a 8 godziną ekspozycji:	$x = 2,4 \cdot y$
x – wchłonięta dawka ksyleny (mg), y – zawartość kwasu <i>m</i> -metylohipurowego (mg/ $\text{cm}^3$ ).	

## 5.12. Kwas mrówkowy



**Kwas mrówkowy (HCOOH)** – bezbarwna, przezroczysta ciecz o ostrym, drażniącym zapachu. Miesza się z wodą w każdym stosunku.



Kwas mrówkowy posiada silne właściwości żrące, może spowodować podrażnienie skóry. Pary kwasu wywołują podrażnienia oczu, kaszel, duszność, obrzęk płuc i głośni. Wysoką kumulację kwasu mrówkowego obserwuje się w organizmie również po spożyciu alkoholu metylowego. Przekształcenie metanolu do kwasu mrówkowego prowadzi do silnej kwasicy metabolicznej oraz zmian zwyrodnieniowych w oku (ślepoty).



NDS: 5  $\text{mg}/\text{m}^3$ ; NDSCh: 15  $\text{mg}/\text{m}^3$ .  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 1100  $\text{mg}/\text{kg}$ .

### 5.12.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5  $\text{cm}^3$  wody destylowanej i dodać 1  $\text{cm}^3$  10% roztworu  $\text{FeCl}_3$ . W razie obecności kwasu mrówkowego roztwór zabarwi się na czerwono.

### 5.12.2. Reakcja z chlorkiem rtęci (II)

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5  $\text{cm}^3$  wody destylowanej i dodać 1  $\text{cm}^3$  1% roztworu  $\text{HgCl}_2$ , wymieszać i ogrzewać do wrzenia w łaźni wodnej. Obecność kwasu mrówkowego spowoduje redukcję chlorku rtęci (II) do chlorku rtęci (I).



### 5.12.3. Reakcja z azotanem (V) srebra

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i dodać 2 cm<sup>3</sup> 2% roztworu AgNO<sub>3</sub>, który ulega redukcji z wydzieleniem metalicznego srebra, co wskazuje na obecność kwasu mrówkowego.

## 5.13. Kwas octowy

### Właściwości fizykochemiczne

**Kwas octowy (CH<sub>3</sub>COOH)** – bezbarwna ciecz o ostrym, drażniącym zapachu. Miesza się z wodą w każdym stosunku.

### Działanie szkodliwe

Jest to związek silnie żrący, przy bezpośrednim kontakcie na skutek oparzeń chemicznych powoduje uszkodzenie tkanek z martwicą skrzepową. Wdychanie par kwasu może doprowadzić do ciężkiego toksycznego obrzęku płuc i głosni oraz podrażnienia spojówki oczu. Często zwiększone stężenie kwasu octowego w organizmie obserwuje się po spożyciu etanolu. Powstały z przemian metabolicznych etanolu przy niedoborze tlenu komórkowego prowadzi do silnej kwasicy organizmu i uszkodzenia wątroby.

### Wartości toksyczne

NDS: 15 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 30 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 3310 mg/kg; LD<sub>50</sub> (naskórnice, królik): 1060 mg/kg.

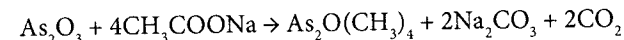
Podczas wykonywania reakcji na identyfikację kwasu octowego w badanym materiale, należy część destylatu, który posiada silnie kwaśny odczyn zobojętnić 5% roztworem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wobec papierka wskaźnikowego i odparować w łaźni wodnej do sucha. Otrzymany w ten sposób biały osad należy podzielić na kilka części i wykonać próby na wykrywanie kwasu octowego i kwasu mrówkowego (patrz rozdział 5.12).

### 5.13.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu rozpuścić w 0,5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i dodać 1 cm<sup>3</sup> 10% roztworu FeCl<sub>3</sub>. W obecności kwasu octowego roztwór zabarwi się na czerwono.

### 5.13.2. Reakcja z tritlenkiem arsenu (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu zmieszać w probówce z tritlenkiem arsenu (III) i podgrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności kwasu octowego można wyczuć wstrętny zapach tlenku kakodylu. Reakcję tę dają tylko suche octany, natomiast nie zachodzi z kwasem mrówkowym, co pozwala na odróżnienie od siebie tych dwóch kwasów.



### 5.13.3. Reakcja estryfikacji

Część osadu powstałego po odparowaniu rozpuścić w 0,5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i dodać 1 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz kilka kryształków octanu sodu. Następnie ogrzewać. W obecności kwasu octowego tworzy się charakterystyczny zapach octowy, wyczuwalny również po oziębieniu lub po wylaniu go na zimną wodę.

## 5.14. Nitrobenzen

### Właściwości fizykochemiczne

**Nitrobenzen (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>)** – żółta, oleista ciecz o zapachu gorzkich migdałów. Słabo rozpuszcza się w wodzie, natomiast dobrze w rozpuszczalnikach organicznych, np. etanolu, eterze.

### Działanie szkodliwe

Działanie szkodliwe nitrobenzenu wynika z właściwości toksycznych jego metabolitów: fenylohydroksylaminy i *p*-aminofenolu, które powodują powstawanie methemoglobiny. Dzięki właściwościom lipofilnym, nitrobenzen łatwo przechodzi przez barierę krew-mózg i kumuluje się w ośrodkowym układzie nerwowym. Efektem tego jest działanie narkotyczne i neurologiczne nitrobenzenu. Wpływ rakotwórczy nitrobenzenu jest spowodowany tworzeniem się wolnych rodników. Ostre zatrucie nitrobenzenem objawia się niedotlenieniem tkanek i narządów (sinica), zaburzeniem pracy serca, niewydolnością krążenia, spadkiem ciśnienia krwi, bólami głowy, stanami narkotycznymi, utratą przytomności, śpiączką. Porażenie ośrodka oddechowego i ostra niewydolność krążenia spowodowane nitrobenzenem prowadzą do śmierci. Dłuższe działanie nitrobenzenu jest przyczyną niedokrwistości (spadek o połowę ilości erytrocytów i hemoglobiny) oraz uszkodzenia wątroby i żółtaczkę.

### Wartości toksyczne

NDS: 3 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 10 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 489 mg/kg; LD<sub>50</sub> (naskórnice, szczury): 2100 mg/kg.

Obecność nitrobenzenu w destylacie można już wykryć po zapachu gorzkich migdałów przy wykluczeniu obecności cyjanowodoru i aldehydu benzoowego. W przypadku dużych stężeń nitrobenzenu w badanym materiale podczas destylacji w odbieralniku pojawia się w postaci żółtych, tłustych kropeł o zapachu gorzkich migdałów.

Reakcje identyfikacji nitrobenzenu polegają na redukcji grupy nitrowej do aminowej. Powstaje w ten sposób anilina, którą można wykryć za pomocą reakcji charakterystycznych dla tego związku.

### 5.14.1. Redukcja do aniliny

2-3 cm<sup>3</sup> frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) wytrząsać z eterem w temperaturze pokojowej. Następnie przemyć małą ilością wody i przesączyć. Eter odparować w temperaturze pokojowej. Pozostałość po odparowaniu rozpuścić w alkoholu etylowym i przelać do małej zlewki. Dodać 2 cm<sup>3</sup> stężonego HCl i niewielką ilość płynu cynkowego. Dobrze wymieszać i odstawić badaną próbę do momentu zniknięcia charakterystycznego zapachu nitrobenzenu (zapachu gorzkich migdałów). Płyn ponownie przesączyć i wytrząsać z eterem. Po odparowaniu eteru otrzymaną pozostałość rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej i przeprowadzić reakcje specyficzne dla aniliny (patrz rozdział 5.6).

### 5.14.2. Reakcja z rezorcyną

Część suchej pozostałości przenieść do parowniczkii. Zalać stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i następnie dodać kilka kryształków rezorcyny. Powstanie fioletowego zabarwienia świadczy o obecności nitrobenzenu w badanej próbce.

## 5.15. Pirydyna

### Właściwości fizykochemiczne

**Pirydyna (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N)** – bezbarwna lub żółtawa ciecz dobrze rozpuszczająca się w wodzie, etanolu, benzenie i eterze.

### Działanie szkodliwe

Podczas wdychania par pirydyny następuje podrażnienie błon śluzowych górnych dróg oddechowych. Pirydyna powoduje także podrażnienia oczu. Spożycie wywołuje mdłości, bóle głowy, niepokój, bezsenność. Przy dużych dawkach pirydyny obserwuje się uszkodzenia mięśnia sercowego, zapadłość, narkozę. Działanie przewlekłe objawia się uszkodzeniem wątroby oraz nerek.

### Wartości toksyczne

NDS: 5 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 30 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 891 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 4000 ppm/4h.

### 5.15.1. Reakcja z aniliną i bromocyjanem

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli świeżo przedestylowanej aniliny i 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu bromocyjanu. W przypadku obecności pirydyny w badanym materiale pojawia się żółte zabarwienie warstwy wodnej i czerwonej aniliny. Przy dużym stężeniu pirydyny tworzy się osad bromku *N*-anilido-*N*-fenylodihydropirydyny o zabarwieniu czerwonym.

## 5.16. TOLUEN

Roztwór bromocyjanu należy sporządzić na świeżo dodając do wody bromowej 10% roztwór KCN (jednocześnie chłodząc) do momentu jej odbarwienia.

### 5.15.2. Reakcja z benzydyną

Do 2 cm<sup>3</sup> obojętnego lub słabo kwaśnego roztworu frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 g octanu sodu, 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu bromocyjanu oraz 1 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu benzydyny. Dokładnie wymieszać. Następnie odstawić na kilka minut. Pojawienie się czerwonej barwy wskazuje na obecność pirydyny.

### 5.15.3. Reakcja z siarczanem (VI) miedzi (II) i tiocyjanianem potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę 10% roztworu CuSO<sub>4</sub>. Kilka razy wstrząsnąć. Następnie dodać kroplę 20% roztworu tiocyjanianu potasu. W przypadku występowania pirydyny w destylacie powstaje zielony osad Cu(C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N)<sub>2</sub>, który bardzo trudno rozpuszcza się w wodzie.

### 5.15.4. Reakcja z 2,4-dinitrochlorobenzenem

1 cm<sup>3</sup> frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ogrzewać w łaźni wodnej z 1 cm<sup>3</sup> alkoholowego roztworu 2,4-dinitrochlorobenzenu. Po ostygnięciu i dodaniu do próby 0,5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu KOH tworzy się barwa czerwono-fioletowa, świadcząca o obecności pirydyny w badanym materiale.

## 5.16. Toluen

### Właściwości fizykochemiczne

Rozpuszczalnik organiczny, dwa razy mniej lotny od benzenu.

### Działanie szkodliwe

Toluen działa silnie toksycznie na układ nerwowy. Powoduje zmiany w układzie krwionośnym, objawiające się zmniejszeniem liczby krwinek czerwonych, ich wielkości i kształtu. W organizmie toluen jest szybko metabolizowany do kwasu benzooesowego, który charakteryzuje się niewielką toksycznością, ale może być przyczyną kwasicy całego ustroju. Podczas zatrucia toluenem dochodzi do porażenia ważnych dla życia ośrodków nerwowych, co często prowadzi do utraty przytomności. Zatrucia przewlekłe objawiają się podrażnieniem błon śluzowych, zapaleniem spojówek, zaburzeniami nerwowymi, zawrotami i bólami głowy, zaburzeniami pracy serca.

### Wartości toksyczne

NDS: 100 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 350 mg/m<sup>3</sup>.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 636 mg/kg; LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 49 g/m<sup>3</sup>/4h.

### 5.16.1. Oznaczenie zawartości kwasu hipurowego (metabolit toluenu) w moczu

W ustroju toluen jest metabolizowany do kwasu benzoowego, który w 10-20% jest wydalany z moczem w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym. Około 68% wchłoniętego toluenu ulega przemianom do kwasu hipurowego. U ludzi toluen w postaci niezmienionej może być wydalany z wydychanym powietrzem (około 16%) lub w śladowych ilościach (0,06%) wraz z moczem. Wydalanie kwasu benzoowego sprzężonego z kwasem glukuronowym jest bardzo szybkie. Stwierdzono, że po upływie 24 godzin od ekspozycji na toluen nie występuje podwyższony poziom tego metabolitu w moczu. Ocenę narażenia na toluen opiera się na oznaczaniu zawartości kwasu benzoowego lub hipurowego w moczu zebrany między 4 a 8 godziną ekspozycji.

Zasada oznaczenia zawartości kwasu hipurowego w moczu metodą Mikulskiego i Wiglusz polega na wykorzystaniu reakcji barwnej kwasu hipurowego z aldehydem *p*-aminobenzoowym i bezwodnikiem octowym.

#### ODCZYNNIKI:

1. 6 M roztwór wodny HCl,
2. octan etylu cz.d.a.,
3. aldehyd *p*-aminobenzoowy (roztwór 1,5% w bezwodniku kwasu octowego),
4. chlorek żelaza (III) FeCl<sub>3</sub> (roztwór 0,16% w bezwodniku kwasu octowego) przygotowany bezpośrednio przed oznaczeniem,
5. 96% lub absolutny alkohol etylowy,
6. roztwór wzorcowy kwasu hipurowego (10 mg kwasu rozpuścić w 100 cm<sup>3</sup> wody zakwaszonej HCl do pH=2).

5 cm<sup>3</sup> moczu zakwaszyć HCl do pH=2 i rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 100 cm<sup>3</sup>. Pobrać 1 cm<sup>3</sup> i poddać ekstrakcji 5 cm<sup>3</sup> octanu etylu, wytrząsając próbę w rozdzielaczu przez 1 minutę. Następnie pobrać 1 cm<sup>3</sup> ekstraktu i odparować w łaźni wodnej do sucha. Do suchej pozostałości dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 1,5% roztworu aldehydu *p*-aminobenzoowego w bezwodniku octowym oraz 0,5 cm<sup>3</sup> 0,16% roztworu FeCl<sub>3</sub>. Próbę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Oziębic i dodać 4 cm<sup>3</sup> etanolu. Bardzo dokładnie wymieszać i odczekać 10 minut. Po tym czasie odczytać wartość absorbancji przy długości fali λ=470 nm wobec próby odczynnikowej.

**Wykres wzorcowy:** do probówek pobrać wzrastające ilości roztworu wzorcowego kwasu hipurowego: 10, 20, 30, 40, 50 i 60 mg i uzupełnić wodą destylowaną do 1 cm<sup>3</sup>. Następnie do każdej probówki dodać 5 cm<sup>3</sup> octanu etylu. Dalsze postępowanie jest analogiczne do wyżej opisanego. Odczytać wartość absorbancji dla prób wzorcowych i sporządzić krzywą wzorcową. Z wykresu odczytać zawartość kwasu hipurowego w próbce badanej.

Obliczenie wchłoniętej dawki (D) toluenu można dokonać na podstawie wzoru:

$$D = \frac{V - 12}{0,08} \left( \frac{\text{mg}}{\text{godz.}} \right)$$

gdzie:

V – szybkość wydalania (mg/cm<sup>3</sup>).

## 5.17. Trichloroetylen

**Właściwości fizyko-chemiczne**

Przezroczysta ciecz o zapachu zbliżonym do chloroformu. Dobrze rozpuszcza tłuszcze, farby, emalie, kauczuk.

**Właściwości szkodliwe**

TRI działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, uszkadza miesień sercowy, wątrobę i nerki. Jest związkami lipofilnym o wysokim powinowactwie do lipidów, który łatwo przenika barierę krew-mózg i kuluje się w tkance nerwowej. TRI jest silną trucizną protoplazmatyczną i enzymatyczną. Powoduje stłuszczenie komórek wątroby i ich marskość oraz uszkodzenie nerek. Ciężkie zatrucie TRI prowadzi do utraty przytomności, zaburzenia rytmu serca, porażenia nerwu trójdzielnego, a zwłaszcza jego włókien czuciowych. Porażenie ośrodka oddechowego oraz czynności serca przez TRI powoduje zgon nawet w ciągu kilku godzin. Długotrwałe narażenie na TRI prowadzi do uszkodzenia nerek, wątroby i rozwoju żółtaczki, osłabienia, upośledzenia wzroku, wystąpienia bólów nerwowych, mięśni i stawów. Bezpośrednie działanie na skórę jest przyczyną stanów zapalnych skóry.

**Właściwości toksyczne**

NDS: 50 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 400 mg/m<sup>3</sup>.  
LC<sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 8000 ppm/4h; LD<sub>50</sub> (naskórnice, królik): > 29000 mg/kg; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 4920 mg/kg; **LD<sub>50</sub> (doustnie, człowiek): 7000 mg/kg.**

U ludzi trichloroetylen jest metabolizowany do chloralu (aldehydu trichlorooctowego) i wodzianu chloralu (uwodnionego aldehydu trichlorooctowego) tworząc uprzednio ugrupowanie epoksydowe. Powstały wodzian chloralu bardzo szybko ulega redukcji do trichloroetanolu (30-60%) albo na drodze utlenienia tworzy kwas trichlorooctowy (10-40%). Oprócz w/w metabolitów stwierdzono także obecność kwasu monochlorooctowego (3-5%), kwasu dichlorooctowego (0,1-2%), kwasu szczawowego (0,7-1,8%) i *N*-(hydroksyacetylo)-aminoetanolu (4,1-7,2%). TRI w organizmie ulega sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym w postaci, której jest wydalany z moczem. TRI w niewielkiej ilości jest również wydalany w postaci niezmienionej z powietrzem wydychanym (19%) oraz z moczem (poniżej 1%). Maksimum wydalania TRI przypada pomiędzy 3 a 4 godziną po ekspozycji organizmu na tę substancję toksyczną, a dla kwasu trichlorooctowego po 24-48 godzinach od przerwania ekspozycji.

Ocena narażenia na trichloroetylen najczęściej oparta jest na oznaczaniu kwasu trichlorooctowego lub trichloroetanolu w moczu.

### 5.17.1. Oznaczanie zawartości kwasu trichlorooctowego

Oznaczanie zawartości kwasu trichlorooctowego opiera się na reakcji barwnej Fujiwary z pirydyną w środowisku alkalicznym.

#### ODCZYNNIKI:

1. pirydyna cz.d.a. (redestylowana),
2. 20% roztwór NaOH,
3. kwas trichlorooctowy,
4. roztwór podstawowy kwasu trichlorooctowego o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup>,
5. roztwór wzorcowy kwasu trichlorooctowego o stężeniu 10 µg/cm<sup>3</sup>.

Do 2 cm<sup>3</sup> moczu dodać 5 cm<sup>3</sup> 20% roztworu NaOH. Dobrze wymieszać. Następnie dodać 8 cm<sup>3</sup> pirydyny, ponownie wymieszać i umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 70 °C na 15 minut. Po tym czasie próbkę ochłodzić. Do 7,5 cm<sup>3</sup> pobranej warstwy pirydynowej dodać 3 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, wymieszać i zmierzyć absorbancję powstałego czerwono-fioletowego roztworu przy długości fali λ=530 nm.

**Wykres wzorcowy:** do probówek odmierzyć od 0 do 2 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego kwasu trichlorooctowego (0-20 µg) i uzupełnić wodą destylowaną do objętości 2 cm<sup>3</sup>. Dalsze postępowanie jak przy oznaczeniu kwasu trichlorooctowego w moczu. Zawartość kwasu trichlorooctowego w badanej próbce odczytać z wykresu wzorcowego.

### 5.17.2. Oznaczanie zawartości trichloroetanolu

Trichloroetanol wydalany jest z moczem w połączeniu z kwasem glukuronowym w postaci kwasu uruchlorowego. Mocz po hydrolizie z H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> poddać destylacji z parą wodną. Uzyskany w ten sposób wolny trichloroetanol oznaczyć za pomocą reakcji Fujiwary.

#### ODCZYNNIKI:

1. trichloroetanol cz.d.a.,
2. pirydyna cz.d.a. (redestylowana),
3. stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cz.d.a.,
4. 5M wodny roztwór NaOH,
5. roztwór podstawowy trichloroetanolu o stężeniu 5 mg/cm<sup>3</sup>,
6. roztwór wzorcowy trichloroetanolu o stężeniu 250 µg/cm<sup>3</sup>.

Do 100 cm<sup>3</sup> moczu dodać 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i ogrzewać przez godzinę pod chłodnicą zwrotną. Uwolniony po hydrolizie trichloroetanol destylować z parą wodną zbierając 100 cm<sup>3</sup> destylatu (1 cm<sup>3</sup> destylatu odpowiada 1 cm<sup>3</sup> moczu). Następnie pobrać 2 cm<sup>3</sup> destylatu i dodać do niego 5 cm<sup>3</sup> 5 M NaOH i 10 cm<sup>3</sup> pirydyny. Dobrze wymieszać. Po wymieszaniu badaną próbkę wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 70 °C na 15 minut. Po tym czasie próbkę ochłodzić, pobrać z niej 5 cm<sup>3</sup> warstwy pirydynowej i przenieść do probówki z 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Po wymieszaniu odczytać absorbancję barwnego roztworu przy długości fali λ=420 nm wobec próby ślepej (odczynnikowej) w czasie nie dłuższym niż 20 minut po dodaniu warstwy pirydynowej do wody.

**Wykres wzorcowy:** wykres wzorcowy przygotować z roztworu o stężeniu 250 µg/cm<sup>3</sup> dla zakresu stężeń 35 i 350 µg trichloroetanolu w objętości 2 cm<sup>3</sup>. Jednocześnie przygotować próbkę ślepa, zawierającą 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, zamiast destylatu moczu. Następnie do wszystkich prób dodać 5 cm<sup>3</sup> 5 M NaOH i 10 cm<sup>3</sup> pirydyny. Dalej postępować tak jak przy oznaczaniu moczu.

### 5.17.3. Oznaczanie całkowitej zawartości związków trichlorowych

W pierwszym etapie próbkę moczu poddaje się utlenianiu, a następnie ekstrakcji pirydyną ze środowiska zasadowego. W kolejnej fazie przeprowadza się barwną reakcję z chlorowodorkiem *p*-toluidyny. Zawartość badanych metabolitów: kwasu trichlorooctowego i trichloroetanolu oznacza się spektrofotometrycznie.

#### ODCZYNNIKI:

1. chlorowodorek *p*-toluidyny cz.d.a. (3% roztwór w 85% kwasie mrówkowym),
2. roztwór wodny podstawowy kwasu trichlorooctowego o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup>,
3. roztwór wodny roboczy kwasu trichlorooctowego o stężeniu 25 µg/cm<sup>3</sup>,
4. roztwór wodny podstawowy trichloroetanolu o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup>,
5. roztwór wodny roboczy trichloroetanolu o stężeniu 25 µg/cm<sup>3</sup>,
6. roztwór wzorcowy mieszaniny kwasu trichlorooctowego (25 µg/cm<sup>3</sup>) i trichloroetanolu (25 µg/cm<sup>3</sup> zmieszanych w stosunku 1:1),
7. pirydyna cz.d.a.,
8. 10 M wodny roztwór KOH,
9. odczynnik utleniający (8,9 g CrO<sub>3</sub> + 15 cm<sup>3</sup> 61% HNO<sub>3</sub> + 5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O).

Do 0,5 cm<sup>3</sup> moczu dodać 0,5 cm<sup>3</sup> odczynnika utleniającego i dobrze wymieszać. Probówkę szczelnie zamknąć i próbkę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Zawartość probówki ochłodzić w lodzie i zobojętnić roztworem 10 M KOH, dodać 2 cm<sup>3</sup> KOH i 5 cm<sup>3</sup> pirydyny, wymieszać. Mieszaninę ponownie ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 3 minuty w celu wywołania barwy. Po schłodze-

niu (przez 5 minut) pobrać do nowej czystej probówki 3 cm<sup>3</sup> warstwy pirydynowej, dodać 0,5 cm<sup>3</sup> roztworu chlorowodoru *p*-toluidyny w kwasie mrówkowym. Pomiar absorbancji wykonać po 30 minutach przy długości fali  $\lambda=500$  nm wobec wody destylowanej.

**Wykres wzorcowy:** do 5 probówek odmierzyć kolejno: 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 i 0,20 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego (mieszaniny kwasu trichlorooctowego i trichloroetanolu w stosunku 1:1) i uzupełnić moczem fizjologicznym do objętości 0,5 cm<sup>3</sup>. Dalej należy postępować jak z próbą badaną. Sporządzić wykres wzorcowy i z niego odczytać całkowitą zawartość związków trichlorowych w próbie badanej.

Znając całkowitą zawartość związków trichlorowych należy oznaczyć ilość kwasu trichlorooctowego w badanej próbce.

Do 0,5 cm<sup>3</sup> badanego moczu dodać 0,5 cm<sup>3</sup> odczynnika utleniającego i natychmiast zobojętnić roztworem KOH. Próbę ochłodzić w lodzie. Następnie dodać 2 cm<sup>3</sup> 10 M KOH i 5 cm<sup>3</sup> pirydyny. Dalsze postępowanie – analogicznie jak przy oznaczaniu całkowitej zawartości związków trichlorowych. Zawartość kwasu trichlorooctowego w badanej próbce odczytać z uprzednio sporządzonego wykresu wzorcowego.

Dysponując wynikami dotyczącymi całkowitej zawartości związków trichloro pochodnych oraz zawartości kwasu trichlorooctowego można obliczyć ilość trichloroetanolu w badanej próbce moczu. Uzyskuje się to poprzez odjęcie od całkowitej ilości związków trichlorowych, odczytanej z wykresu wzorcowego ilości kwasu trichlorooctowego.

Dynamika wydalania trichloroetanolu i kwasu trichlorooctowego jest różna. Zawartość trichloroetanolu w moczu informuje o narażeniu osoby w danym dniu, natomiast kwas trichlorooctowy wskazuje na narażenie osoby w dłuższym okresie czasu. Stwierdzono istnienie prostoliniowej zależności między stężeniem trichloroetyleny w powietrzu a stężeniem kwasu trichlorowego w moczu, np. stężenie trichloroetyleny w powietrzu wynoszące 400 mg/m<sup>3</sup> odpowiada stężeniu kwasu trichlorooctowego w moczu około 160 mg/dm<sup>3</sup>, natomiast przy wartości 50 mg/m<sup>3</sup> trichloroetyleny w powietrzu, stężenie kwasu trichlorooctowego wynosi około 20 mg/dm<sup>3</sup>. Podaną wartość można uważać za najwyższy dopuszczalny poziom kwasu trichlorooctowego w moczu.

Według Elkinsa można dokonać oceny narażenia na trichloroetylen uwzględniając stężenie kwasu trichlorooctowego w moczu:

- **narażenie nieznaczne:** poniżej 50 mg/dm<sup>3</sup> moczu,
- **narażenie lekkie:** 50-200 mg/dm<sup>3</sup> moczu,
- **narażenie umiarkowane:** 200-500 mg/dm<sup>3</sup> moczu,
- **narażenie ciężkie:** powyżej 500 mg/dm<sup>3</sup> moczu.

## 6 IDENTYFIKACJA WYBRANYCH NIELOTNYCH TRUCIEN ORGANICZNYCH

Do grupy trucizn ekstrahujących się rozpuszczalnikami organicznymi należą substancje odznaczające się różnym działaniem toksykodynamicznym i zróżnicowanymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. Są to związki pochodzenia naturalnego (alkaloidy, glikozydy), jak i syntetyczne, np. większość leków. Nielotne trucizny organiczne możemy podzielić na dwie grupy, do których zaliczamy:

1. związki o charakterze niezasadowym: pestycydy (patrz rozdział 9), glikozydy oraz syntetyczne leki: przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, uspokajające i nasenne;
2. związki o charakterze zasadowym: alkaloidy (patrz rozdział 8.1), syntetyczne narkotyki, leki przeciwhistaminowe i psychotropowe.

W niniejszym rozdziale zostaną zaprezentowane metody identyfikacji związków chemicznych (naturalnych i syntetycznych) stosowanych powszechnie jako leki o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym, przeciwzapalnym oraz psychotropowym. **Należy pamiętać, że każdy środek leczniczy stosowany niezgodnie z zaleceniami lekarza może stać się trucizną.**

## 6.1. Kwas salicylowy

### Właściwości fizykochemiczne

**Kwas salicylowy** (Ryc. 6.1) tworzy lekkie, białe krystaliczne igły, bezzapachowe o ostrym słodko-kwaśnym smaku. Dobrze rozpuszcza się w eterze, gorzej w gorącej wodzie, natomiast słabo w zimnej wodzie, a najslabiej w chloroformie.

### Działanie farmakologiczne

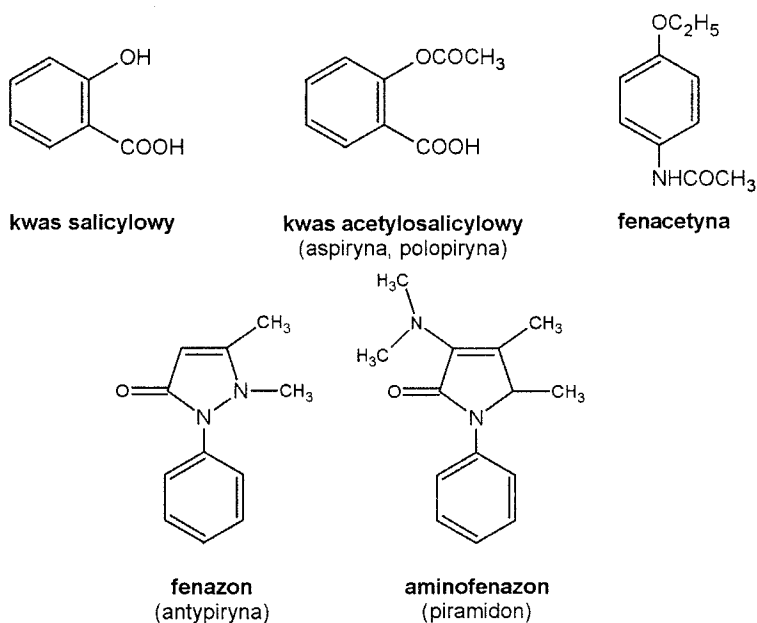
Niesteroidowy lek przeciwbólowy, przeciwzkrzepowy, przeciwzapalny, przeciwgorączkowy.

### Działanie szkodliwe

Wywołuje pobudzenie czynności układu oddechowego, zaburza czynności nerek, powoduje sinicę, wymioty, zawroty głowy, senność, zaburzenia koordynacji, czasem zgon.

### Dawka śmiertelna dla człowieka

Salicylany (doustnie): 25-35 g.



Ryc. 6.1. Wzory strukturalne leków o działaniu przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym.

### 6.1.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

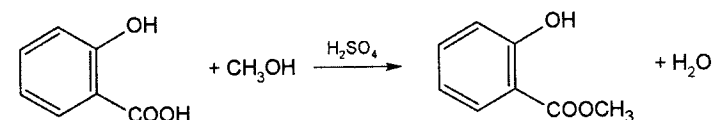
Do 0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu FeCl<sub>3</sub>. Wymieszać. Pojawienie się fioletowego zabarwienia świadczy o obecności kwasu salicylowego. W odróżnieniu od fenolu fioletowa barwa nie znika po dodaniu etanolu.

### 6.1.2. Reakcja z wodą bromową

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu wody bromowej. Pojawienie się białego osadu tribromofenolu z równoczesnym wydzieleniem ditlenku węgla wskazuje na obecność kwasu salicylowego.

### 6.1.3. Reakcja z alkoholem metylowym

0,5 cm<sup>3</sup> badanej próby odparować. Do suchego osadu dodać 1 cm<sup>3</sup> metanolu oraz 4 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ogrzewać do temperatury 60 °C. W przypadku obecności kwasu salicylowego można wyczuć charakterystyczny zapach metylowego estru kwasu salicylowego.



### 6.1.4. Reakcja z kwasem azotowym (V)

0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu ogrzewać z 1 cm<sup>3</sup> 10% roztworu HNO<sub>3</sub>. Roztwór barwi się na żółto wskutek powstania kwasu nitrosalicylowego.

### 6.1.5. Reakcja Salfa

Sporządzić 1 cm<sup>3</sup> mieszaniny składającej się z równych części stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 40% aldehydu mrówkowego. Do mieszaniny dodać 0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu, a następnie kilka mg metawanadanu (IV) amonu. W obecności kwasu salicylowego powstaje błękitne zabarwienie przechodzące w niebieskozielone, a później w zielone. Reakcja ta jest swoista i pozwala na wykrycie kwasu salicylowego w mieszaninie fenoli, krezoli i saligeniny.

## 6.2. Kwas acetylosalicylowy



**Kwas acetylosalicylowy (aspiryna, polopiryna)** (Ryc. 6.1) posiada wygląd białych, krystalicznych igieł lub blaszek, bez zapachu, o silnie kwaśnym smaku. Trudno rozpuszcza się w wodzie, natomiast łatwo w etanolu i eterze. Roztwór wodny barwi papierek uniwersalny na kolor czerwony.



Niesteroidowy lek przeciwbólowy, przeciwzkrzepowy, przeciwzapalny, przeciwgorączkowy.



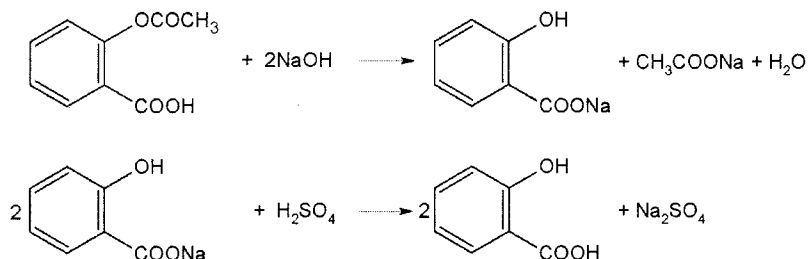
Wywołuje pobudzenie czynności układu oddechowego, zaburza czynności nerek, powoduje sinicę, wymioty, zawroty głowy, senność, zaburzenia koordynacji, czasem zgon.



Salicylany (doustnie): 25-35 g.

### 6.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i kwasem siarkowym (VI)

Substancję gotować przez 2-3 minuty z 10% roztworem NaOH. Ostudzić, następnie dodać w nadmiarze 10% roztwór  $H_2SO_4$ . W obecności kwasu acetylosalicylowego wytrąca się biały krystaliczny osad kwasu salicylowego. Powstały osad kwasu salicylowego rozpuścić w wodzie i otrzymany roztwór użyć do wykonania reakcji charakterystycznych dla tego związku (patrz rozdział 6.1).



### 6.2.2. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Do 0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu  $FeCl_3$ . Wymieszać. Pojawienie się fioletowego zabarwienia świadczy o obecności kwasu acetylosalicylowego.

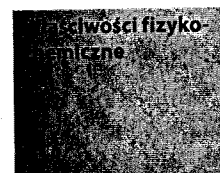
### 6.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu wody bromowej. Pojawienie się białego osadu tribromofenolu z równoczesnym wydzieleniem ditlenku węgla wskazuje na obecność kwasu acetylosalicylowego.

### 6.2.4. Reakcja z chlorkiem żelaza (III), octanem ołowiu (II) i siarczanem (VI) miedzi (II)

Kwas acetylosalicylowy zmieszać z wodą i małą ilością węglanu wapnia aż do zakończenia wydzielania ditlenku węgla. Przesącz barwi się z chlorkiem żelaza (III) na kolor jasnobrunatny, z octanem ołowiu (II) daje biały osad, a z siarczanem (VI) miedzi (II) osad niebieskozielony.

## 6.3. Fenacetyna



**Fenacetyna** (Ryc. 6.1) – biała, krystaliczna substancja, łatwo rozpuszczająca się w eterze, chloroformie, gorącym etanolu i wodzie, natomiast słabo w zimnym etanolu i wodzie. Stanowi składnik wielu, często stosowanych mieszanek przeciwbólowych, takich jak: Antineuralgie, Bromidon i Cofedon. Głównym produktem przemian chemicznych fenacetyny jest paracetamol – jeden z najpowszechniej stosowanych składników w lekach przeciwbólowych.



Lek przeciwbólowy, przeciwgorączkowy, przeciwzapalny.



Zastosowanie dużej dawki fenacetyny powoduje niedotlenienie organizmu spowodowane zwiększonym tworzeniem methemoglobiny. Konsekwencją wpływu fenacetyny na procesy oksydoredukcyjne krwinek jest sinica i hemoliza krwinek.



Fenacetyna (doustnie): 15-70 g; paracetamol (doustnie): 15 g.

### 6.3.1. Reakcja z kwasem chromowym (VI)

0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut z 3 cm<sup>3</sup> stężonego HCl. Dodać 5-10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i ostudzić. Następnie dodać kilka kropli 3% roztworu kwasu chromowego (VI). Pojawienie się rubinowoczerwonego zabarwienia wskazuje na obecność fenacetyny w badanej próbce. Reakcja ta polega na hydrolizie fenacetyny do *p*-fenatydyny.

### 6.3.2. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Do 1 cm<sup>3</sup> badanej próby dodać 2 cm<sup>3</sup> 10% roztworu  $HNO_3$ . Ogrzewać w łaźni wodnej do momentu pojawienia się żółtego zabarwienia (tworzy się nitrofenacetyna), świadczącego o obecności fenacetyny. Przy dużych jej stężeniach wydzielają się żółte igły nitrofenacetyny o temperaturze topnienia wynoszącej 103 °C.

### 6.3.3. Reakcja estryfikacji

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 2 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 cm<sup>3</sup> etanolu. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku występowania fenacetyny w badanym materiale wydziela się charakterystyczny zapach estru etylooctowego.

### 6.3.4. Reakcja indofenolowa

Badaną substancję ogrzewać z 1 cm<sup>3</sup> 2% roztworu NaOH. Ostudzić. Następnie dodać kilka kropli stężonego HCl oraz kilka kryształków chloraminy T. Odczekać 5 minut. Po tym czasie do mieszaniny dodać niewielką ilość eteru. Wyrząsać. Oddzieloną warstwę eterową nakropić na bibułę zwilżoną uprzednio roztworem fenolu. Na bibułę nanieść niewielką ilość amoniaku. W przypadku obecności fenacetyny bibuła zabarwia się na kolor niebieski.

W wyniku ogrzewania fenacetyny z wodorotlenkiem sodu tworzy się *p*-fenatydyna, która utleniona chloraminą T tworzy *p*-chinono-4-chloroiminę. Następnie poprzez reakcję z fenolem w środowisku amoniakalnym tworzy się indofenol.

### 6.3.5. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z β-naftolem

Część eterowego ekstraktu odparować do sucha. Pozostały osad przenieść do próbówki i dodać 10% roztwór HCl. Ogrzewać do wrzenia. Następnie oziębć w lodzie do temperatury 0 °C i dodać kroplami 1% roztwór NaNO<sub>2</sub> do momentu, gdy zwilżony nim papierek jodoskrobiowy zabarwi się na niebiesko wskutek wydzielenia jodu w nadmiarze HNO<sub>3</sub>. Wówczas do roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> zasadowego roztworu β-naftolu (0,5 g β-naftolu w 1 cm<sup>3</sup> 15% roztworze NaOH + 9 cm<sup>3</sup> wody). W przypadku obecności fenacetyny powstaje czerwone zabarwienie lub czerwony osad.

### 6.3.6. Reakcja z wodorotlenkiem potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 5 cm<sup>3</sup> 1 M roztworu KOH. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności fenacetyny wydziela się zapach aniliny. Jeżeli otrzymaną mieszaninę ogrzewa się z kilkoma kroplami chloroformu – wydzieli się nieprzyjemny zapach izonitrylu. W celu usunięcia zapachu izonitrylu można dodać do próby rozcieńczony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i ogrzewać do wrzenia.

## 6.4. Fenazon

### Właściwości fizykochemiczne

**Fenazon (antypiryna)** (Ryc. 6.1) tworzy bezbarwne kryształy w kształcie tabletek. Posiada bardzo słaby zapach i słabo gorzki smak. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, etanolu, chloroformie, natomiast trudniej w eterze.

### Działanie farmakologiczne

Lek przeciwbólowy, przeciwzapalny i przeciwgorączkowy. Stosowany jest często w leczeniu chorób reumatycznych (zapalenie i zwyrodnienie stawów, choroba artretyczna) oraz zapaleń skórno-mięśniowych. Działanie fenazonu polega na aktywowaniu skurczu mięśni gładkich naczyń oskrzeli i tchawicy, rozkurczaniu tętnic, zahamowaniu agregacji płytek krwi oraz obniżeniu progu pobudliwości receptorów bólowych.

### Działanie szkodliwe

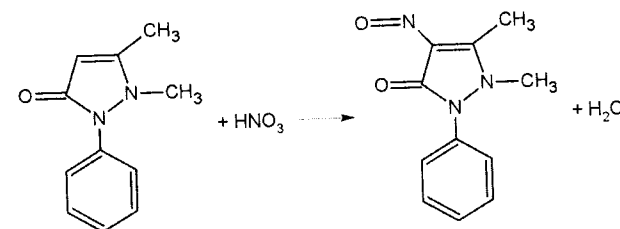
Zwiększone dawkowanie tego leku może prowadzić do chemicznej karce-nogenezy.

### 6.4.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Odrobinę badanego osadu rozpuścić w 0,2 cm<sup>3</sup> wody i dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 1% roztworu FeCl<sub>3</sub>. Wymieszać. Pojawianie krwistoczerwonego zabarwienia przechodzącego po dodaniu kilku kropli 10% roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w jasnożółte świadczy o obecności fenazonu.

### 6.4.2. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Niedużą ilość badanego osadu przenieść do próbówki i dodać kilka kropli 10% roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Następnie dodać 3-4 krople 3,5% roztworu NaNO<sub>2</sub> i wymieszać. Próba zabarwia się na kolor zielony (nitrozoantypiryna) w przypadku występowania fenazonu.



### 6.4.3. Reakcja z taniną

Do badanego osadu dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu taniny i wymieszać. Obfity biały osad wskazuje na obecność fenazonu.



#### 6.4.4. Reakcja z odczynnikiem Millona

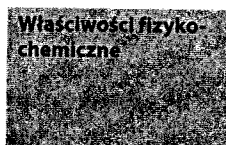
Odrobinę badanego osadu rozpuścić w 0,4 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i dodać 2-3 krople odczynnika Millona. Wymieszać. Pojawienie się białego osadu świadczy o obecności fenazonu, w odróżnieniu od aminofenazonu, który tej reakcji nie daje.

**ODCZYNNIK MILLONA:** 14 g rtęci metalicznej rozpuścić w 14 cm<sup>3</sup> stężonego HNO<sub>3</sub> i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

#### 6.4.5. Reakcja z kwasem pikrynowym

Do niedużej ilości badanego osadu dodać 2-3 krople roztworu kwasu pikrynowego. Powstanie żółtego krystalicznego osadu o temperaturze topnienia 187 °C wskazuje na obecność fenazonu (pikrynian antypiryny).

### 6.5. Aminofenazon



**Aminofenazon (piramidon)** (Ryc. 6.1) to białe kryształki bez zapachu, o gorzkim smaku. Aminofenazon dobrze rozpuszcza się w alkoholu etylowym, chloroformie, eterze i wodzie. Roztwór wodny charakteryzuje się odczynem słabo alkalicznym. W odróżnieniu od fenazonu, aminofenazon działa silnie redukująco.



Lek przeciwgorączkowy, przeciwbólowy.



Aminofenazon ulega biotransformacji w związki odpowiadające za toksyczne działanie leku. Wywołuje agranulocytozę, uszkodzenie szpiku oraz groźne reakcje uczuleniowe, wyzwała aktywne rodniki metylowe, które mogą wiązać się z zasadami purynowymi i pirymidynowymi w kwasach nukleinowych, zaburzając proces biosyntezy białek i stwarzając ryzyko choroby nowotworowej.

#### 6.5.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Odrobinę osadu rozpuścić w 0,5 cm<sup>3</sup> wody i do otrzymanego roztworu dodać niewielką ilość 1% roztworu FeCl<sub>3</sub>. W przypadku obecności aminofenazonu pojawia się czerwone zabarwienie (przy większej ilości odczynnika – fioletowe), znikające pod wpływem nadmiaru odczynnika.

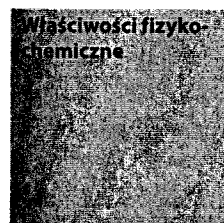
#### 6.5.2. Reakcja z azotanem (V) srebra

Odrobinę osadu rozpuścić w niewielkiej ilości wody i dodać rozcieńczonego roztworu AgNO<sub>3</sub>. Zaobserwować tworzenie się zabarwienia fioletowego i po pewnym czasie wydzielenie się czarnego metalicznego osadu.

#### 6.5.3. Odróżnienie fenazonu od aminofenazonu

Do badanego roztworu dodać roztwór NaNO<sub>2</sub> i zakwasić rozcieńczonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. W przypadku obecności aminofenazonu powstaje zabarwienie fioletowe, znikające po dodaniu nadmiaru odczynnika (zachodzi utlenienie na skutek redukujących właściwości aminofenazonu). Natomiast, gdy po zniknięciu barwy fioletowej pojawi się zabarwienie zielone, świadczy to o obecności fenazonu.

### 6.6. Barbiturany



**Barbiturany** (Ryc. 6.2) – pochodne kwasu barbiturowego, który jest cyklicznym ureidem powstającym w wyniku kondensacji kwasu malonowego z mocznikiem. Tworzą białe, krystaliczne proszki bez smaku i zapachu. Trudno rozpuszczają się w wodzie zimnej, natomiast nieco lepiej w gorącej. Są to związki łatwo rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych: eterze, alkoholu etylowym i chloroformie. Do barbituranów zaliczamy: cyklobarbitol (fanodorm), fenobarbital (luminal), metylofenylobarbitol (prominal), allobarbitol (dial), heksobarbital (evipan), barbital (veronal).



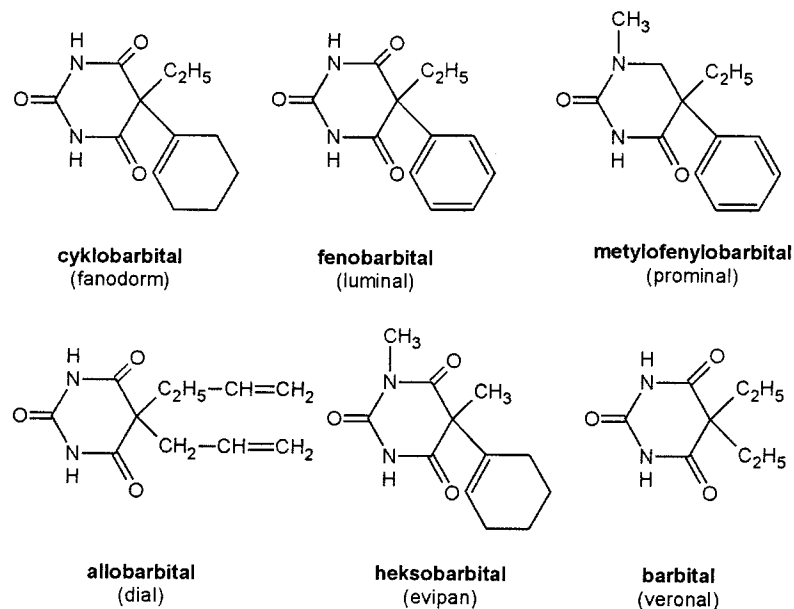
Barbiturany szybko wchłaniają się przez błony śluzowe przewodu pokarmowego. W krwiobiegu występują w krwinkach czerwonych, w postaci wolnej lub związanej z białkami. Posiadają działanie nasenne, uspokajające i znieczulające. Są składnikiem wielu środków przeciwbólowych.



Długotrwałe stosowanie barbituranów prowadzi do silnego uzależnienia (działanie narkotyczne), zaburzeń psychicznych, zaburzeń czynności układu autonomicznego, śpiączki, podrażnień skórnych, uszkodzeń narządów miąższowych, porażenia ośrodka oddechowego i naczyniowo-ruchowego, a nawet wstrząsu.



Cyklobarbitol (doustnie): 2-20 g; fenobarbital (doustnie): 1,5-5 g; metylofenylobarbitol (doustnie): 2 g; allobarbitol (doustnie): 2 g; heksobarbital (doustnie): 2 g; barbital (doustnie): 2-4 g.



Ryc. 6.2. Wzory strukturalne barbituranów.

Reakcje barwne na identyfikację wybranych barbituranów zostały przedstawione w tabeli 6.1.

Tabela 6.1. Reakcje barwne wybranych barbituranów.

Barbituran	odczynnik Marquisa		odczynnik Meckiego		p-dimetylobenzaldehyd	
	na zimno	po ogrzaniu	na zimno	po ogrzaniu	na zimno	po ogrzaniu
Allobarbitał	pomarańczowy	pomarańczowy	pomarańczowo-czerwony	jasnobrunatny	-	wiśniowo-brunatny
Cyklobarbitał	brunatno-czerwony	fioletowo-brunatny	czerwony	brunatno-czerwony	-	brązowo-brunatny
Fenobarbitał	zielono-brunatny	ciemnozielony	-	-	-	-
Heksobarbitał	-	jasnobrunatny	ciemnoczerwony	ciemnobrunatny	-	brązowo-brunatny
Metylofenylobarbitał	oliwkowo-zielony	ciemnozielony	-	-	-	-

**Odczynnik Marquisa:** 0,2 cm<sup>3</sup> 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
**Odczynnik Meckiego:** 50 mg kwasu selenowego (IV) rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.6.1. Reakcja hydrolizy do amoniaku

Barbiturany z podstawionymi atomami wodoru przy grupie -CH<sub>2</sub>, ulegają hydrolizie do mocznika pod wpływem KOH.

Do niewielkiej ilości badanego osadu dodać 0,3 cm<sup>3</sup> 5% roztworu KOH i podgrzać. Zapach amoniaku lub zabarwienie się na niebiesko zwilżonego papierka lakmusowego świadczy o obecności barbituranów.

### 6.6.2. Reakcja tiocyjaniowa

Barbiturany stapiane z siarką dają jon tiocyjaniowy, który w środowisku kwaśnym przechodzi w kwas tiocyjaniowy.

Niewielką ilość badanego osadu umieścić w probówce i dodać 0,03-0,04 g siarki. Otwór probówki przykryć krążkiem bibuły zwilżonym kroplą 5% roztworu FeCl<sub>3</sub>. Podczas ogrzewania bibuła barwi się na krwistoczerwono, wskazując na obecność barbituranów.

### 6.6.3. Reakcja Zwickera

Niewielką ilość substancji rozpuścić w mieszaninie chloroformu i piperydyny (9:1) i dodać 1 cm<sup>3</sup> 1% roztworu Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Pod wpływem obecnych barbituranów warstwa chloroformowa barwi się na fioletowo.

### 6.6.4. Reakcja z odczynnikiem Millona

Do 0,5 cm<sup>3</sup> zakwaszonego HCl badanego roztworu dodać kilka kropli odczynnika Millona. Powstanie galaretowatego osadu, rozpuszczalnego w nadmiarze odczynnika świadczy o obecności barbituranów.

**ODCZYNNIK MILLONA:** 14 g rtęci metalicznej rozpuścić w 14 cm<sup>3</sup> stężonego HNO<sub>3</sub> i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

### 6.6.5. Reakcja z chlorkiem sodu

Niewielką ilość substancji rozpuścić w małej objętości wody destylowanej. Przebrać do parowniczkę i dodać 30 cm<sup>3</sup> 1% roztworu NaCl w 3% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Odparować. Powstanie purpurowego zabarwienia wskazuje na występowanie barbituranów.

## 6.7. Meprobamat

### Właściwości fizykochemiczne

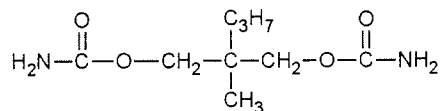
**Meprobamat** (Ryc. 6.3) – biały, drobnokrystaliczny proszek o gorzkim smaku. Dobrze rozpuszcza się w etanolu, chloroformie, natomiast trudno w eterze i wodzie.

### Działanie farmakologiczne

Stosowany w leczeniu stanów lękowych, które często towarzyszą poważnym schorzeniom psychiatrycznym, np. schizofrenii, depresji, psychozom. Jego działanie polega na zmniejszeniu napięcia mięśni szkieletowych poprzez oddziaływanie na interneurony rdzenia kręgowego. Wykazuje też aktywność uspokajającą i nasenną, ułatwiając fizjologiczne zasypianie. Stosowany jest tylko w kuracjach krótkoterminowych w małych dawkach.

### Działanie szkodliwe

Podawanie przez dłuższy czas może prowadzić do uzależnienia, zmniejszenia zdolności percepcji, aktywności ruchowej, zdolności myślenia i postrzegania.



Ryc. 6.3. Wzór strukturalny meprobamatu.

### 6.7.1. Reakcja z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem

Niewielką ilość substancji ogrzewać przez 15 minut we wrzącej łaźni wodnej z 3 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zawierającego 2,5% roztwór *p*-dimetyloaminobenzaldehydu. Oziębic. W przypadku obecności meprobamatu powstaje czerwono-fioletowe zabarwienie, które po rozcieńczeniu wodą zmienia się na niebieskofioletowe.

## 6.8. Kofeina

### Właściwości fizykochemiczne

**Kofeina** (Ryc. 6.4) tworzy kryształy w postaci białych, błyszczących igieł. Związek ten sublimuje w temperaturze 180 °C. Jest dobrze rozpuszczalny w chloroformie, etanolu, natomiast gorzej w eterze i benzenie. Bardzo słabo rozpuszcza się w wodzie.

### Działanie farmakologiczne

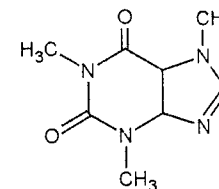
Kofeina posiada działanie stymulujące ośrodkowy układ nerwowy oraz działa spazmolityczne na mięśnie gładkie, szczególnie oskrzeli, powoduje zwiększoną kurczliwość włókien mięśniowych mięśnia sercowego, nasila diurezę oraz wykazuje aktywność pobudzającą pracę umysłową i czynności psychiczne. Lecznicze dawki kofeiny pobudzają ośrodek oddechowy, naczyniowo-ruchowy, ośrodek przemiany materii (nasilenie glikolizy i lipolizy) oraz ośrodek termoregulacji (podwyższenie temperatury ciała), znoszą uczucie senności i znużenia. Kofeina często wchodzi w skład preparatów stosowanych w leczeniu bólu głowy. Podwyższenie dawki kofeiny może zmniejszyć zdolność koncentracji oraz spowodować długotrwałą bezsenność.

### Działanie szkodliwe

Wywołuje pobudzenie psychiczne i ruchowe, porażenie układu oddechowego (zatrucia ostre); nudności, ból głowy, biegunkę, bezsenność, drżenie rąk, niemiarowość bicia serca, częstomocz, wzmożoną potliwość, wymioty, owrzodzenie żołądka (zatrucia przewlekłe). Powoduje uzależnienie.

### Dawka śmiertelna człowieka

10-12 g kofeiny (doustnie).



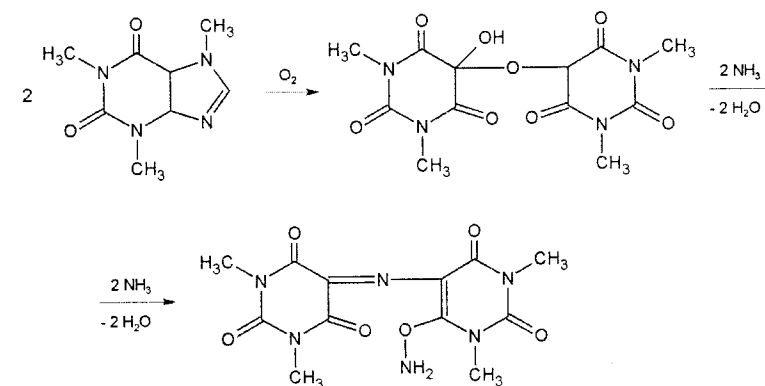
Ryc. 6.4. Wzór strukturalny kofeiny.

### 6.8.1. Próba mureksydowa

Badaną substancję umieścić w parownicze i dodać 10 kropli 3% roztworu wody utlenionej oraz 1-2 krople HCl. Całość odparować do sucha w łaźni wodnej i ostrożnie zwilżyć odrobiną amoniaku. Powstaje purpurowe zabarwienie. Reakcja mureksydowa jest charakterystyczna dla wszystkich związków purynowych.

### 6.8.2. Reakcja z taniną

Roztwór taniny wytrąca z wodnych roztworów kofeiny obfity, biały osad rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika.



### 6.8.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera

Do niedużej ilości badanego osadu dodać 2 cm<sup>3</sup> odczynnika Nesslera. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności kofeiny tworzy się obfity, czerwono-brunatny osad.

**ODCZYNNIK NESSLERA:** 6 g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> ciepłej wody i dodać 50 cm<sup>3</sup> 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm<sup>3</sup>, dodać 60 cm<sup>3</sup> 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslera.**

## 6.9. Chloropromazyna

**Właściwości fizykochemiczne**

**Chloropromazyna** (Ryc. 6.5) – biały proszek bez zapachu o słodkim smaku, przechodzący w gorzki. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, chloroformie, etanolu i metanolu. Jest nierozpuszczalna w eterze.

**Działanie farmakologiczne**

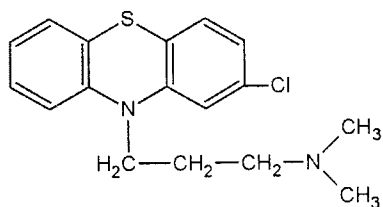
Lek psychotropowy o działaniu uspokajającym oraz wpływającym na nastroj, stosowany w leczeniu poważnych schorzeń psychiatrycznych głównie schizofrenii i psychoz maniakalno-dypresyjnych, przebiegających z objawami silnego pobudzenia i agresji. Wykazuje również właściwości przeciwymiotne i przeciwhistaminowe, zwiększa aktywność innych leków o działaniu uspokajającym.

**Działanie szkodliwe**

Wywołuje uzależnienie i poważne schorzenia neurologiczne.

**Dawka śmiertelna dla człowieka**

1-10 g chloropromazyny (doustnie).



Ryc. 6.5. Wzór strukturalny chloropromazyny.

### 6.9.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI)

Chloropromazyna ze stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> daje ciemniejące karminowe zabarwienie.

### 6.9.2. Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Odczynnik Marquisa z chloropromazyną barwi się na karminowo.

**ODCZYNNIK MARQUISA:** 0,2 cm<sup>3</sup> 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.9.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego

Odczynnik Fröhdego z chloropromazyną barwi się na kolor karminowy.

**ODCZYNNIK FRÖHDEGO:** 50 mg kwasu molibdenowego (II) lub molibdianu (VI) amonu rozpuścić na gorąco w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.9.4. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Chloropromazyna w reakcji ze stężonym HNO<sub>3</sub> daje zabarwienie czerwone, przechodzące w żółte.

### 6.9.5. Reakcja z wodą bromową

Woda bromowa, podobnie jak inne środki utleniające, daje z chloropromazyną czerwoną barwę.

## 6.10. Weratryna

**Właściwości fizykochemiczne**

**Weratryna** jest mieszaniną kilku alkaloidów typu *Veratrum*, które posiadają zmodyfikowany rdzeń C-nor-D-homo-cholestanu. Alkaloidy te mogą występować w postaci alkanów, związków estrowych lub glikozydowych. Alkaloidy *Veratrum* o rdzeniu C-nor-D-homo-cholestanu można podzielić na grupę *jerveratrum* z 1-4 atomami tlenu i *ceveratrum* – z 7-8 atomami tlenu, do której należy m.in. weratryna, weratramina, jerwina. Dostępna jest w postaci białego proszku, dobrze rozpuszczającego się w alkoholach, chloroformie i eterze.

**Działanie farmakologiczne**

Silnie drażni błony śluzowe pobudzając do kichania oraz wykazuje właściwości insektobójcze (składnik w preparatach przeciwko wszawicy).

### 6.10.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI)

Stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> barwi weratrynę na żółto. Po ogrzaniu barwa pogłębia się w pomarańczowoczerwoną z zieloną fluorescencją.

### 6.10.2. Reakcja z odczynnikiem Meckiego

Odczynnik Meckiego reaguje z weratryną, dając zabarwienie żółte, przechodzące szybko w brunatne, a następnie zielone i w końcu fioletowe.

**ODCZYNNIK MECKIEGO:** 50 mg kwasu selenowego (IV) rozpuścić w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.10.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego

Weratryna z odczynnikiem Fröhdego barwi się na kolor czerwono-fioletowy.

**ODCZYNNIK FRÖHDEGO:** 50 mg kwasu molibdenowego (II) lub molibdenianu (VI) amonu rozpuścić na gorąco w 10 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 6.10.4. Reakcja z kwasem solnym

Weratryna ogrzewana ze stężonym HCl daje czerwono-żółte, trwałe zabarwienie.

### 6.10.5. Reakcja z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem

Weratryna ogrzewana z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem daje żółtozielone zabarwienie, przechodzące w oliwkowe, a następnie w fioletowe.

## 6.11. Wykrywanie nietlotnych substancji toksycznych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Jedną z metod rozdziału mieszanin biologicznych oraz identyfikacji ich składników jest chromatografia cienkowarstwowa. Podstawą tej techniki analitycznej, powszechnie stosowanej w analizie toksykologicznej, jest rozdzielanie substancji różniących się szybkością ich migracji na cienkich warstwach adsorbentu, nośnika lub jonowymieniacza, uformowanych na płytkach szklanych lub innych materiałach. Dużą zaletą chromatografii cienkowarstwowej jest dobry rozdział mieszanin, duża czułość metody, uzyskanie dobrego konturu plam o małym zniekształceniu, niski stopień dyfuzji co ogranicza wielkość plam i znacznie zwiększa wykrywalność, krótki czas rozwijania chromatogramu, co jest istotne podczas identyfikacji trucizn w materiale biologicznym, gdy szybki wynik decyduje o zdrowiu

lub życiu pacjenta oraz możliwość stosowania drastycznych odczynników, np. wywoływaczy. Chromatografia cienkowarstwowa po rozdziale składników mieszaniny umożliwia również dokonanie ilościowej analizy badanej substancji. W tym celu zdrapuje się fragment masy sorpcyjnej i wymywa się ją odpowiednimi rozpuszczalnikami. Przed oznaczeniem, uzyskaną w ten sposób próbkę należy odwirować aby usunąć zawiesinę adsorbentu, który mógłby przeszkodzić w zajściu reakcji barwnej i dokonaniu właściwego pomiaru. Oznaczanie końcowe prowadzi się najczęściej metodami fotokolorymetrycznymi, spektrofotometrycznymi lub chromatografii gazowej. Można również porównywać powierzchnię plam i intensywność zabarwienia z wzorcami.

### 6.11.1. Chromatografia cienkowarstwowa – podstawy teoretyczne

1. **Zasada oznaczania.** Sposób wyodrębniania i oczyszczania badanego roztworu, który będzie naniesiony na płytkę chromatograficzną w celu identyfikacji trucizn jest taki sam jak podano dla klasycznej metody Stass-Otto (patrz rozdział 4.4). Identyfikację substancji w ekstrakcie dokonuje się w oparciu o wartość  $R_f$ , która określa różnice w szybkości migracji poszczególnych substancji. Współczynnik  $R_f$  wyraża się następującym wzorem:

$$R_f = \frac{\text{odległość od miejsca startu do środka plamy}}{\text{odległość od miejsca startu do czoła fazy rozwijającej}}$$

Wartości współczynnika  $R_f$  uzależnione są od charakteru nośnika (adsorbentu) i jego czystości, temperatury, pH, składników towarzyszących, stanu nasycenia komory chromatograficznej parami rozpuszczalnika, czasu rozwijania i drogi przepływu rozpuszczalników, rodzaju rozpuszczalnika i jego właściwości fizykochemicznych, chemicznego rodzaju rozdzielanych substancji. Wartość współczynnika  $R_f$  jest wielkością stałą i charakterystyczną dla poszczególnej substancji oczywiście przy zachowaniu stałych warunków doświadczenia i systemu rozpuszczalników.

2. **Nanoszenie wzorców i ekstraktów.** Przed rozpoczęciem nanoszenia, na gotowej płytce, np. firmy Merck zaznacza się (ołówkiem lub rylcem) linię startu, najczęściej w odległości 15-20 mm od brzegu, linię końcową (odległą od linii startu o około 10 cm) oraz punkty na które będzie się nanosiło odparowany ekstrakt i wzorce. Roztwory wzorcowe w ilości 0,02 cm<sup>3</sup> nanosi się za pomocą mikropipety. Odparowane do sucha wyciągi z badanego materiału rozpuszcza się w możliwie jak najmniejszej ilości etanolu i nanosi w całości za pomocą rurek kapilarnych. Średnica nanoszonych plamek powinna być możliwie mała (0,5-1 cm). Należy pamiętać aby na chromatogramie podpisać zawartość plamek, najlepiej po spodniej stro-

nie płytki. Po dokładnym wysuszeniu, płytki wkłada się do komory chromatograficznej.

- Przygotowanie komory chromatograficznej.** Do wnętrza komory chromatograficznej wkłada się szalkę Petriego, do której wlewa się warstwę odpowiedniego rozpuszczalnika na wysokość około 0,5 cm. W celu należytego wysycenia komory wzdłuż jej wewnętrznej ściany umieszcza się walec bibuły wysokości 11 cm i zwilża rozpuszczalnikiem. Komorę należy szczelnie zamknąć i pozostawić na około 30 minut. Komorę nie należy pozostawiać w miejscach nasłonecznionych i przewiewnych, aby zapobiec wyparowaniu lotnych rozpuszczalników i wydłużeniu rozwijania chromatogramu.
- Rozwijanie i wywoływanie chromatogramów.** Po włożeniu płytek do komory chromatograficznej następuje wędrówka substancji na chromatogramie – rozwinięcie chromatogramu. Po dojściu czoła rozpuszczalników do linii końca, płytkę wyjmuje się z komory, suszy się w temperaturze pokojowej do zaniku zapachu rozpuszczalnika. W przypadku stosowania rozpuszczalnika z dietyloaminą konieczne jest suszenie w temperaturze 110 °C przez około 1 godzinę. Następnie chromatogramy spryskuje się właściwym odczynnikiem wywołującym, który uwidacznia plamy poprzez utworzenie barwnych połączeń z badanymi substancjami. Zasadą jest, że przed i po użyciu wywoływacza płytki ogląda się w świetle nadfioletowym, bowiem szereg związków absorbuje promienie UV. Identyfikacji poszukiwanych substancji dokonuje się poprzez porównanie z substancją wzorcową opierając się na wartościach  $R_f$  i zabarwieniu plamek.

Chromatogramy po wywołaniu plam i identyfikacji badanych substancji mogą być utrwalone poprzez ich zanurzenie w 4% roztworze kolodium z dodatkiem glicerolu lub spryskując zawiesiną tworzywa, tzw. Neatanem (polipropionian winylu, pH=6,8-7). Po wysuszeniu można ściągnąć ostrożnie warstwę chromatograficzną (po krótkim zanurzeniu płytki w wodzie) i przechowywać w miejscach bez dostępu światła.

### 6.11.2. Wykrywanie środków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych

25 cm<sup>3</sup> moczu zalkalizować 10% NaOH do pH=10 i 2-krotnie wyekstrahować za pomocą 30 cm<sup>3</sup> gorącego chloroformu. Połączone wyciągi odparować do sucha, a uzyskaną pozostałość rozpuścić w jak najmniejszej objętości alkoholu etylowego. Ekstrakt nanieść na płytki. Identyfikacji środków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych należy dokonać porównując wartości  $R_f$  i zabarwienie plam według tabeli 6.2.

#### ODCZYNNIKI:

- układ rozpuszczalników: aceton – cykloheksan (w stosunku 15:12),
- wywoływacz: 2 g FeCl<sub>3</sub> i 100 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> rozpuścić na gorąco w 20 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Odczynnik należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Tabela 6.2. Wartości  $R_f$  i barwy plam dla leków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych.

Substancja	$R_f$	Barwa plamy
Kwas acetylosalicylowy	0,05	fioletowe
Fenazon	0,18	brunatne
Aminofenazon	0,39	ciemnoniebieskie
Fenacetyna	0,49	jasnoniebieskie

### 6.11.3. Wykrywanie barbituranów

25 cm<sup>3</sup> moczu zakwaszyć 1 M HCl do pH=3-4 i 2-krotnie ekstrahować za pomocą 30 cm<sup>3</sup> eteru. Połączone wyciągi eterowe odparować do sucha i rozpuścić w jak najmniejszej ilości etanolu. Przygotowany ekstrakt nanieść na płytki.

#### ODCZYNNIKI:

- układ rozpuszczalników: chloroform – izopropanol – stężony NH<sub>4</sub>OH (45:45:10).
- wywoływacz:
  - roztwór I: 5 g HgO zawiesić w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i dodać stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzupełnić wodą do 250 cm<sup>3</sup>;
  - roztwór II: 25 g difenylkarbazonu (II) rozpuścić w 250 cm<sup>3</sup> chloroformu. Roztwór przechowywać w ciemnym, szklanym naczyniu.

Po wyjęciu i wysuszeniu, chromatogram należy spryskać roztworem I, pod wpływem którego powstają białe plamy. Wilgotną jeszcze płytkę spryskać następnie roztworem II – plamy barbituranów przyjmują zabarwienie fioletowe. Identyfikację poszczególnych barbituranów przeprowadzić na podstawie wartości  $R_f$  podanych w tabeli 6.3.

Tabela 6.3. Wartości  $R_f$  dla barbituranów.

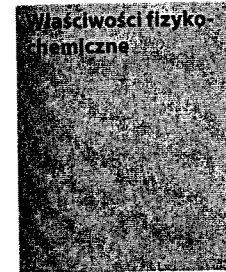
Barbiturany	$R_f$
Luminal (fenobarbital)	0,40
Weronal (barbital)	0,46
Prominal (metylofenylbarbital)	0,58
Narkozan (heksobarbital, ewipan)	0,65
Fanodorm (cyklobarbital)	0,72

## 7.1. Antymon

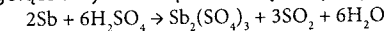
# 7 IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN METALICZNYCH

Najczęściej spotykane zatrucia spowodowane są związkami metali, takich jak: ołów, kadm, rtęć, arsen, bar, tal, antymon, miedź czy bizmut. W analizie toksykologicznej oznaczanie trucizn metalicznych możemy sprowadzić do następujących etapów: 1) mineralizacji materiału biologicznego oraz 2) identyfikacji i oznaczeń ilościowych.

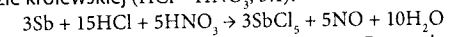
Po mineralizacji materiału biologicznego (patrz rozdział 4.5) przystępuje się do jakościowej i ilościowej analizy trucizn metalicznych za pomocą odpowiednich metod. W analizie toksykologicznej stosuje się tzw. odczynniki grupowe, reagujące z dużą liczbą pierwiastków, w przeciwieństwie do specyficznych – reagujących tylko z jednym pierwiastkiem. Zazwyczaj w pierwszym etapie analizy, gdy nie wiadomo jaki metal spowodował zatrucie, stosuje się odczynniki grupowe, a następnie mieszaninę powstałych połączeń poddaje się rozdzielowi techniką chromatografii cieczowej lub cienkowarstwowej. Przy interpretacji uzyskanych wyników należy zapoznać się z wartościami fizjologicznymi i dopuszczalnymi stężeniami biologicznymi oznaczanych metali, które są niezbędnymi składnikami ustroju, np. Fe, Cu, Zn, Mn, Cr, Se.



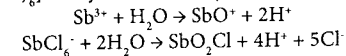
**Antymon** jest błyszczącym srebrzystobiałym metalem. Na powietrzu powoli utlenia się. Na gorąco antymon rozpuszcza się w stężonym  $H_2SO_4$ :



oraz w wodzie królewskiej (HCl – HNO<sub>3</sub>, 3:1):



Tlenki antymonu wykazują charakter amfoteryczny. Do trudno rozpuszczalnych związków antymonu należą:  $Sb_2S_3$ ,  $Sb_2S_5$ ,  $H_3SbO_4$ ,  $H[Sb(OH)_6]$ ,  $Ag_3SbO_3$ ,  $Ag_3SbO_4$ ,  $Na[Sb(OH)_6]$ . Wszystkie sole antymonu ulegają hydrolizie:



Antymon do organizmu człowieka może dostać się z pożywieniem i wdychanym powietrzem. Toksyczność tego pierwiastka rośnie wraz ze stopniem utlenienia. Związki antymonu wykazują podobne działanie, lecz mniejszą toksyczność do związków arsenu. Główne dolegliwości związane z zatruciem antymonem związane są z zaburzeniami trawienia, oddychania, osłabieniem, bólami głowy. Antymon działa toksycznie na ośrodkowy układ nerwowy i krew. Drażni błonę śluzową, powoduje zapalenie spojówek i skóry, uszkodza mięsień sercowy i wątrobę.



Objawy toksycznego działania antymonu u roślin to: zahamowanie wzrostu, więdnienie liści, zmiana zabarwienia, uszkodzenie systemu korzeniowego oraz zaburzenia w gospodarce mineralnej.

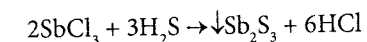


NDS: 0,5 mg/m<sup>3</sup> NDSCh: 1,5 mg/m<sup>3</sup> (antymon i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na Sb).

LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 525 mg/kg dla  $SbCl_3$ ; LD (i.p., szczury): 100 mgSb/100g dla  $Sb_2S_3$ ; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): >20g/kg dla  $Sb_2O_3$ .

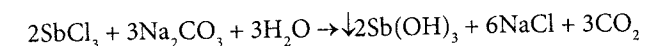
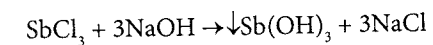
## 7.1.1. Reakcja z siarkowodorem

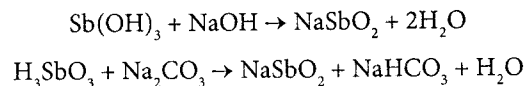
Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu zakwaszonego HCl dodać 0,5 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej. Wytrącający się bezpostaciowy, jasnopomarańczowy osad świadczy o obecności antymonu.



## 7.1.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> 10% roztworu NaOH lub 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Wodorotlenki sodu lub potasu, amoniak, alkaliczne węglany działając na sole antymonu, powodują strącanie się białego wodorotlenku antymonu, który łatwo rozpuszcza się w nadmiarze roztworu ługu, a trudniej w nadmiarze węglanów.

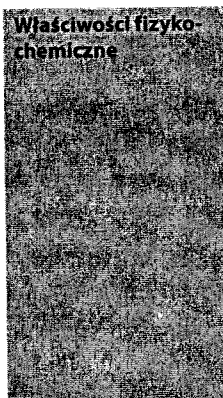




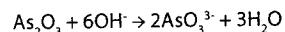
### 7.1.3. Reakcja z tiosiarczanem

1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu zobojętnić roztworem NaHCO<sub>3</sub> wobec papierka lakmusowego. Następnie kroplami dodawać roztwór tiosiarczanu sodu (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), ogrzewać do wrzenia. Wytrącający się czerwony osad składa się z Sb<sub>2</sub>S<sub>3</sub> i Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

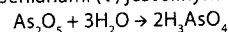
## 7.2. Arsen



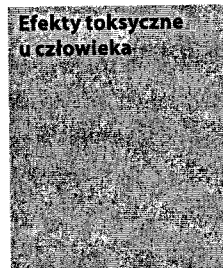
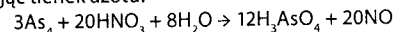
**Arsen** i jego związki należą do jednych z najbardziej trujących substancji. Na powietrzu spala się niebieskim płomieniem tworząc tritlenek arsenu (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Tlenki arsenu (III) i (V) posiadają amfoteryczny charakter. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (arszenik) jest trudno rozpuszczalny w wodzie, natomiast dobrze rozpuszcza się w zasadach tworząc arseniany (III) (*meta*- i *orto*-), które wykazują właściwości silnych reduktorów.



As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> lotny na powietrzu dobrze rozpuszcza się w wodzie tworząc kwas arsenowy (V), który wraz z arsenianami (V) jest silnym utleniaczem.



Do trudno rozpuszczalnych soli należą: As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, As<sub>2</sub>S<sub>5</sub>, Ag<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>, Ag<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>, CuHAsO<sub>3</sub>, HgNH<sub>4</sub>AsO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>As(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>. Arsen nie rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach: HCl i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, natomiast dobrze rozpuszcza się w stężonym HNO<sub>3</sub>, wydzielając tlenek azotu:



Związki arsenu dostają się do organizmu drogą pokarmową, oddechową i przez skórę. Toksyczność arsenu polega na blokowaniu aktywności wielu enzymów NAD-zależnych, np. cyklu Krebsa. Ostre zatrucia arsenem powodują uszkodzenia procesów metabolicznych wątroby (żółtaczka) i nerek, niedokrwistość, zaburzenia krążenia krwi (następstwem są nekrozy), zmiany skórne. Związki arsenu są karcenogenne i teratogenne, przyczyniają się głównie do powstania nowotworów układu oddechowego i skóry. Zatrucie As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (arszenik) prowadzi do zaburzeń układu nerwowego, niedokrwistości, uszkodzeń błon śluzowych układu oddechowego, naczyń krwionośnych oraz oczu. Skutkiem zażycia arseniku jest najczęściej śmierć.



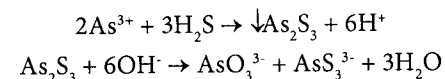
Objawy toksycznego działania arsenu u roślin to: zahamowanie wzrostu, więdnienie liści, zmiana zabarwienia, uszkodzenie systemu korzeniowego. Ponadto arsen powoduje w tkankach roślinnych spadek zawartości fosforu, potasu, wapnia i manganu.



NDS: 0,01 mg/m<sup>3</sup> (arsen i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na As). LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 14,6 mg/kg dla As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; LD<sub>50</sub> (i.p., szczury): 14-18 mg As/kg dla Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Działa rakotwórczo (kategoria I).  
**Doustna dawka śmiertelna arseniku dla człowieka wynosi 70-300 mg.**

### 7.2.1. Reakcja z siarkowodorem

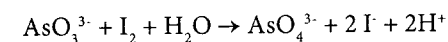
Do 2 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej, ogrzewając wytrącić osad żółtego siarczku arsenu (III). Powstający siarczek arsenu (III) rozpuścić w gorącym roztworze KOH lub NaOH:



Reakcja polega na tworzeniu trisiarczku arsenu nierozpuszczalnego w gorącym HCl (odróżnienie od siarczku antymonu i cyny).

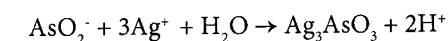
### 7.2.2. Reakcja z jodem

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1-3 krople roztworu jodu. Następuje zmiana barwy z brunatnej na lekko słomkową, co wskazuje na obecności jonów arsenu w roztworze.



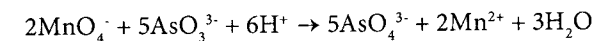
### 7.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra

Do 1 cm<sup>3</sup> zakwaszonego HNO<sub>3</sub> badanego roztworu dodać 3 krople 1% roztworu AgNO<sub>3</sub>. Po wymieszaniu ostrożnie wlewać po ściance probówki amoniak. Na granicy płynów tworzy się żółty pierścień arsenianu (III) srebra, który łatwo rozpuszcza się w HNO<sub>3</sub> i amoniaku.



### 7.2.4. Reakcja z nadmanganianem (VII) potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> zakwaszonego HNO<sub>3</sub> badanego roztworu dodać kroplę 5% roztworu KMnO<sub>4</sub>. Odbarwienie roztworu wskazuje na obecność arsenianu.

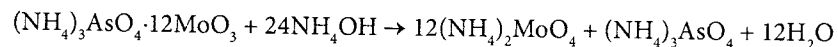
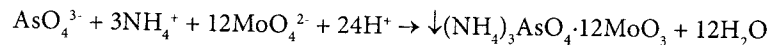


Arseniany w środowisku kwaśnym redukują jon Mn<sup>7+</sup> do Mn<sup>2+</sup>, który tworzy bezbarwne sole.

### 7.2.5. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu

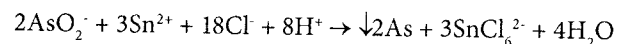
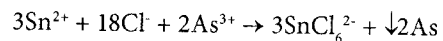
Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu zakwaszonego HNO<sub>3</sub> dodać 1-3 krople nasyconego roztworu molibdenianu (VI) amonu. Powstający żółty krystaliczny osad rozpuszczalny w amoniaku świadczy o obecności arsenianu w analizowanym materiale.





### 7.2.6. Reakcja Bettendorffa

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać SnCl<sub>2</sub> w stężonym HCl. Początkowo roztwór zabarwia się na brunatno, z którego po kilku minutach wytrąca się czarny osad metalicznego arsenu.



## 7.3. Bar



**Bar** jest to srebrzystobiały metal. Sole trudno rozpuszczalne baru to: siarczan (VI) baru, węglan (VI) baru, chromian (VI) baru, natomiast łatwo rozpuszczalne: chlorek baru, octan baru i azotan (V) baru. Wodorotlenek baru rozpuszcza się w wodzie tworząc tzw. wodę barytową, która jest mocną zasadą.



Silnymi truciznami są sole baru łatwo rozpuszczalne w wodzie (np. Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>), natomiast trudno rozpuszczalne (np. BaSO<sub>4</sub>) nie są szkodliwe. Bar w organizmie człowieka powoduje niedowład mięśni (zwłaszcza kończyn górnych i szyi), trudności w oddychaniu oraz działa hamująco na mineralizację kości.



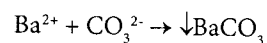
Prawdopodobnie powoduje zaburzenia we wzroście i metabolizmie roślin.



NDS: 0,5 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 1,5 mg/m<sup>3</sup> (bar i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na Ba).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 355 mg/kg dla Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 118 mg/kg dla BaCl<sub>2</sub>.

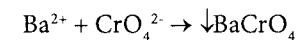
### 7.3.1. Reakcja z rozpuszczalnymi węglanami

Do 1 cm<sup>3</sup> roztworu dodać 5 kropli 10% roztworu NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>. Jony węglanowe wytrącają z obojętnego lub zasadowego roztworu, zawierającego jony baru biały osad węglanu barowego, który dobrze rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach mineralnych oraz kwasie octowym.



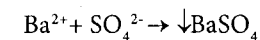
### 7.3.2. Reakcje z chromianem (VI) lub dichromianem (VI) potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> obojętnego lub zakwaszonego kwasem octowym badanego roztworu dodawać po kropli 0,05 M roztwór K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Wytrącenie się żółtego osadu chromianu (VI) baru rozpuszczalnego w kilku kroplach stężonego HCl świadczy o obecności baru. Osad nie rozpuszcza się w kwasie octowym.



### 7.3.3. Reakcja z rozpuszczalnymi siarczanami

Do 3 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodawać po kropli rozcieńczony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Wytrącający się natychmiast biały drobnokrystaliczny osad siarczanu (VI) baru wskazuje na występowanie baru w analizowanym materiale.



## 7.4. Bizmut



**Bizmut** jest kruchym metalem, o różowosrebrzystym połysku. Nie ulega zmianie na powietrzu. Dobrze rozpuszcza się w HNO<sub>3</sub> i gorącym stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Bizmut łatwo wiąże się z grupami sulfhydrylowymi białek, co powoduje zaburzenie w ich funkcji i przemianach metabolicznych. Toksyczne działanie bizmutu na organizm człowieka przejawia się szkodliwym wpływem na układ nerwowy. Dzięki działaniu bakteriobójczemu, jony bizmutu są wykorzystywane w preparatach kosmetycznych i farmaceutycznych, np. środkach stosowanych w leczeniu infekcji przewodu pokarmowego.



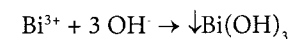
Wykazuje działanie toksyczne zbliżone do ołowiu. Powoduje głównie zaburzenia procesu fotosyntezy, podziału komórek oraz gospodarki wodnej. Toksyczność związków bizmutu objawia się więdnieniem i ciemnozielonym zabarwieniem liści oraz skróceniem wzrostu korzeni.



NDS: brak danych.  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 5000 mg/kg dla Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

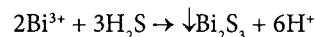
### 7.4.1. Reakcja wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 2-3 krople 10% roztworu NaOH. Powstaje galaretowaty, biały osad, który po ogrzaniu przechodzi w żółty osad wodorotlenku bizmutu (III).



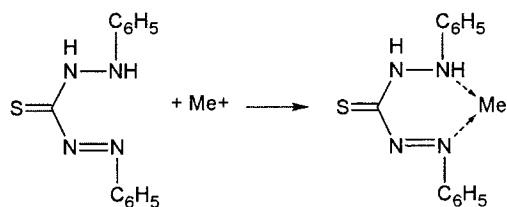
### 7.4.2. Reakcja z siarkowodorem

Do 3 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej. Wytrąca się ciemnobrunatny osad siarczku bizmutu, który dobrze rozpuszcza się w gorących stężonych kwasach mineralnych.



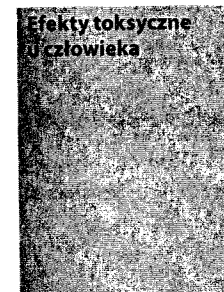
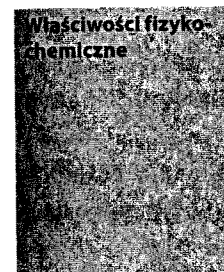
### 7.4.3. Reakcja z ditizonem

**Ditizon** (difenylotiokarbazon) jest pochodną tiomocznika. Ma postać drobnokrystalicznego, czarnego proszku z niebieskawym odcieniem. Nie rozpuszcza się w wodzie i rozcieńczonych kwasach, natomiast jest rozpuszczalny w amoniaku i roztworach alkalicznych, z brunatnym zabarwieniem. Bardzo dobrze rozpuszcza się w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych (chloroform, tetrachlorek węgla, benzen, trichloroetylen) dając intensywne zielone zabarwienie. Ditizon reaguje z większością metali ciężkich, których siarczki są trudno rozpuszczalne w wodzie (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pd, Ag, Cd, Sn, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, Po), tworząc chelaty wewnętrzne. W przypadku ołowiu ditizon tworzy kompleks o zabarwieniu czerwonym. Reakcja ditizonu z metalami zachodzi przy odpowiednim pH roztworu. W roztworze kwaśnym (pH=4,5-5) reagują: Zn, Fe, Ni, natomiast w alkalicznym (pH=8,5-9): Pb, Cd, Co, Mn, Tl. Barwne kompleksy ditizonianów można oznaczać spektrofotometrycznie.



Do 2 cm<sup>3</sup> chloroformowego roztworu ditizonu dodać zakwaszony roztwór soli bizmutu i wytrząsać. Zielone zabarwienie ditizonu przechodzi w żółtopomarańczowe.

## 7.5. Chrom



**Chrom** jest metalem szarym, trwałym na powietrzu i w wodzie. Dobrze rozpuszcza się w następujących kwasach: solnym, 70% kwasie chlorowym (VII) i rozcieńczonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tworzy tlenki: CrO, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i nadtlenek CrO<sub>5</sub>. Sole chromu ze względu na łatwość tworzenia uwodnionych kompleksów, posiadają charakterystyczne barwy, np. chlorek chromu i siarczan chromu są zielone, Cr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> – jest fioletowy. Związki chromu łatwo ulegają hydrolyzie i utlenieniu do chromianów w środowisku alkalicznym (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), które z kolei ulegają redukcji do związków chromowych pod wpływem H<sub>2</sub>S, HI, SO<sub>2</sub>, HBr. Wodorotlenek chromu (II) ma charakter zasadowy, zaś wodorotlenek chromu (III) – amfoteryczny.

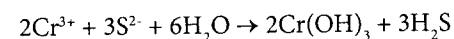
Związki chromu uszkadzają układ oddechowy, przewód pokarmowy, wywołują zmiany skórne, wykazują działanie rakotwórcze, mutagenne embriotoksyczne i teratogenne. Chrom wykazuje powinowactwo do wielu enzymów, hamując lub pobudzając katalizowane przez nie reakcje. Chrom trójwartościowy łatwo tworzy trwałe połączenia z DNA, co prowadzi do jego uszkodzenia i w efekcie przyczynia się do rozwoju nowotworów złośliwych. Trójwartościowy chrom łącząc się dobrze z białkami, powoduje ich wytrącanie co jest widoczne w szkodliwym działaniu chromu na skórę i błony śluzowe. Zatrucie związkami chromu objawia się silnymi bólami brzucha, ciężkim uszkodzeniem nerek, owrzodzeniem przewodu pokarmowego, błon śluzowych górnych dróg oddechowych oraz skóry.

Objawy toksyczności u roślin to: zaburzenia gospodarki wodnej (więdnięcie roślin), chloroza młodych liści i uszkodzenia stożków wzrostu.

NDS: 0,5 mg/m<sup>3</sup> (chrom i jego związki (III) w przeliczeniu na Cr). NDS: 0,1 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 0,3 mg/m<sup>3</sup> (chromiany).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, królik): 3250 mg/kg dla Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 1790 mg/kg dla CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 10000 mg/kg dla Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, królik): 80 mg/kg dla CrO<sub>3</sub>.

### 7.5.1. Reakcja z siarczkiem sodu

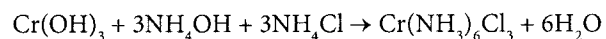
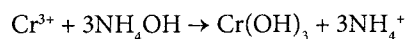
Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać kilka kropli roztworu siarczku sodu. Wytrącający się szarozielony lub szarofioletowy osad rozpuszczalny w nadmiarze NaOH lub w amoniaku świadczy o obecności chromu.



### 7.5.2. Reakcja z amoniakiem

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 3 krople NH<sub>4</sub>Cl i następnie powoli amoniak do momentu powstania czerwonego roztworu utworzonego w wyniku rozpuszczenia się osadu zabarwionego na kolor szarozielony.

Reakcja ta polega na wytrącaniu wodorotlenku chromu (III) i rozpuszczeniu go w nadmiarze amoniaku w obecności soli amonowych z utworzeniem czerwonej soli zespolonej:

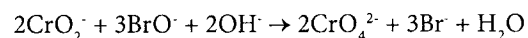
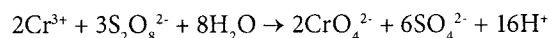


### 7.5.3. Reakcja z nadtlenkiem wodoru

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać kilka kropli 3% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, następnie zakwasić rozcieńczonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i ostrożnie dolać 1-2 cm<sup>3</sup> eteru. Powstający CrO<sub>5</sub> przechodzi do warstwy eterowej barwiąc ją na niebiesko.

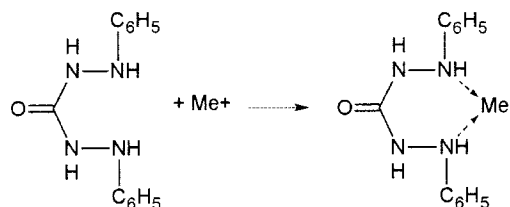
### 7.5.4. Reakcja z difenylokarbazydem (I)

Związki chromu w środowisku kwaśnym reagują z difenylokarbazydem (I), dając fioletowy kompleks. Aby ta reakcja zaszła, należy najpierw utlenić Cr<sup>3+</sup> do Cr<sup>6+</sup> za pomocą peroksydisiarczanów (VI) w środowisku kwaśnym lub bromianu (I) sodu w alkalicznym:



W zależności od środowiska utlenienia chromu (VI) reakcję z difenylokarbazydem (I) wykonuje się dwojako:

- w środowisku kwaśnym** – do kropli badanego roztworu dodać kroplę nasyconego roztworu peroksydisiarczanu (VI) potasu oraz kroplę 2% roztworu AgNO<sub>3</sub>. Po upływie 2-3 minut dodać kroplę 1% etanolowego roztworu difenylokarbazydu (I). Pojawienie się zabarwienia od fioletowego do czerwonego wskazuje na obecność chromu. Wykrywalność tej metody wynosi: 0,8 μg chromu.
- w środowisku zasadowym** – do kropli obojętnego lub słabo zasadowego roztworu badanego dodać 1-2 krople bromianu (I) sodu. Po 1 minucie dodać kroplę stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1-2 krople 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego, a następnie kroplę nasyconego roztworu difenylokarbazydu (I). Pojawienie się fioletowej barwy świadczy o obecności chromu.



### 7.5.5. Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości związków chromu w ściekach

Jony chromu (VI) reagują z difenylokarbazydem (I) w środowisku słabo kwaśnym dając związek o czerwono-fioletowym zabarwieniu (patrz rozdział 7.5.4). Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia chromu. W oznaczaniu chromu mogą przeszkodzić związki żelaza o stężeniu powyżej 1 mg/dm<sup>3</sup>, dając żółte zabarwienie. W podobny sposób reaguje wanad, lecz jego zabarwienie znika po 10 minutach od rozpoczęcia reakcji z difenylokarbazydem (I). Natomiast związki rtęci dają barwę niebieską lub niebieskofioletową, która przy odczynie kwaśnym jest bardzo słaba.

Podana metoda oznaczania chromu służy do określenia całkowitej zawartości nieorganicznych związków chromu (III) i (IV), obecnych w oczyszczonym ścieku, łącznie z ewentualnymi pozostałościami zawiesiny wodorotlenku chromu.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,04% etanolowy roztwór difenylokarbazydu (I),
- 0,5 M roztwór H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cz.d.a.,
- peroksydisiarczan (VI) sodu (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), stały,
- podstawowy roztwór K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> o stężeniu 0,10 mg Cr<sup>6+</sup>/cm<sup>3</sup>,
- roboczy roztwór K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> o stężeniu 0,001 mg Cr<sup>6+</sup>/cm<sup>3</sup> (roztwór przygotować na świeżo przed oznaczeniem),
- bufory o pH=4,01 i pH=6,98,
- spektrofotometr UV-VIS, pH-metr, pipety, zlewki, kolby miarowe, łaźnia wodna.

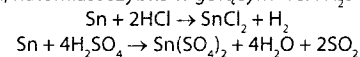
Do zlewki o pojemności 100 cm<sup>3</sup> odmierzyć 50 cm<sup>3</sup> próbki ścieków bytowych pobranych znad osadu. Dodać taką ilość 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aby otrzymać pH roztworu wynoszące 1,5. Następnie dodać 0,2 g peroksydisiarczanu (VI) sodu w celu utlenienia chromu do Cr<sup>6+</sup>. Tak przygotowany roztwór ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze 80 °C przez 20 minut. Po ochłodzeniu przygotowany roztwór przenieść do kolby miarowej o objętości 50 cm<sup>3</sup> i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie dodać 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu difenylokarbazydu (I) i wymieszać. Analogicznie wykonać próbę ślepa, używając zamiast ścieku wodę destylowaną. Próby (badaną i ślepa) odstawić na 10 minut. Po tym czasie odczytać wartość absorbancji przy długości fali λ=540 nm wobec próby ślepej.

**Wykres wzorcowy:** do szeregu kolb miarowych o pojemności 50 cm<sup>3</sup> odmierzyć następujące objętości roboczego wzorcowego roztworu K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>: 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 cm<sup>3</sup> i dopełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie dodać po 2,5 cm<sup>3</sup> roztworu difenylokarbazydu (I), wymieszać i zmierzyć wartość absorbancji przy długości fali λ=540 nm. Wykreślić krzywą wzorcową. Na podstawie krzywej wzorcowej odczytać zawartość chromu w próbce badanej.

## 7.6. Cyna



**Cyna** jest srebrzystobiałym metalem, odpornym na działanie powietrza. Występuje w odmianach alotropowych. Rozpuszcza się powoli w rozcieńczonym, zimnym HCl, natomiast szybko w gorącym HCl i H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:



Nieorganiczne związki cyny zaburzają biosyntezę hemu oraz powodują niedokrwistość i zmiany w tkance kostnej. Najbardziej toksycznymi związkami cyny są jej związki organiczne – szczególnie związki alkilowe, a ich szkodliwy wpływ wzrasta z ilością grup metylowych. Organiczne związki cyny hamują procesy oddychania (oksydacyjną fosforylację w mitochondriach) oraz uszkadzają mitochondria. Działają toksycznie na układ nerwowy, grasicę, wątrobę i drogi żółciowe. Ostre zatrucia cyną objawiają się zaburzeniami widzenia, utratą świadomości, bólami głowy, zmianami skórными, podrażnieniami spojówek oraz zaburzeniami czucia.



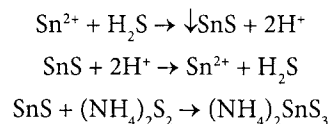
Toksyczne działanie związków cyny na rośliny objawia się zahamowaniem podziałów komórkowych i wzrostu.



NDS: 2 mg/m<sup>3</sup> (cyna i jej związki nieorganiczne w przeliczeniu na Sn, dymy i pyły).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 700 mg/kg dla SnCl<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 377 mg/kg dla SnF<sub>2</sub>.

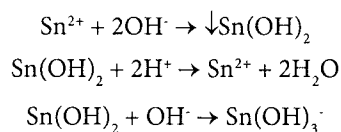
### 7.6.1. Reakcja z siarkowodorem

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu zakwaszonego HCl dodać 0,5 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej. O obecności cyny świadczy powstanie brązowego osadu dobrze rozpuszczalnego na gorąco w stężonym HCl i polisiarczku amonowym.



### 7.6.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

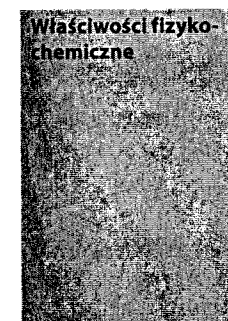
Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu NaOH lub KOH. Powstający biały osad Sn(OH)<sub>2</sub> wskazuje na obecność cyny w analizowanej próbce. Wodorotlenek cyny (II) jest amfoteryczny z przewagą właściwości zasadowych, rozpuszcza się zarówno w kwasie, jak i w nadmiarze wodorotlenku.



### 7.6.3. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu

Do kilku kropli roztworu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, zakwaszonego stężonym HNO<sub>3</sub>, dodać w nadmiarze roztwór molibdenianu (VI) amonu – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. Wytrąca się żółty osad (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>, do którego należy dodać 0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu. W przypadku obecności soli cynawej w roztworze pojawia się niebieskie zabarwienie.

## 7.7. Miedź



**Miedź** jest metalem o żółtoczerwonym zabarwieniu. Po srebrze jest najlepszym przewodnikiem prądu elektrycznego i ciepła. Pod wpływem wilgoci i CO<sub>2</sub> pokrywa się warstwą zasadowych węglanów o zabarwieniu zielonym (patyna). Jony Cu<sup>+</sup> są nietrwałe. W roztworach wodnych mogą występować jedynie w kompleksach: CuC<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Cu(CN)<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>. Jony Cu<sup>2+</sup> wykazują w roztworze wodnym charakterystyczne błękitne zabarwienie, którego intensywność wzrasta ze stężeniem. Zjawisko to wynika z hydratacji Cu<sup>2+</sup> i powstania Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub><sup>2+</sup>. Sole miedzi (II) dobrze rozpuszczalne w wodzie to: siarczan (VI) miedzi (II), azotan (VI) miedzi (II), chlorek miedzi (II). Trudno rozpuszczalnymi związkami są m.in.: siarczek miedzi (II), tlenek miedzi (II), wodorotlenek miedzi (II), węglan miedzi (II), heksacyjanożelazian (II) miedzi (II) i fosforan (V) miedzi (II).



Duża ilość miedzi wchłoniętej do organizmu powoduje zmiany w wątrobie, zaburzenia w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego, zmniejszenie stężenia hemoglobiny, uszkodzenie nerek, płuc, naczyń wieńcowych i tkanki mózgowej. Śmierć może nastąpić w wyniku zatrzymania czynności serca, porażenia oddechu, hipotermii, sinicy. Nadmiar miedzi w pożywieniu jest szczególnie niebezpieczny dla organizmów młodych. Miedź wykazuje dużą toksyczność przy bezpośrednim oddziaływaniu na komórki, zwłaszcza w ich wczesnym stadium rozwoju, co może być spowodowane wpływem tego metalu na zmiany w strukturze i funkcjonowaniu białek.



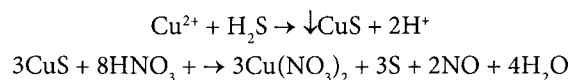
Toksyczne działanie miedzi na rośliny objawia się zahamowaniem wzrostu roślin, uszkodzeniem komórek korzenia, zaburzeniami w przepuszczalności błon komórkowych, zahamowaniem procesu fotosyntezy.



NDS: 0,1-1 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 0,3-2 mg/m<sup>3</sup> (miedź i jej związki w przeliczeniu na Cu).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 140 mg/kg dla CuCl; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 470 mg/kg dla Cu<sub>2</sub>O; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 584 mg/kg dla CuCl<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 300 mg/kg dla CuSO<sub>4</sub>; **LD<sub>50</sub> (doustnie, człowiek): 50 mg/kg dla CuSO<sub>4</sub>.**

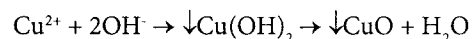
### 7.7.1. Reakcja z siarkowodorem

Do 5 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego jony miedzi (II) dodawać kroplami wodę siarkowodorową do chwili wytrącenia czarnego osadu, który rozpuszcza się, po odsączeniu, w 1 cm<sup>3</sup> gorącego rozcieńczonego HNO<sub>3</sub>.



### 7.7.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

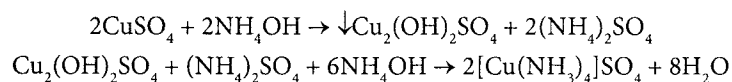
Do 5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać kilka kropli 10% roztworu NaOH. Powstaje niebieski osad Cu(OH)<sub>2</sub>, który w trakcie gotowania przechodzi w ciemnoszary osad tlenku miedzi CuO.



Gdy w roztworze obok jonów miedzi (II) znajdują się kwasy organiczne (np. kwas winowy, kwas cytrynowy) osad nie powstanie na wskutek tworzenia się rozpuszczalnych związków zespolonych o błękitnym zabarwieniu.

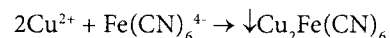
### 7.7.3. Reakcja z amoniakiem

Do 3 cm<sup>3</sup> roztworu badanego dodać 1-3 krople rozcieńczonego roztworu amoniaku. W przypadku obecności miedzi tworzy się jasnoniebieski osad, który łatwo rozpuszcza się w nadmiarze amoniaku, pogłębiając zabarwienie do ciemnoniebieskiego od powstałej soli zespolonej – [Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]SO<sub>4</sub>.



### 7.7.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu

Do 5 cm<sup>3</sup> roztworu dodać 1-3 krople 10% roztworu heksacyjanożelazianu (II) potasu. Powstaje czerwono-brunatny osad, który można rozpuścić w 1 cm<sup>3</sup> amoniaku, uzyskując w ten sposób intensywną ciemnoniebieską barwę.



### 7.7.5. Reakcja z ditizonem

Do 3 cm<sup>3</sup> ditizonu (patrz rozdział 7.4.3) w tetrachloroku węgla dodać zasadowy lub kwaśny roztwór zawierający jony miedzi Cu<sup>2+</sup> i wytrząsać przez 1 minutę. Zielona warstwa tetrachloroku węgla zmienia zabarwienie w zależności od środowiska

badanego roztworu na kolor czerwony lub fioletowy. Ditizon tworzy z solami miedzi w kwaśnym środowisku fioletowy, a w alkalicznym czerwony ditizonian miedzi.

### 7.7.6. Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biologicznym

Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biologicznym, np. surowicy krwi wykonuje się za pomocą wodnego roztworu dietyloditiokarbaminianu sodu (Na-DDTK) (patrz rozdział 7.10). Miedź łączy się z Na-DDTK poprzez 2 atomy siarki, tworząc chelat z 4-członowymi pierścieniami o żółtej barwie. Kompleks ten jest rozpuszczalny w różnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: alkohol izoamylowy, tetrachlorek węgla, chloroform, co wykorzystuje się w ekstrakcyjnym wariacie metody.

#### ODCZYNNIKI:

1. roztwór wzorcowy miedzi, zawierający 5 μg Cu/cm<sup>3</sup>: rozpuścić 393 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O w kilkudziesięciu cm<sup>3</sup> wody destylowanej, dodać 1 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i uzupełnić wodą do 1000 cm<sup>3</sup>,
2. stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
3. 60% roztwór HClO<sub>4</sub>,
4. stężony roztwór amoniaku,
5. nasycone roztwory cytrynianu sodu i difosforanu (V) sodu,
6. 0,1% roztwór Na-DDTK zalkalizowany amoniakiem do pH=8.

Badany materiał biologiczny odważyć i zmineralizować za pomocą 0,5 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w kolbce Kjeldahla w łaźni piaskowej. Po uzyskaniu brunatnej, oleistej cieczy dodać 2-3 krople 60% roztworu HClO<sub>4</sub> i ogrzewać do całkowitego odbarwienia się. Po oziębieniu roztworu bardzo powoli i ostrożnie dodać 2 cm<sup>3</sup> stężonego roztworu amoniaku i uzupełnić wodą do 3,5 cm<sup>3</sup>. Po wprowadzeniu 0,5 cm<sup>3</sup> roztworów cytrynianu sodu, difosforanu (V) sodu i Na-DDTK próby dokładnie wymieszać i odczytać po 5 minutach wartość absorbancji przy λ=430 nm wobec próby odnośnikowej (mineralizowanej i oznaczanej w analogiczny sposób jak próba badana, tylko zamiast odważki badanej substancji dodać 0,5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O).

**Wykres wzorcowy:** do probówek dodać kolejno po: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego (5 μg Cu/cm<sup>3</sup>) i uzupełnić wodą do 1 cm<sup>3</sup>. Po wprowadzeniu 0,5 cm<sup>3</sup> stężonego roztworu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 2 cm<sup>3</sup> stężonego roztworu amoniaku, dodać następnie po 0,5 cm<sup>3</sup> roztworów cytrynianu sodu, difosforanu (V) sodu i Na-DDTK, dokładnie wymieszać i oznaczyć wartość absorbancji wobec roztworu z pierwszej probówki (z wodą). Poszczególne wartości absorbancji odpowiadają 1, 2, 3, 4 i 5 μg Cu.

## 7.8. Ołów

### Właściwości fizykochemiczne

Ołów jest pierwiastkiem metalicznym, miękkim, o zabarwieniu niebieskawoszarym. Dobrze rozpuszcza się w  $\text{HNO}_3$  i kwasie octowym. Wodorotlenek ołowiu posiada właściwości amfoteryczne, a jego sole organiczne są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

### Efekty toksyczne u człowieka

Toksyczne działanie ołowiu polega na zaburzeniach układu krwiotwórczego, zahamowaniu syntezy hemu i hemoglobiny, skróceniu życia krwinek czerwonych i pobudzeniu erytropoezy, co w efekcie prowadzi do niedokrwistości. Uszkadza również układ nerwowy (obrzęk mózgu), nerki. Powoduje zaburzenia w pracy przewodu pokarmowego. Ołów może także powodować zaburzenia psychiczne, obniżenie zdolności poznawczych, pamięci i koncentracji. W zatruciach ostrych ołowiem obserwuje się spadek ciśnienia tętniczego krwi, zwolnienie czynności serca, obniżenie temperatury ciała. Zgon może nastąpić w ciągu kilkunastu godzin w wyniku nieodwracalnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym, podrażnienia ośrodka oddechowego i naczyniowo-ruchowego. Może być przyczyną ostrego zatrucia organizmu wskutek jednorazowego przyjęcia związku ołowiu lub gwałtownego zwiększenia tego pierwiastka w organizmie w wyniku uwolnienia go z depozytów tkankowych (głównie z kości). Szczególnie niebezpiecznym związkiem ołowiu jest tetraetylak ołowiu (środek przeciwstukowy w benzynie), który w sposób nieodwracalny uszkadza ośrodkowy układ nerwowy.

### Efekty toksyczne u roślin

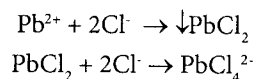
Powoduje zaburzenia procesu fotosyntezy, podziału komórek oraz gospodarki wodnej. Odkładanie się ołowiu w komórce roślinnej może prowadzić do zmian strukturalnych, spowodowanych uszkodzeniami plazmolemy. Dochodzi do zmniejszenia przepuszczalności dla wody, a w efekcie jej mniejsze pobieranie. Toksyczność związków ołowiu objawia się ciemnozielonym zabarwieniem i wędnięciem liści oraz skróceniem wzrostu korzeni.

### Wartości toksyczne

NDS: 0,05 mg/m<sup>3</sup> (w przeliczeniu na ołów).  
LD<sub>75</sub> (i.p. świnka morska): 290 mg/kg dla  $\text{PbSO}_4$ ; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 4665 mg/kg dla  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; LD<sub>0</sub> (doustnie, człowiek): **571 mg/kg dla  $\text{PbCO}_3$** .  
**PbNO<sub>3</sub>**, **PbO** tworzy z wodą roztwory i mieszaniny toksyczne dla organizmów wodnych. Ogólnie dla związków ołowiu działanie toksyczne na organizmy wodne obliczone jako wolny ołów wynosi: **bakterie**: *Pseudomonas putida* toksyczne > 1,8 mg/dm<sup>3</sup>; **glony**: *Scenedesmus quadricauda* toksyczne > 3,7 mg/dm<sup>3</sup>; **stawonogi**: *Daphnia magna* LC<sub>50</sub>: 2,5 mg/dm<sup>3</sup>; **ryby**: śmiertelne > 1,4 mg/dm<sup>3</sup>; *Salmo gairdnerii* LC<sub>50</sub>: 0,14 mg/dm<sup>3</sup>/96 h.

### 7.8.1. Reakcja z kwasem solnym

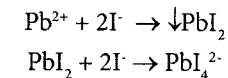
Do 1-1,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1-3 kropli rozcieńczonego HCl. Wytrącony osad rozpuścić poprzez ogrzanie próbki w łaźni wodnej do wrzenia. Po ostudzeniu wytrącają się białe igielki soli  $\text{PbCl}_2$ , rozpuszczalne w stężonym HCl tworząc zespolone połączenia  $\text{H}_2[\text{PbCl}_4]$ .



## 7.8. OŁÓW

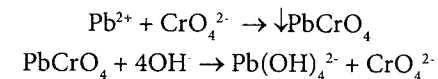
### 7.8.2. Reakcja z jodkiem potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> roztworu zawierającego jony ołowiu (II) dodawać kroplami 10% roztwór KI do uzyskania żółtego osadu jodku ołowiu, po czym próbkę ogrzewać do wrzenia w łaźni wodnej. Osad rozpuszcza się w nadmiarze odczynnika.



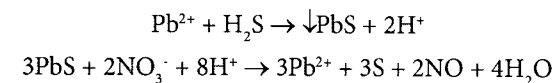
### 7.8.3. Reakcja z chromianem (VI) potasu

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać kilka kropli 0,05 M roztworu chromianu (VI) potasu. Powstaje żółty osad  $\text{PbCrO}_4$ , który jest rozpuszczalny w roztworze wodorotlenku sodu (odróżnienie od chromianu (VI) baru).



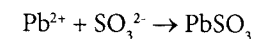
### 7.8.4. Reakcja z siarkowodorem

Do 1 cm<sup>3</sup> słabo kwaśnego badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej. Natychmiast tworzy się czarny osad siarczku ołowiu (reakcja pozytywna nawet przy rozcieńczeniu ołowiu w badanej próbce w stosunku 1:100000), który jest rozpuszczalny w gorącym, rozcieńczonym  $\text{HNO}_3$ .



### 7.8.5. Reakcja z siarczanem (IV) sodu

Zmieszać w próbce równe objętości roztworu badanego z 2% roztworem  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Powstanie białego osadu siarczanu (IV) ołowiu wskazuje na obecność ołowiu.

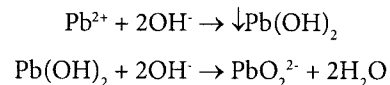


### 7.8.6. Reakcja z ditizonem

Kroplę badanego roztworu umieścić na szkiełku zegarkowym, dodać kroplę roztworu ditizonu (patrz rozdział 7.4.3). Zielone zabarwienie ditizonu przechodzi w ceglasczerwone w obecności ołowiu. Wykrywalność metody wynosi 0,04 μg ołowiu.

### 7.8.7. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 1 cm<sup>3</sup> 30% roztworu NaOH. Wodorotlenki metali alkalicznych strącają z roztworów soli ołowiu biały osad rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika.



## 7.9. Rtęć

**Właściwości fizykochemiczne**

Rtęć w warunkach normalnych jest jedynym metalem ciekłym. Posiada srebrzystobiałą barwę. Jest metalem odpornym na działanie składników powietrza. Najlepiej rozpuszcza się w rozcieńczonym (1:1) HNO<sub>3</sub> tworząc azotan (V) rtęci, który następnie dobrze rozpuszcza się w wodzie.

**Efekty toksyczne u człowieka**

Toksyczne działanie rtęci polega na zaburzeniu funkcji enzymów, procesów biosyntezy białka oraz zmianach w fosforowych wiązaniach DNA, co wiąże się z mutagennym i teratogennym wpływem na organizm. Wdychanie par rtęci lub zatrucie organicznymi związkami rtęci, np. dimetylem rtęci, prowadzi do zmian patologicznych układu nerwowego (często są to nieodwracalne uszkodzenia i obumieranie komórek mózgowych), przewodu pokarmowego (np. ostre zapalenie jelit), błon śluzowych górnych dróg oddechowych, płuc, wątroby i nerek. Zatrucie metylortęcią prowadzi do tzw. choroby Minamata, która objawia się ograniczaniem pola widzenia, zaburzeniami czucia, pogorszeniem mowy i słuchu, obniżeniem koordynacji ruchu oraz zaburzeniami umysłowymi. Zgon spowodowany związkami rtęci następuje w wyniku niewydolności oddechowej oraz ostrej niewydolności krążenia.

**Efekty toksyczne u roślin**

Szkodliwy wpływ rtęci na rośliny objawia się plamami chlorotycznymi, brunatnieniem brzegów blaszek liściowych, skróceniem i deformacją kielków i korzeni.

**Wartości toksyczne**

NDS: 0,025 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 0,2 mg/m<sup>3</sup> pary rtęci. NDS: 0,05 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 0,15 mg/m<sup>3</sup> (rtęć i jej związki nieorganiczne w przeliczeniu na Hg). NDS: 0,01 mg/m<sup>3</sup>; NDSCh: 0,03 mg/m<sup>3</sup> (rtęć i jej związki organiczne w przeliczeniu na Hg).  
LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 170 mg/kg dla Hg<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 1 mg/kg dla HgCl<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (naskórnice, królik): 41 mg/kg dla HgCl<sub>2</sub>; **LD<sub>01</sub> (doustnie, człowiek): 29 mg/kg dla HgCl<sub>2</sub>**; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 40,9 mg/kg dla Hg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (naskórnice, szczury): 570 mg/kg dla Hg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 57 mg/kg dla HgSO<sub>4</sub>; LD<sub>50</sub> (naskórnice, szczury): 625 mg/kg dla HgSO<sub>4</sub>; LD<sub>50</sub> (doustnie, szczury): 18 mg/kg dla HgO; LD<sub>50</sub> (naskórnice, szczury): 315 mg/kg dla HgO.

### 7.9.1. Reakcje z kwasem solnym i rozpuszczalnymi chlorkami

Do kilku cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodawać kroplami 10% roztwór HCl. Powstający biały osad po dodaniu 10% amoniaku przechodzi w czarny osad, co wskazuje na obecność rtęci.

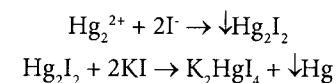


Jony Cl<sup>-</sup> wytrącają z roztworów zawierających jony Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup> biały osad chlorku rtęci (I), nierozpuszczalny w gorącej wodzie i zimnych rozcieńczonych kwasach. Chlorek rtęci (I) natomiast dobrze rozpuszcza się w wodzie królewskiej.

### 7.9.2. Reakcja z jodkiem potasu

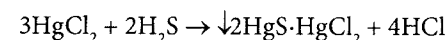
Do 2 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać kroplę 1% roztworu KI. W przypadku obecności rtęci (I) wytrąca się żółtawozielony osad.

Jony jodu wytrącają z roztworów zawierających jony Hg<sub>2</sub><sup>2+</sup> żółtawozielony osad jodku rtęci Hg<sub>2</sub>I<sub>2</sub>. Jest on rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika z wydzieleniem metalicznej rtęci oraz z utworzeniem bezbarwnego zespolonego jonu jodowortęciowego HgI<sub>4</sub><sup>2-</sup>:

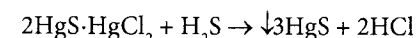


### 7.9.3. Reakcja z siarkowodorem

Do 5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 2 cm<sup>3</sup> wody siarkowodorowej. Wytrąca się biały przechodzący w żółtoczerwony, brunatny, a później czarny osad soli rtęci.

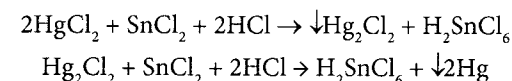


Czarny osad otrzymuje się poprzez działanie w nadmiarze siarkowodorem:



### 7.9.4. Reakcja z chlorkiem cyny (II)

Do kilku kropli badanego roztworu dodać kilka kropli świeżo przygotowanego roztworu SnCl<sub>2</sub> zakwaszonego roztworem HCl. Wydziela się osad Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a następnie rtęć metaliczna.

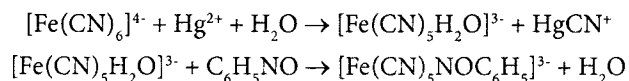


### 7.9.5. Reakcja z nitrobenzenem

Do 2 kropli roztworu nitrobenzenu dodać 2 krople badanego roztworu i kroplę 10% roztworu heksacyanożelazianu (II) potasu. W przypadku obecności w badanej próbce jonów rtęci powstaje fioletowe zabarwienie.



Reakcja ta polega na katalitycznym rozkładzie heksacyjanożelazianu (II) potasu przez jony rtęci  $\text{Hg}^{2+}$  w obecności nitrobenzenu. Powstaje fioletowe lub różowe zabarwienie powstałego w ten sposób pentacyjanonitrobenzenu.



### 7.9.6. Reakcja z difenylokarbazydem (I)

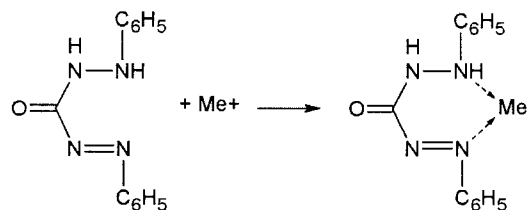
Do 5 cm<sup>3</sup> kwaśnego badanego roztworu dodać 2 cm<sup>3</sup> eterowego, chloroformowego lub siarczkowowęglowego roztworu difenylokarbazydu (I) (patrz rozdział 7.5.4), wytrząsać co najmniej przez 1 minutę. Niebieskofioletowe zabarwienie utrzymuje się w warstwie rozpuszczalnika, co wskazuje na obecność rtęci.

Difenylokarbazyd (I) i difenylokarbazon (II) są w kwaśnym środowisku selektywnymi odczynnikami na jony rtęciowe, z którymi tworzą związki o niebieskofioletowym zabarwieniu.

### 7.9.7. Reakcja z difenylokarbazonem (II)

Do 0,5 cm<sup>3</sup> badanego roztworu o odczynie kwaśnym dodać kilka kropli świeżo przygotowanego 1% etanolowego roztworu difenylokarbazonu (II). Pojawienie się fioletowego lub niebieskiego zabarwienia wskazuje na występowanie rtęci w badanym materiale. Wykrywalność tą metodą wynosi 0,1 μg rtęci.

Sole rtęci w kwaśnym środowisku tworzą z difenylokarbazonem (II) kompleksowe związki o zabarwieniu fioletowym, przechodzącym do niebieskiego.



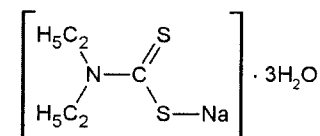
### 7.9.8. Reakcja z ditizonem

Do 1 cm<sup>3</sup> chloroformowego roztworu ditizonu (patrz rozdział 7.4.3) dodać kilka kropli kwaśnego roztworu soli rtęciowej. Zielone zabarwienie odczynnika przechodzi w żółtopomarańczowe. W słabo alkalicznym środowisku reakcji tworzy się druga forma ditizonianu rtęci o zabarwieniu purpurowoczerwonym. Rtcę re-

aguje z ditizonem tworząc wewnętrzno kompleksowe sole, których budowa i zabarwienie zależne są od pH środowiska.

## 7.10. Identyfikacja trucizn metalicznych za pomocą Na-DDTK

Dietyloditiokarbaminian sodu (Na-DDTK) jest białym krystalicznym związkiem organicznym, powszechnie wykorzystywanym w wykrywaniu trucizn metalicznych w analizie toksykologicznej. Łatwo reaguje z metalami, tworząc intensywnie zabarwione sole wewnętrzno kompleksowe. Dobrze rozpuszcza się w wodzie, a w mniejszym stopniu w alkoholu i chloroformie. W roztworze kwaśnym rozkłada się na dietyloaminę i disiarczek węgla.



Ryc. 7.1. Wzór strukturalny dietyloditiokarbaminianu sodu (Na-DDTK).

Czas, w ciągu którego połowa odczynnika ulega rozkładowi zależy od pH roztworu, np. przy pH=2 – 0,3 sekundy, pH=3 – 3 sekundy, pH=4 – 30 sekund, pH=5 – 4,9 minuty, pH=6 – 51 minut, pH=7 – 8,3 godziny, pH=8 – 3,5 dnia i pH=9 – 35 dni. Dlatego też w celu zapewnienia trwałości wodnym roztworom Na-DDTK, należy je lekko zalkalizować, a roztwory przechowywać w ciemnych, szczelnie zamkniętych butelkach.

Dietyloditiokarbaminian sodu tworzy połączenia kompleksowe z następującymi metalami: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Nb, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi, U dając barwne kłaczkowate osady (karbaminiany metali), które są trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast łatwo w niepolarnych rozpuszczalnikach.

Do 1 cm<sup>3</sup> badanego roztworu dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 0,5% wodnego roztworu Na-DDTK. Dobrze wymieszać. W przypadku obecności trucizny metalicznej w analizowanej próbce powstaje osad karbaminianu odpowiedniego metalu o charakterystycznej barwie. Barwę kompleksów metali z Na-DDTK przedstawia tabela 7.1.



Tabela 7.1. Identyfikacja metali za pomocą barwnych kompleksów karbaminianów metali.

Barwa osadu	Karbaminiany metali
biała	Zn, Cd, Hg, Nb, Ga, In, Tl, Sn, Pb, As
żółta	Ir, Pt, Cu, Ag, Sb, Se
pomarańczowa	V, U, Sn, Te
brunatnożółta	Co
zielonożółta	Ni
zielona	Co
niebieska	Cr
brunatna	Ru, Os, Au
intensywnie żółtobrunatna	Cu
intensywnie fioletowobrunatna	Mn
intensywnie fioletowa	Mo
brunatnoczarna	Fe

Powstawanie połączeń kompleksowych, ich ekstrakcja do fazy organicznej (w celu przeprowadzenia dalszych analiz ilościowych lub rozdział i ich identyfikacja za pomocą chromatografii cienkowarstwowej) zachodzi w określonym, optymalnym pH roztworu i odpowiednim rozpuszczalniku organicznym. Wartości pH, przy których przebiega ekstrakcja badanych metali do warstwy rozpuszczalnika przedstawia tabela 7.2.

Tabela 7.2. Ekstrakcja metali dietyloditiokarbaminianem sodu (Na-DDTK).

Metal	pH ekstrakcji	Faza organiczna
Ag	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
	pH=0-10	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
As	pH=0-8	CHCl <sub>3</sub>
Bi	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
Cd	pH=1-10	CCl <sub>4</sub>
	pH=1-10	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
Co (III)	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
Co (II)	pH=0-10	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
Cr	pH=6	CHCl <sub>3</sub>
Cu	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
	pH=0-10	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
Fe	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
	pH=0-5	CHCl <sub>3</sub>
Hg	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
	pH=0-10	CHCl <sub>3</sub>

Tabela 7.2. Ekstrakcja metali dietyloditiokarbaminianem sodu (Na-DDTK)

– ciąg dalszy.

Metal	pH ekstrakcji	Faza organiczna
Mn	pH=6-9	CCl <sub>4</sub>
	pH=5,2	CHCl <sub>3</sub>
	pH=1,7	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
Ni	pH=0-8	CHCl <sub>3</sub>
	pH=5-11	CCl <sub>4</sub>
Mo	słabo kwaśne	octan etylu
Pb	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
Pd	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
Pt	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
Sb	pH=4- 9,5	CCl <sub>4</sub>
	pH=0-7	CHCl <sub>3</sub> + aceton (5:2)
Se	pH=4-6,2	CCl <sub>4</sub>
Sn	pH=1-8	CHCl <sub>3</sub>
Te	pH=4-8,8	CCl <sub>4</sub>
	pH=9-12	CHCl <sub>3</sub>
Tl (I)	pH=9-12	CHCl <sub>3</sub>
	pH=5-13	CCl <sub>4</sub>
Tl (III)	pH=4-11	CCl <sub>4</sub> lub CHCl <sub>3</sub>
U	pH=1,5-3	butanol i inne rozpuszczalniki
V	pH=3-6	CCl <sub>4</sub> lub CHCl <sub>3</sub>
Zn	pH=4-11	CCl <sub>4</sub>
	pH=1-7	CHCl <sub>3</sub>

## 7.11. Wykrywanie trucizn metalicznych metodą chromatografii cienkowarstwowej

W przypadku wykonania rozdziału i identyfikacji metali za pomocą chromatografii cienkowarstwowej materiał biologiczny należy poddać wcześniej mineralizacji na mokro lub na sucho. Metale zawarte w mineralizacie wiążą się w barwne kompleksy z Na-DDTK (patrz rozdział 7.10). Ekstrakcji dokonuje się za pomocą chloroformu, a gotowe ekstrakty nanosi się na płytki chromatograficzne, rozwija i wybarwia (patrz rozdział 6.11.1).

**ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:**

- 0,5% wodny roztwór Na-DDTK,
- chloroform cz.d.a.,
- 3 M HCl,
- stężony HCl cz.d.a.,
- n*-heksan – octan etylu (10:1) cz.d.a.,
- n*-heptan cz.d.a.,
- aceton cz.d.a.,
- amoniak,
- acetyloaceton cz.d.a.,
- 5% wodny roztwór KI,
- siarczek sodu, roztwór 5%,
- żel krzemionkowy,
- pastę do uszczelniania komór – sporządzoną z glinki białej i gliceryny,
- roztwory podstawowe metali zawierające 10 mg metalu w 1 cm<sup>3</sup> roztworu, w tym celu należy odważyć odpowiednie ilości soli i rozpuścić w 80 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i następnie uzupełnić wodą do 100 cm<sup>3</sup>:

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	3,9 g
CdSO <sub>4</sub>	1,9 g
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	2,8 g
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,6 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,0 g

Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,0 g
Bi(OH) <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	1,5 g
HgCl <sub>2</sub>	1,4 g
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4,4 g
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>	2,5 g

- roztwory wzorcowe metali zawierające 1 mg metalu w 1 cm<sup>3</sup> roztworu uzyskuje się poprzez 10-krotne rozcieńczenie wodą roztworów podstawowych,
- zestaw chromatograficzny: komory, płytki, aparat do suszenia, rozpylacze, pipety lub kapilary do nanoszenia prób, bibuła.

**WYKONANIE:****1. Mineralizacja i ekstrakcja metali z moczu**

25 cm<sup>3</sup> moczu umieścić w kolbce Kjeldahla, dodać 0,5 g chloranu (V) potasu, przykryć lejkiem szklanym i ogrzewać powoli w łaźni wodnej dodając porcjami stężony HCl o łącznej objętości 5 cm<sup>3</sup>. Czas mineralizacji wynosi około 30 minut, a sam proces mineralizacji nie powinien zachodzić zbyt gwałtownie. Jego przebieg reguluje się intensywnością ogrzewania.

Powstały mineralizat należy ochłodzić i przenieść do rozdzielacza 10 cm<sup>3</sup> roztworu. Dodawać 3 M HCl do uzyskania pH~1, następnie dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu Na-DDTK i ekstrahować 5 cm<sup>3</sup> chloroformu. W warstwie chloroformowej powinny się znaleźć wszystkie metale z wyjątkiem manganu. Po oddzieleniu warstwy chloroformowej należy zmienić stężonym amoniakiem odczyn warstwy wodnej do pH=6-9, ponownie dodać 1 cm<sup>3</sup> Na-DDTK i 5 cm<sup>3</sup> chloroformu. Do warstwy chloroformowej powinien przejść mangan.

Wyciągi z kwaśnego roztworu nanieść na płytki i rozwijać w trzech układach rozpuszczalników (A, B, C), z kolei wyciąg z alkalicznego roztworu rozwija się wyłącznie w układzie B.

**2. Mineralizacja i ekstrakcja metali z krwi**

2,5 cm<sup>3</sup> krwi rozcieńczyć wodą destylowaną do 25 cm<sup>3</sup> i umieścić w kolbce Kjeldahla. Następnie wrzucić, uprzednio wymoczony w stężonym HCl, kawałek kaolinu i dodać 0,5 g chloranu (V) potasu. Dalej dodawać porcjami 5 cm<sup>3</sup> stężonego HCl. Kolbę przykryć lejkiem. Mineralizację należy prowadzić bardzo ostrożnie przez 1 godzinę. Pobrać 10 cm<sup>3</sup> ochłodzonego mineralizatu i przenieść do rozdzielacza – dalsze postępowanie jak przy mineralizacji i ekstrakcji metali z moczu.

**3. Przygotowanie płytek i komór chromatograficznych**

Do rozdzielacza i identyfikacji metali należy przygotować trzy komory z następującymi układami rozwijającymi:

**A:** benzen – *n*-heptan (27:3),

**B:** benzen – aceton – *n*-heptan (18:8:8),

**C:** aceton – 4 M HCl – acetyloaceton (30:2:1,3).

Nanoszenie absorbenta oraz przygotowanie płytek i komór chromatograficznych jest analogiczne jak w rozdziale 6.11.1.

**4. Przygotowanie ekstraktów metali wzorcowych**

Do rozdzielacza wprowadzać kolejno po 10 cm<sup>3</sup> wody zakwaszonej 3 M HCl do wartości pH~1. Następnie dodać po 1 cm<sup>3</sup> roztworów wzorcowych metali, 1 cm<sup>3</sup> 0,5% roztworu Na-DDTK oraz po 5 cm<sup>3</sup> chloroformu w celu ekstrakcji powstałych kompleksów karbaminianów metali. W środowisku kwaśnym do chloroformu przechodzą kompleksy następujących metali: miedzi, kadmu, ołowiu, kobaltu, niklu, bizmutu, chromu, rtęci i arsenu. Mangan należy ekstrahować w środowisku zasadowym o pH=6-9, uprzednio alkaliczując roztwór soli za pomocą amoniaku. Następnie dodać 1 cm<sup>3</sup> Na-DDTK i 5 cm<sup>3</sup> chloroformu.

Ze względu na małą trwałość uzyskanego chloroformowego ekstraktu karbaminianów metali należy je natychmiast nanieść na płytki chromatograficzne (nie później niż po godzinie od zakończenia ekstrakcji).

**5. Rozwijanie chromatogramów**

Substancje wzorcowe i badane nanieść na linię startu w odległości 1,5 cm od dolnej krawędzi płytki za pomocą pipetki hematologicznej o pojemności 0,05 cm<sup>3</sup> lub kapilary. Średnica plam nie powinna przekraczać 0,5 cm. Po wysuszeniu plam płytki wstawić do komory chromatograficznej. Czas rozwijania wynosi około 20 minut.

Płytki po wyjęciu z komory należy nadal utrzymywać w pozycji pionowej i po zaznaczeniu czoła rozpuszczalnika natychmiast wysuszyć strumieniem gorącego powietrza.

**6. Wywołanie chromatogramów**

Po charakterystycznej barwie plam oraz wartości R<sub>f</sub> można dokonać identyfikacji metali w badanym materiale biologicznym. Znając zawartość metali w roztworach wzor-



### 7.13. Oznaczanie zawartości wybranych metali w materiale roślinnym metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej

Techniki oparte na spektrometrii atomowej należą do najbardziej rozpowszechnionych metod oznaczania śladowych ilości pierwiastków. Techniki te wykorzystują promieniowanie elektromagnetyczne, które może być absorbowane lub emitowane przez atomy pierwiastków obecnych w próbce. W atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS, ang. *atomic absorption spectrometry*) mierzy się rezonansową absorpcję promieniowania o określonej długości fali. Zaabsorbowana część promieniowania jest proporcjonalna do stężenia pierwiastka.

Najważniejszymi elementami spektrometrów absorpcji atomowej są:

1. **źródło promieniowania** – zwykle lampa z katodą wnątkową, która emituje liniowe widmo pierwiastka o określonej intensywności;
2. **atomizer** – zadaniem atomizerów jest otrzymywanie z dużą wydajnością atomów z próbek analitycznych. Stosowane są różne techniki atomizacji, z których najbardziej popularne są **technika płomieniowa** i **bezpłomieniowa** (elektrotermiczna). Różnice polegają na sposobie dozowania próbki oraz na sposobie przeprowadzania jej w stan atomowy. Atomizację prowadzi się w płomieniu acetylen-powietrze lub acetylen-podtlenek azotu. Przeprowadzona do roztworu próbka dostarczana jest do atomizera w sposób ciągły w postaci aerozolu po etapie nebulizacji. Technika ta pozwala na oznaczanie stężeń pierwiastków na poziomie  $\text{ng}/\text{cm}^3$  do  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . System elektrotermiczny jest znacznie efektywniejszy przy przeprowadzaniu analitu w postaci wolnych atomów w fazie gazowej. Można też dozować znacznie mniejsze objętości próbki (10-50  $\mu\text{l}$ ). Technika tą można oznaczać stężenia rzędu od  $\text{pg}/\text{cm}^3$  do  $\text{ng}/\text{cm}^3$ ;
3. **monochromator** – zadaniem monochromatora jest oddzielenie linii analitycznej od innych linii widmowych promieniowania emitowanego przez lampę i od promieniowania emitowanego przez atomizer;
4. **detektor**, który odbiera zmodulowany sygnał, który zostaje wzmocniony i przetworzony.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe metali o stężeniu 1  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ,
2. 1% roztwór  $\text{HNO}_3$ ,
3. spektrometr AAS, zestaw do mineralizacji, pipety, kolby miarowe o pojemności 50  $\text{cm}^3$ .

Przygotowanie hodowli roślin narażonych na działanie metali ciężkich wykonać wzorując się propozycją zamieszczoną w rozdziale 7.12. W celu oznaczenia zawartości metali ciężkich odważyć po około 0,5 g następujących części rośliny:

- pędy nadziemne / korzenie roślin hodowanych na podłożu z metalami,
- pędy nadziemne / korzenie roślin z hodowli kontrolnej.

Wszystkie próby poddać mineralizacji za pomocą jednej z metod przedstawionych w rozdziale 4.5.

Przygotować odpowiednie roztwory wzorcowe. Następnie ustawić właściwe parametry aparatu AAS: przepływ gazów oraz właściwą długość fali dla odpowiedniego metalu (Tabela 7.5). Przeprowadzić analizę roztworów wzorcowych i zmineralizowanych próbek badanych rozpuszczonych w 2  $\text{cm}^3$   $\text{HNO}_3$ . Na podstawie wyników absorpcji uzyskanych dla prób wzorcowych wykreślić krzywą wzorcową. Z wykresu wzorcowego odczytać zawartość analizowanego metalu w pędach i korzeniach roślin. Wyciągnąć wnioski dotyczące akumulacji metali ciężkich w poszczególnych częściach rośliny oraz ustalić toksyczność metali u roślin na podstawie ich zawartości.

Tabela 7.5. Długości fal ( $\lambda$ ) dla metali w pomiarach metodą AAS.

Metal	$\lambda$ (nm)
Arsen	193,7
Bar	553,6
Chrom	357,9
Cyna	224,6
Cynk	213,9
Glin	309,3
Kadm	228,8
Kobalt	240,7

Metal	$\lambda$ (nm)
Magnez	285,2
Miedź	324,7
Nikiel	232,0
Ołów	283,3
Rtęć	253,6
Tal	276,8
Żelazo	248,3

# 8 WYBRANE SUBSTANCJE TOKSYCZNE POCHODZENIA ROŚLINNEGO

## 8.1. Alkaloidy

**Alkaloidy** – występują w roślinach w postaci soli kwasów organicznych, najczęściej z kwasem jabłkowym, cytrynowym, szczawiowym, bursztynowym lub kwasami garbnikowymi. Alkaloidy zawierają w cząsteczce układy heterocykliczne z atomem azotu lub tlenu. Pierwszym alkaloidem wyodrębnionym w stanie czystym była morfina (1804 r.). Znanych jest obecnie ponad 20800 alkaloidów (naturalnych i syntetycznych). Gromadzone są najczęściej w określonych, często peryferyjnych częściach rośliny, np. chinina występuje w korze drzew chinowych, kokaína w liściach drzewa koka, strychnina i brucyna w nasionach kulczyby wroniego oka, zaś morfina w słomie i owocach (makówkach) maku. Posiadają silne oddziaływanie na organizmy ludzkie i zwierzęce. Klasyfikuje się je według pochodzenia (np. alkaloidy makowe czy alkaloidy tojadu) lub budowy chemicznej (np. alkaloidy opium, alkaloidy pochodne chinolinowe czy alkaloidy pochodne indolu). Do najbardziej znanych alkaloidów należą: atropina, brucyna, chinina, efedryna, kodeína, kofeina, kokaina, meskalina, morfina, nikotyna, papaweryna, rezerpina, skopolamina, strychnina czy teobromina. Rola alkaloidów w życiu roślin nie została dotychczas wyjaśniona, prawdopodobnie nie spełniają istotnych funkcji fizjologicznych. Niektóre z nich są stosowane w leczeniu, np. kodeína jako lek przeciwkaszlowy czy morfina jako lek przeciwbólowy (długotrwałe stosowanie prowadzi do uzależnienia – morfinizmu). Nasila się jednak nielecnicze zastosowanie niektórych alkaloidów (określanych jako narkotyki). Prowadzi to do bardzo szybkiego uzależnienia się (narkomanii), z czasem zwiększenia dawki, której przekroczenie prowadzi do śmierci.

### 8.1.1. Wykrywanie koniiny – alkaloidu cykuty

Objawy zatrucia  
u człowieka

pieczenie w ustach i przełyku, nudności, zawroty głowy, uczucie upojenia, omdlenia i napady drgawek, utrata przytomności.

Dawka śmiertelna  
dla człowieka

6-10 g szczwołu; 0,5-1 g koniiny.

Jednym z alkaloidów o prostej budowie jest trucizna cykuty (tzw. „puchar Sokratesa”) **koniina** – lotna propylowa pochodna piperdydy (uwodnionej pirydydy), która posiada charakterystyczny zapach. Koniina występuje w owocach szczwołu plamistego (*Conium maculatum*) w ilościach do 2%. Wchłania się przez skórę i błony śluzowe. Jest bardzo silną trucizną – w małych dawkach powoduje paraliż nerwów ruchowych, a w większych wywołuje śmierć w wyniku paraliżu ośrodkowego. Objawy zatrucia koniina może spowodować nawet wężanie rośliny.

W moździerzu porcelanowym należy rozetrzeć owoce lub kłęczka szczwołu plamistego zwanego również cykutą (*Conium maculatum*) z niewielką ilością 20% roztworu KOH. Rozchodzi się zapach „mysiego moczu” charakterystyczny dla piperdydy.

**Liście i korzenie cykuty są bardzo podobne do liści pietruszki, zaś nasiona cykuty mylone są z nasionami anyżu lub kolendry!**

### 8.1.2. Wykrywanie nikotyny – alkaloidu tytoniu

Nikotyna jest alkaloidem zawierającym nieskondensowane pierścienie pięcio- i sześciocłonowe. Wytwarzana jest przez tytoń (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica*), występuje w postaci bezbarwnego oleistego płynu, który na powierzchni żywocowacieje i brunatnieje nabierając charakterystycznego zapachu. Chemicznie czysta nikotyna jest prawie bezwonna. Nikotyna ma właściwości toksyczne. W małych dawkach działa m.in. pobudzająco na centralny i obwodowy układ nerwowy, z kolei w większych – najpierw pobudza, a później hamuje działanie układu nerwowego. Stałe nadużywanie przez palenie papierosów sprzyja powstawaniu nowotworów płuc i żołądka.

Objawy zatrucia  
u człowieka

zwiększa częstość tętna oraz podwyższa tętnicze ciśnienie krwi, przyspiesza akcję serca.

Dawka śmiertelna  
dla człowieka

50-100 mg nikotyny.

Roztarte cygaro należy destylować z 20 cm<sup>3</sup> roztworu Ca(OH)<sub>2</sub> z kolbki z chłodnicą destylacyjną do probówki. Bezbarwny, szybko żółknący destylat po-

siada zapach tytoniu. Pobraną kroplę destylatu zmieszać na szkiełku zegarkowym z kroplą mieszaniny 10% roztworu  $\text{AuCl}_3$  i  $\text{NaBr}$  zmieszanej w stosunku 10:1. Następnie pod mikroskopem można obserwować powstawanie rombówatych lub krzaczastych kryształów alkaloidowych. Pozostałą część destylatu miesza się w probówce z roztworem jodu w jodku potasu, wytrąca się brunatnoczerwony osad **nikotyny**.

### 8.1.3. Wykrywanie strychniny i brucyny – alkaloidów kulczyby

Strychnina i brucyna to alkaloidy występujące w nasionach kulczyby wroniego oka (*Strychnos nux-vomica*), rozpuszczone są w ich tłuszczu zapasowym. Są nie- zwykle trujące, porażają ośrodkowy układ nerwowy i zakończenia nerwów. Symptomy zatrucia strychniną i brucyną to konwulsje, nudności, nadpobudliwość, drgawki i paraliż. Strychnina jest białą, krystaliczną substancją, bez zapachu, trudno rozpuszczalna w wodzie. Gorzki smak strychniny utrzymuje się nawet w rozcieńczeniu 1:130000. Brucyna charakteryzuje się wyjątkowo gorzkim smakiem, wyczuwalnym w rozcieńczeniu 1:220000, jest mniej toksyczna niż strychnina.

**Kulczyba wronie oko nie rośnie ani w Polsce, ani w Europie; jest rośliną klimatu tropikalnego.**

Z przeciętych nasion kulczyby ostrożnie wycisnąć kropelki oleju na mikroskopowe szkiełko podstawowe. Następnie nanieść kilka kropli stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  z kryształkiem dichromianu potasu. Pod mikroskopem obserwować preparat przykryty szkiełkiem nakrywkowym. Krople oleju zawierające **strychninę** zabarwiają się na czerwono, następnie na fioletowo.

#### Objawy zatrucia u człowieka

wzmószona pobudliwość, bolesna sztywność karku, skurcz żwaczy i utrudnione połykanie, skurcze tężcowe, zahamowanie ruchów oddechowych z sinicą.

#### Dawka śmiertelna dla człowieka

1-3 g nasion kulczyby wroniego oka; 30-100 mg azotanu strychniny; 30 mg wolnej strychniny (doustnie); 3 mg wolnej strychniny (podskórnie).

Roztarte nasiona kulczyby ekstrahować  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , następnie dodać do ekstraktu stężony  $\text{HNO}_3$ . Powstaje intensywne czerwone zabarwienie, przechodzące stopniowo w żółte, co świadczy o obecności **brucyny**.

#### Dawka śmiertelna dla człowieka

100 mg brucyny (doustnie); 30 mg (podskórnie).

### 8.1.4. Wykrywanie alkaloidów glistnika jaskółczego ziela

Alkaloidy spotykane są we wszystkich częściach tej rośliny, ich ogólna zawartość wynosi 0,3% w częściach nadziemnych oraz do 3% w korzeniu. Glistnik jaskółcze ziele (*Chelidonium majus*) stosowany jest jako surowiec w ziołolecznictwie. Zatrucie spowodowane przedawkowaniem leków zawierających alkaloidy glistnika lub spożyciem samej rośliny powoduje zaburzenia w przewodzie pokarmowym, pieczenie w jamie ustnej, wymioty, zawroty głowy, śpiączkę. Sok mleczny glistnika zastosowany zewnętrznie może wywołać stany zapalne skóry.

Rozdrobnione liście zalać 5% roztworem kwasu winowego w etanolu absolutnym na 10-24 godzin. Po tym okresie należy przemyć skrawki rośliny nową porcją alkoholu i wykonać reakcje charakterystyczne na obecność alkaloidów. Na szkiełku podstawowym umieścić przygotowany materiał biologiczny, następnie dodać kilka kropli odczynnika Marquisa (1  $\text{cm}^3$  stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 2-3 krople 40% formaliny), który należy przygotować bezpośrednio przed użyciem. **Kodeina** barwi się na kolor niebiesko-fioletowy. Działanie fizjologiczne kodeiny polega na obniżeniu wrażliwości ośrodkowego i hamowaniu kaszlu, wykazuje działanie uspokajające, przeciwbiegunkowe, przeciwbólowe (zwykle stosuje się ją w dawkach jednorazowych 20-30 mg razem z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi i/lub paracetamolem, które działają synergistycznie). Kodeina to eter metylowy morfiny, o znacznie słabszym działaniu niż morfina. Trudniej wywołuje przyzwyczajenia.

#### Objawy zatrucia człowieka

senność, osłabienie, zawroty głowy, zaparcie, spowolnienie rytmu oddechowego, nadmierne uspokojenie – **po zażyciu kodeiny nie powinno się prowadzić samochodu ani wykonywać czynności wymagających skupienia.**

#### Dawka śmiertelna dla człowieka

> 500 mg kodeiny.

Na szkiełku podstawowym należy nanieść kroplę soku z korzenia glistnika jaskółczego ziela z kroplą stężonego  $\text{HCl}$ . Po skrzepnięciu powstają liczne kryształy alkaloidów o różnym kształcie i barwie, które obserwuje się pod mikroskopem. Sok mleczny glistnika jaskółcze ziele zawiera szereg barwnych i fluoryzujących alkaloidów, m.in. **berberynę, chelidoninę, chelerytrynę, sangwinarynę**. Związki te można rozdzielić metodą chromatografii bibułowej.

Pocięty, a następnie rozarty w moździerz z niewielką ilością wyprażonego piasku korzeń glistnika jaskółczego ziela ekstrahować ciepłym alkoholem etylowym. Przesączony ciemno-czerwonobrunatny ekstrakt należy nanieść na bibułę chromatograficzną na wysokości 1 cm od krawędzi. Przy każdorazowym dodaniu próby wysuszyć bibułę ciepłym powietrzem suszarki. Fazę ruchomą chromatografii

bibułowej wstępującej stanowi 80% roztwór etanolu. Po dojściu czoła rozpuszczalnika do końca bibuły należy ją wysuszyć oraz przeprowadzić obserwacje w świetle widzialnym i nadfiolecie. Powstają wyraźnie rozdzielone i fluoryzujące pasma (od dołu): cytrynowożółte zabarwienie świadczy o obecności **berberyny** ( $R_f=0,2$ ); żółte, obramowane dwustronnie pomarańczowo świecącymi paskami **chelerytryny** ( $R_f=0,35$ ); karminowoczerwony pasek **sangwinaryny** ( $R_f=0,4$ ); żółtozielone pasmo **chelidoniny** ( $R_f=0,8$ ). W świetle widzialnym rozdzielone pasma alkaloidów są znacznie jaśniejsze.

### 8.1.5. Wykrywanie berberyny

Berberyna – alkaloid o barwie żółtej, występuje m.in. w soku mlecznym glistnika jaskółcze ziele, kłęczach gorzknika kanadyjskiego. Działa przeciwprzewodniakowo (zabija pierwotniaki, nawet w niskich stężeniach, np. *Leishmania*), przeciwbakteryjnie, silnie żółciopędnie i spazmolitycznie (rozkurczowo).

#### Objawy zatrucia u człowieka

obniża ciśnienie krwi, zmniejsza częstość oddechów, pobudza wydzielanie moczu. **Działa poronnie, zatem nie wolno podawać preparatów ziołowych z berberyną kobietom w ciąży.**

Pędy i/lub korzenie berberysu (*Berberis sp.*) lub glistnika jaskółcze ziele należy pociąć na drobne kawałki, które gotuje się z wodą i niewielką ilością stężonego HCl. Przesącz posiada barwę żółtą, która słabo fluoryzuje w nadfiolecie. Po zanurzeniu w tym roztworze pasek bibuły filtracyjnej wykaże w nadfioletowym świetle lampy analitycznej typowe jasnożółte świecenia dla berberyny. Z kolei dodanie wody bromowej do ekstraktu powoduje jego zabarwienie na kolor krwistoczerwony.

### 8.1.6. Wykrywanie morfiny

Morfinę otrzymuje się ze słomy makowej lub opium. Stosowana jest jako środek przeciwbólowy, zaś długotrwałe leczenie się morfiną prowadzi do uzależnienia (morfinizm). Wchłania się z przewodu pokarmowego i tkanki podskórnej. Poraża ośrodek oddechowy (efekt przeciwkaszlowy), wywołuje skurcze zwieraczy zbudowanych z mięśni gładkich (działanie zapierające).

#### Objawy zatrucia u człowieka

senność, utrata przytomności, zniesienie oddechów, sinica, zwężenie źrenic.

#### Dawka śmiertelna dla człowieka

200-400 mg (doustnie), 100-200 mg (podskórnie).

Niedojrzałą makówkę (torebkę nasienną) maku lekarskiego (*Papaver somniferum*) należy naciąć, a następnie zebrać kilka kropli soku mlecznego na mikroskopowych szkiełkach nakrywkowych. Dodanie kropli stężonego  $HNO_3$  wywołuje zabarwienie czerwone. Z kolei dodanie do kropli soku mlecznego stężonego HCl powoduje powstanie licznych bezbarwnych kryształów, głównie chlorowodoru morfiny obserwowanych pod mikroskopem.

Rozdrobnione liście i torebki nasienne maku lekarskiego zalać 5% roztworem kwasu winowego w etanolu absolutnym na 10-24 godzin. Po tym okresie należy przemyć skrawki rośliny nową porcją alkoholu i wykonać reakcję charakterystyczną na obecność morfiny. Na szkiełku podstawowym umieścić przygotowany materiał biologiczny, następnie dodać kilka kropli odczynnika Marquisa (1  $cm^3$  stężonego  $H_2SO_4$  i 2-3 krople 40% formaliny), który należy przygotować bezpośrednio przed użyciem. Morfina barwi się na kolor czerwony.

### 8.1.7. Wykrywanie kolchicyny

Kolchicyna występuje w nasionach zimowitu jesiennego (*Colchicum autumnale*) (0,2-0,6%) i innych gatunkach zimowitu, a także w rodzajach *Gloriosa* i *Androcymbium* (*Liliaceae*). Kolchicyna jest trucizną mitotyczną, hamuje mitozę w stadium metafazy, atakuje wrzeciono kariokinetyczne wywołując zjawisko poliploidyzacji. Ponadto w organizmie wywołuje ostre stany żołądkowo-jelitowe, toksycznie wpływa na układ nerwowy.

Zebrane na wiosnę łodygi lub jesienią bulwy i nasiona zimowitu jesiennego po wykonaniu przekroju poprzecznego zwilżyć 30% roztworem  $H_2SO_4$  i obserwować pod mikroskopem. W obecności kolchicyny występuje pojawienie się barwy żółtej.

Rozdrobnione bulwy lub nasiona zimowitu jesiennego zalać 5% roztworem kwasu winowego w etanolu absolutnym na 10-24 godzin. Po tym okresie należy przemyć skrawki rośliny nową porcją alkoholu i wykonać reakcję charakterystyczną na obecność morfiny. Na szkiełku podstawowym umieścić przygotowany materiał biologiczny, następnie dodać kilka kropli odczynnika Marquisa (1  $cm^3$  stężonego  $H_2SO_4$  i 2-3 krople 40% formaliny), który należy przygotować bezpośrednio przed użyciem. Kolchicyna barwi się na kolor żółtozielony.

#### Objawy zatrucia u człowieka

kolki, biegunka lub silne zaparcia, pieczenie w ustach i gardle, trudności w połykaniu, uczucie strachu, zapaść.

#### Dawka śmiertelna dla człowieka

5 g nasion całych lub 2-3 g nasion sproszkowanych zimowitu.

### 8.1.8. Wykrywanie kofeiny

Kofeina występuje w nasionach kawy (1-2%), liściach herbaty (1-4%) i orzeszkach kawa (2,5-5%). Stosowana jest jako używka w naparach lub ekstraktach kawy i herbaty. Filiżanka kawy zawiera około 80-100 mg kofeiny, filiżanka herbaty – 70 mg kofeiny, 100 g czekolady – 80 mg kofeiny, butelka Coca-coli (330 cm<sup>3</sup>) – >100 mg kofeiny. Pobudza ośrodkowy układ nerwowy, oddechowy, naczynioruchowy, wydzielanie soku żołądkowego, przyspiesza przemianę materii, zwiększa sprawność myślenia oraz znosi zmęczenie.

1-2 g roztartej w moździerzu herbaty lub 2 rozgniecione ziarna kawy naturalnej umieścić w zlewce. Dodać kilka cm<sup>3</sup> wody oraz przykryć całość szkiełkiem zegarkowym. Następnie ogrzewać, dopóki nie pojawi się para wodna. Na szkiełku zegarkowym gromadzi się sublimat. W mikroskopie polaryzacyjnym obserwować świecące igielki kryształów kofeiny.

Do niedużej ilości badanego osadu dodać 2 cm<sup>3</sup> odczynnika Nesslera. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności kofeiny tworzy się obfity, czerwono-brunatny osad.

**ODCZYNNIK NESSLERA:** 6 g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm<sup>3</sup> ciepłej wody i dodać 50 cm<sup>3</sup> 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm<sup>3</sup>, dodać 60 cm<sup>3</sup> 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslera.**



pobudzenie psychiczne i ruchowe, porażenie układu oddechowego (zatrucia ostre); nudności, ból głowy, biegunka, bezsenność, drżenie rąk, niemiernie bicie serca, częstomocz, wzmożona potliwość, wymioty, owrzodzenie żołądka (zatrucia przewlekłe).

10-12 g kofeiny (doustnie).

## 8.2. Glikozydy

**Glikozydy** są to pochodne cyklicznych monosacharydów, zbudowane z reszty cukrowej połączonej z podstawnikiem (aglikonem). W *O*-glikozydach podstawnik połączony jest poprzez atom tlenu półacetalowej grupy hydroksylowej monosacharydu (utworzonej z grupy aldehydowej lub ketonowej monosacharydu podczas cyklizacji cząsteczki), w *N*-glikozydach rolę atomu tlenu spełnia atom azotu. *O*-gli-

kozydy glukozy noszą nazwę glikozydów, mannozy – mannozydów, itp. *O*-glikozydy trudniej ulegają mutarotacji aniżeli wyjściowe monosacharydy, wykazują odporność na działanie zasad i brak działania redukującego (reakcja redoks).

Glikozydy roślin mają charakterystyczny zapach i smak (np. amigdalina – pierwszy wyizolowany w 1830 r. naturalny glikozyd), barwę (flawony, antocyjany). Wytwarzane są głównie w liściach, natomiast magazynowane są w korze, kłaczach, owocach i nasionach. Liczne z nich mają działanie, np. bakteriostatyczne (chrzan – synigryna, streptomycyna) i nasercowe (glikozydy nasercowe). Podobnie jak alkaloidy, glikozydy przyjmowane w niekontrolowanych dawkach mogą być groźne dla zdrowia, a nawet życia.

### 8.2.1. Wykrywanie glikozydów kardenolidowych

Są to pochodne steranu, posiadają działanie nasercowe. Glikozydy kardenolidowe zawarte są m.in. w liściach naparstnicy wełnistej (*Digitalis lanata*) – **lanozyd A, B, C, digitoksyna, digoksyna**; miłka wiosennego (*Adonis vernalis*) – **adonitoksyna, adonitoksol, β-strofantyna, cymaryna**; konwalii majowej (*Convallaria majalis*) – **konwalatoksyna, konwalozyd, konwalatoksol** czy płochowca pospolitego (oleander) (*Nerium oleander*) – **oleandryna**. W ostrych zatruciach glikozydami naparstnicy, podanej doustnie, występują: bóle głowy, nudności, biegunka, zaburzenia widzenia, zaburzenia rytmu serca, itp. Często dochodzi do śmierci.

Do skrawków liści dodać mieszaniny 9,7 cm<sup>3</sup> kwasu octowego, 2 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 cm<sup>3</sup> 5% roztworu FeCl<sub>3</sub>. W obecności glikozydów występuje w komórkach zabarwienie turkusowoniebieskie lub ciemnoniebieskie (**reakcja Keller-Kiliani**).

Do skrawków liści zhydrolizowanych 1% etanolem roztworem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodać mieszaniny 1% roztworu kwasu pikrynowego i 10% roztworu NaOH (w stosunku 1:1). W komórkach zawierających glikozydy występuje zabarwienie, pogłębiające się po podgrzaniu lub osad o zabarwieniu od pomarańczowego do brunatnoczerwonego (**reakcja Baljeta**).

### 8.2.2. Wykrywanie glikozydów flawonoidowych

Należą do grupy pochodnych γ-pironu i piranu. Są rozpowszechnione w roślinach jako żółte barwniki, występują w licznych gatunkach roślin należących do rodzin: rutowate (*Rutaceae*), złożone (*Compositae*), fiołkowate (*Violaceae*). Najczęściej występują jako żółte barwniki rozpuszczone w soku komórkowym kwiatów i liści, rzadziej owocach, korze, drewnie, bardzo rzadko w nasionach. Niekiedy krystalizują się w komórkach skórki (epidermy), np. **hesperydyna** w owocni pomarańczy.

**Toksyczność flawonoidów jest minimalna.**



Skrawki liści fiołka trój kolorowego (*Viola tricolor*) umieścić w nasyconym roztworze winianu antymonylopotasowego na okres 1 godziny. Glikozydy flawonoidowe wytrącają się w postaci żółtych osadów, podczas gdy garbniki tworzą drobne osady. Po przeniesieniu skrawków liści do 1% roztworu  $\text{FeCl}_3$  na okres 1-12 godzin glikozydy nie zmieniają się, natomiast osady garbników przyjmują zabarwienie brązowe (**reakcja Jabłkowej-Jakimowa**).

Do świeżych lub zwilżonych wodą skrawków liści fiołka trój kolorowego dodać kroplę 0,01% roztworu *p*-aminofenolu. W obecności **rutozydu** (rutyny) występuje zabarwienie zielone, przechodzące w niebieskie (**reakcja Kamiya**).

Świeże skrawki liści fiołka trój kolorowego umieścić w 10% KOH lub 25% amoniaku. W obecności glikozydów flawonoidowych pojawi się zabarwienie zielonożółte do brązowego.

### 8.2.3. Wykrywanie glikozydów fenolowych

Związki te charakteryzują się połączeniami cząsteczek cukru z różnymi fenolami. Są specyficzne dla gatunków roślin należących do rodzin: wierzbowate (*Salicaceae*), wrzosowate (*Ericaceae*). Przedstawiciele glikozydów fenolowych to: **arbutyna, salicyna, populina, salicylopopulina** czy **spirepozyd**.

Skrawki kory wierzby (*Salix* sp.) umieścić w stężonym  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na 6-8 minut, następnie przenieść na ten sam okres do mieszaniny zawierającej stężony  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 2% roztwór selenianu sodu (w stosunku 1:2). Preparat należy obserwować w czystym glicerolu. Komórki zawierające glikozyd – **salicynę** zabarwiają się na czerwono. Salicyna wykazuje słabe działanie przeciwgorączkowe.

Skrawki liści gruszy (*Pyrus communis*) umieścić w 30% roztworze  $\text{HNO}_3$  na 3-5 minut i przenieść do glicerolu. W komórkach zawierających **arbutynę** występuje zabarwienie czerwone. Arbutyna wykazuje działanie dezynfekujące drogi moczowe.

### 8.2.4. Wykrywanie glikozydów antrachinonowych

Są to związki pochodne antracenu w formie zredukowanej – antronów i antranoli lub utlenionej jako antrachinony. Występują w gatunkach roślin, m.in. z rodzin: szakłakowate (*Rhamnaceae*), rdestowate (*Polygonaceae*). Spożycie kory czy niedojrzałych owoców kruszyny pospolitej (*Frangula alnus*) lub szakłaka pospolitego (*Rhamnus cathartica*) powoduje efekt przeczyszczający.

Skrawki kory lub niedojrzałe owoce kruszyny pospolitej umieścić w 3% roztworze KOH lub NaOH. Komórki zawierające antrachinony (**frangularozyd, glukofrangulina A, B**) barwią się na czerwono.

### 8.2.5. Wykrywanie glikozydów kumarynowych

Glikozydy te dają często przy suszeniu surowca roślinnego charakterystyczny przyjemny zapach (kumaryna). Bogate w te substancje są rodziny: motylkowate (*Papilionaceae*), marzanowate (*Rubiaceae*), trawy (*Gramineae*), kasztanowcowate (*Hippocastanaceae*). Wiele kumaryn działa słabo uspokajająco na ośrodkowy układ nerwowy, przeciwskurczowo, przeciwobrzękowo, spazmolitycznie, rozszerzają naczynia wieńcowe.

Sproszkowane liście nostryka żółtego (*Melilotus officinalis*) należy ogrzewać w temperaturze 70-80 °C. Do otrzymanego sublimatu dodać kroplę płynu Lugola. Dodatnia reakcja na **kumarynę** to pojawienie się szarofioletowych lub prawie czarnych igieł jodokumaryny. Kumaryna jest związkiem toksycznym – uszkadza wątrobę, prawdopodobnie ma działanie nowotworcze.

Skrawki kory kasztanowca (*Aesculus hippocastanum*) umieścić na kilka sekund w stężonym  $\text{HNO}_3$ , a następnie przenieść na kilka minut do rozcieńczonego amoniaku. W obecności **eskuliny** występuje w komórkach zabarwienie czerwone. Eskulina wykazuje właściwości podobne do witaminy P, posiada silne właściwości światłochronne (składnik pudrów światłochronnych).

### 8.2.6. Wykrywanie glikozydów cyjanogennych

Są to związki glikozydowe, dające przy rozkładzie enzymatycznym trujący cyjanowodór. Występują głównie w nasionach, liściach lub korze roślin rodziny różowate (*Rosaceae*) i innych. Przykładami są **amigdalina, prunazyna** występujące w liściach i nasionach pestkowców (migdały, brzoskwinie, morele, śliwki, wiśnie). W 1 g pestek zawartość amigdaliny wynosi: wiśni – 1,7 mg, migdałów – 4,5 mg. Glikozydy cyjanogenne rozkładają się do cyjanowodoru, który jest silną trucizną blokującą enzymy oddechowe. Rozkład jest stopniowy, a ilość uwalnianego HCN jest niewielka, zatem nie zachodzi niebezpieczeństwo zatrucia. Niemniej jednak spożycie dużej ilości na przykład gorzkich migdałów może spowodować śmiertelne zatrucie. Przyjmuje się, że pojedynczy migdał gorzki zawiera około 1 mg HCN. Znane są przypadki zatruc śmiertelnych po spożyciu przez osobę dorosłą 50-60, zaś przez dziecko tylko 10 migdałów gorzkich.

Po zdjęciu łupiny 20 pestek śliwy, wiśni lub jabłek ucierać w moździerzu porcelanowym i dodać wodę. Homogenat włożyć na 1 godzinę do ciepłarki o temperaturze 30 °C. Po przesączeniu do roztworu dodać kilka kropli 5%  $\text{FeSO}_4$ , a następnie nieco 5% NaOH. Tworzący się osad rozpuścić przez dodanie kroplami 10% HCl. Roztwór staje się niebieski (błękit pruski), co świadczy o obecności grupy CN<sup>-</sup>.

### 8.2.7. Wykrywanie saponin

**Saponiny** są to związki glikozydowe bezpostaciowe. W zależności od składnika niecukrowego (sapogeniny) zaliczane są do saponin sterolowych lub triterpenowych (aglikony, takie jak: gipsogenina, escygenina). Ponadto w wielu roślinach występują także wolne kwasy triterpenowe (np. kwas ursolowy, oleanolowy). Saponiny występują w gatunkach roślin należących do rodzin: goździkowate (*Caryophyllaceae*), pierwiosnkowate (*Primulaceae*). Rozpuszczają się w wodzie tworząc roztwory koloidalne, po wstrząśnięciu wykazują właściwości pianotwórcze. Stosowane są w leczeniu jako leki wykrztuśne i pobudzające czynność gruczołów wydzielniczych. W większych dawkach mogą być trujące. Saponiny podane dokrewnie niszczą czerwone ciała krwi, powodując wytrącanie hemoglobiny. Podane doustnie są nieszkodliwe. Przykłady saponin to: **digitinina, gitonina, diosgenina**.

Do skrawków liści dodać po 1 kropli stężonego  $H_2SO_4$  i  $NaNO_3$ . W obecności saponin występuje w komórkach zabarwienie czerwone (**reakcja Mitchella**).

Do skrawków liści dodać kilka  $cm^3$  etanolowego roztworu stężonego  $H_2SO_4$  i 1%  $FeCl_3$ . W obecności saponin występuje w komórkach zabarwienie czerwone, przechodzące w fioletowe (**reakcja Lafona**).

Do skrawków liści dodać odczynnik Frohne, w obecności saponin tworzy się w komórkach żółte zabarwienie.

**ODCZYNNIK FROHNE:** 0,3 g jodu i 1 g KI rozpuścić w 5  $cm^3$  wody, zmieszać z 10  $cm^3$  50% glicerolu.

## 8.3. Olejki eteryczne

**Olejki eteryczne (olejki zapachowe)** są to bezbarwne, lotne ciecze pochodzenia roślinnego, zawierające terpenowane węglowodory, alkohole, fenole, ich etery lub dalsze pochodne. Olejki eteryczne posiadają charakterystyczną – przyjemną lub przykrą – woń. Olejki eteryczne otrzymywane są z materiału roślinnego przez destylację z parą wodną, ekstrakcję lub wytlaczanie. Do najbardziej znanych należą: anyżowy (anetol), cedrowy (seskwiterpeny), cynamonowy (aldehyd cynamonowy), cyprysowy (terpeny), eukaliptusowy (cyneol), goździkowy (eugenol), irysowy (iron), jałowcowy ( $\alpha$ -piren), jodłowy (pinen), kminkowy (karwon), lawendowy (octan linalilu), miętowy (mentol), migdałowy (aldehyd benzoesowy), pomarańczowy (aldehyd decylowy), szafranowy (safrol), tymiankowy (tymol), z gałki muszkatołowej (izoeugenol), z owoców wanilii (wanilina) (*w nawiasach podano główny składnik*).

Olejki eteryczne znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym i perfumeryjnym. Niektóre olejki eteryczne są podawane jako leki wykrztuśne w postaci na-

parów, syropów lub inhalacji (aromaterapia). Mogą być podstawowym środkiem leczniczym w stanach długotrwałego przygnębienia, rozdrażnienia, stresu i przemęczenia. Stosowane są również jako środek wspomagający w leczeniu wielu schorzeń. Niektóre rośliny zawierają olejki eteryczne wywołujące działanie toksyczne w organizmie człowieka, należą do nich rośliny nagozależkowe (m.in. jałowiec sawina, jałowiec zwyczajny, tuja – żywotnik zachodni, sosna zwyczajna) oraz rośliny okrytozależkowe (m.in. ruta zwyczajna, bagno zwyczajne). Toksyczne działanie olejków eterycznych lub roślin olejkowych może objawiać się w przypadku świadomego używania lub niewłaściwego stosowania, np. poprzez długotrwałe picie herbatk ziołowych. Olejki mogą osłabiać aktywność enzymów trawiennych wywołując zaburzenia w czynnościach trawienia oraz objawy braku łąknienia.

### 8.3.1. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja z Sudanem III

Barwnik Sudan III rozpuszczony w etanolu służy do wykrywania tłuszczów, z kolei rozpuszczony w aldehydzie trichlorooctowym (wodzianie chlorału) jest wykorzystywany do wykrywania olejków eterycznych. Aldehyd trichlorooctowy rozpuszcza olejki, nie reagując z tłuszczami. Powstaje w ich obecności zabarwienie czerwone. Należy przygotować 1% roztwór Sudanu III w aldehydzie trichlorooctowym (5 części aldehydu z 2 częściami wody).

Skrawki świeżych liści mięty (*Mentha piperita*), melisy (*Melissa officinalis*) lub skórki pomarańczy (*Citrus aurantium*), cytryny (*Citrus limon*) potraktować roztworem Sudanu III oraz gliceryną, obserwować zachodzące reakcje pod mikroskopem. Sudan III wybarwia olejki eteryczne na czerwono. Równocześnie umieścić skrawki tkanek na szkiełku podstawowym w kropli wody i ogrzewać 15 minut nad wrzącą łąnią wodną. Reakcja z Sudanem III daje wynik negatywny (dodatnia reakcja świadczy o obecności w preparacie kuleczek tłuszczu).

### 8.3.2. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja Stahla

Jest to reakcja barwna aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego w mieszaninie z kwasem octowym i ortofosforowym (V) na proazulenyl występujące w olejkach eterycznych następujących roślin: rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), krwawnik pospolity (*Achillea millefolium*) i biedrzynek anyż (*Pimpinella anisum*).

Skrawki świeżych roślin (liście, płatki kwiatowe) ogrzewać we wrzącej łąniej wodnej z 1,5  $cm^3$  odczynnika EP przez okres 5-10 minut. W obecności proazulenylów występuje zabarwienie zielone lub niebieskie.

**ODCZYNNIK EP:** 0,25 g *p*-dimetyloaminobenzaldehydu rozpuścić w mieszaninie 50 g kwasu octowego lodowatego i 5 g 85%  $H_3PO_4$ , następnie uzupełnić wodą do 100  $cm^3$ .

# 9 PESTYCYDY

**Pestycydy (środki szkodnikobójcze, przeciw pasożytnicze, środki ochrony roślin)** są to związki należące do różnorodnych grup chemicznych. Zaliczamy do nich substancje lub mieszaniny różnych substancji wykazujące zdolność do niszczenia, odstraszania lub hamowania rozwoju szkodników roślinnych i zwierzęcych. Obecnie stosuje się ponad 1000 aktywnych substancji w postaci 60000 preparatów jedno- i wieloskładnikowych, produkowanych w tysiącach ton. Ich toksyczność i trwałość w środowisku są bardzo zróżnicowane. W założeniach miały być środkami działającymi selektywnie na różne formy organizmów, jednak w praktyce okazało się, że selektywność jest niezadowalająca i wszystkie te związki nie mają działania selektywnego, są toksyczne dla pszczoł, kręgowców, w tym również człowieka. Badania toksykologiczne obejmują działanie pojedynczych substancji, stosowanie zaś wieloskładnikowych oraz kilku różnych preparatów powoduje często nieprzewidziane interakcje i wystąpienie addytywnego działania toksycznego. Pestycydy mogą przenikać do łańcucha pokarmowego, kumulując się w jego wyższych piętach, w wyniku czego żywność stanowi również źródło narażenia na te związki.

Wykorzystanie praktyczne pestycydów obejmuje: niszczenie pasożytów roślin i zwierząt, zwalczanie chorób roślin, regulację ich wzrostu i rozwoju, usuwanie chwastów. Niektóre pestycydy są stosowane w akcjach sanitarnych, higienie osobistej ludzi oraz leczeniu niektórych chorób, np. zimnicy, dżumy, żółtej febry, i innych. W gospodarce rolnej i leśnej zastosowanie pestycydów powoduje wzrost plonów roślin uprawnych, zwiększenie przyrostu produkcji oraz jakości mleka i mięsa, ochronę lasów przed szkodnikami. Z kolei w gospodarce materiałowej – zmniejszenie strat żywności wskutek ochrony magazynów, ochronę i zwiększenie trwałości produktów przemysłowych i muzealnych (drewno, papier, tekstylia) oraz przedłużenie czasu eksploatacji dróg, torowisk i lotnisk w wyniku odchwaszczania.

Proces rozkładu pestycydów przebiega w glebie i wodzie pod działaniem bakterii, w reakcjach fotochemicznych i chemicznych katalizowanych jonami metali lub innymi związkami chemicznymi (zachodzące procesy to reakcje: utleniania, redukcji, hydrolizy i oddziaływania z wolnymi rodnikami).

Cechami charakterystycznymi substancji chemicznych, które mają być wykorzystane jako pestycydy, powinny być:

- selektywność toksyczności (duża toksyczność wobec szkodników i mała wobec pozostałych organizmów),
- właściwa persystencja w środowisku (odpowiednio długi czas pozostawania w środowisku, by mogły niszczyć szkodniki),
- duża podatność na degradację,
- brak tendencji do biokumulacji w organizmach zwierzęcych i roślinnych,
- mobilność w środowisku.

## 9.1. Podział i bezpieczeństwo stosowania pestycydów

Pestycydy klasyfikuje się na podstawie różnych kryteriów – najważniejsze z nich to: a) kierunek zastosowania i sposób działania, b) budowa chemiczna oraz c) toksyczność.

### A. Podział pestycydów w zależności od kierunku działania

#### 1. Zoocydy – środki do zwalczania szkodników zwierzęcych:

- insektycydy – środki owadobójcze,
- akarycydy – środki zwalczające roztocza,
- nematocydy – środki zwalczające nicienie,
- aficydy – środki zwalczające mszyce,
- moluskocydy – środki zwalczające ślimaki,
- rodentocydy – środki zwalczające gryzonie,
- larwicydy – środki zwalczające larwy,
- atraktanty – środki zwabiające,
- repelenty – środki odstraszające.

#### 2. Fungicydy – środki grzybobójcze.

#### 3. Bakteriocydy – środki zwalczające bakterie.

#### 4. Herbicydy – środki chwastobójcze:

- totalne – niszczące wszystkie rośliny zawierające chlorofil,
- wybiórcze – niszczące wybrane grupy roślin, np. rośliny dwuliścienne,
- regulatory wzrostu – hamujące lub stymulujące procesy życiowe roślin.

### B. Podział pestycydów w zależności od budowy chemicznej

- związki fosforoorganiczne,
- węglowodory chlorowane,
- pochodne kwasu karbaminowego,
- pochodne tiazyny,
- pochodne mocznika,
- pochodne nitrofenoli,
- związki organiczne rtęci, cyny i miedzi,
- piretroidy,
- inne związki.

W praktyce stosuje się podziały chemiczno-użytkowe, pozwalające powiązać budowę związku z kierunkiem jego działania. Wyróżniamy przykładowo:

- insektycydy fosforoorganiczne,
- insektycydy karbaminianowe,
- insektycydy z grupy piretroidów syntetycznych,
- insektycydy polichlorowe (chloroorganiczne).

Wybrane wzory strukturalne pestycydów przedstawione zostały na rycinie 9.1.

### C. Podział pestycydów w zależności od stopnia toksyczności

Podstawą podziału jest średnia toksyczność ostra danego środka wyrażona wartością dawki LD<sub>50</sub> doustnej i naskórnej (w mg/kg masy ciała) dla szczura. Toksyczność ostra jest to zdolność substancji do wywołania efektu toksycznego po podaniu do organizmu w dawce jednorazowej lub po jednorazowym narażeniu. Tabela 9.1 przedstawia klasyfikację toksykologiczną pestycydów według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

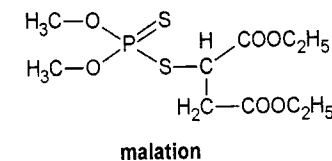
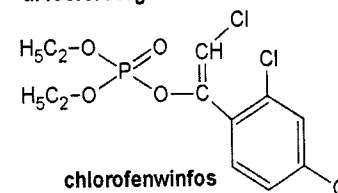
Tabela 9.1. Klasyfikacja pestycydów według WHO.

Klasa toksyczności i jej określenie		LD <sub>50</sub> dla szczura (mg/kg masy ciała)			
		doustnie		naskórnice	
		stałe*	ciekle	stałe*	ciekle
Ia	niezwykle toksyczne	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	bardzo toksyczne	5-50	20-200	10-100	40-400
II	średnio toksyczne	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III	mało toksyczne	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

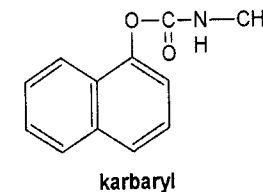
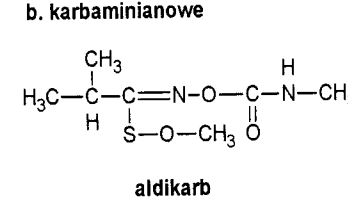
\* - stan fizyczny substancji czynnej lub użytkowej

### I. INSEKTYCYDY

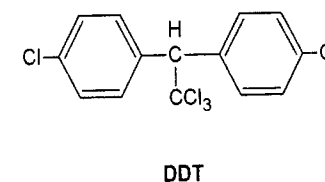
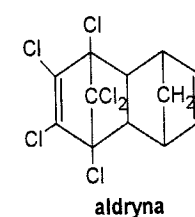
#### a. fosforoorganiczne



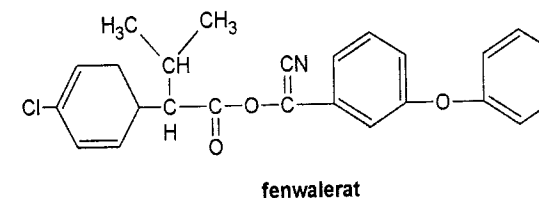
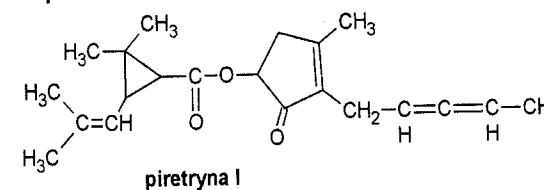
#### b. karbaminianowe



#### c. polichlorowe



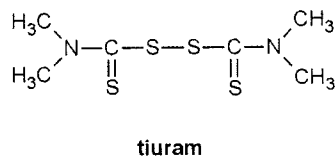
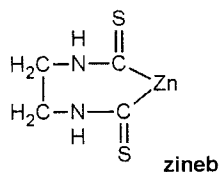
#### d. piretroidowe



Ryc. 9.1. Wybrane wzory strukturalne pestycydów z podziałem na insektycydy, fungicydy, herbicydy i rodentocydy.

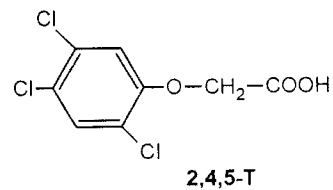
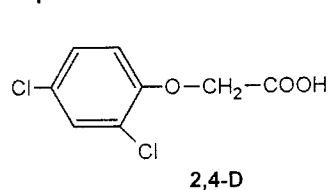
## II. FUNGICYDY

## a. ditiokarbaminiany

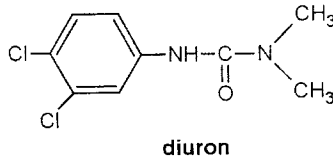
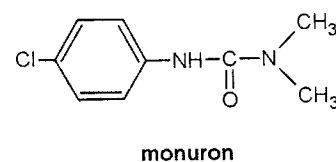


## III. HERBICYDY

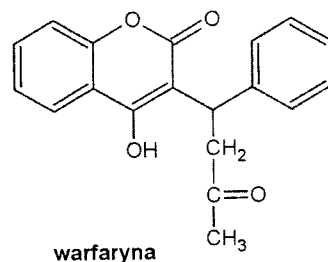
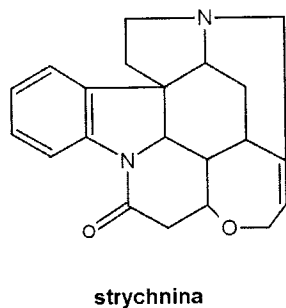
## a. pochodne kwasu chlorofenoksyoctowego



## b. pochodne mocznika



## IV. RODENTYCYDY



Ryc. 9.1. Wybrane wzory strukturalne pestycydów z podziałem na insektycydy, fungicydy, herbicydy i rodentycydy – *ciąg dalszy*.

## 9.2. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH GRUP PESTYCYDÓW

W Polsce na podstawie Ustawy o ochronie roślin z dnia 18.12.2003 r. (Dz. U. z 2004 r. nr 11, poz. 94 z późn. zm.) obowiązują zasady zaliczania środków ochrony roślin przedstawione w tabeli 9.2.

Tabela 9.2. Klasyfikacja pestycydów według ustawodawstwa polskiego.

Klasa toksyczności i jej określenie	Toksyczność ostra		
	LD <sub>50</sub> (mg/kg masy ciała) dla szczura lub królika		LD <sub>50</sub> (mg/dm <sup>3</sup> /4h) dla szczura
	doustnie	naskórnice	inhalacyjnie
I bardzo toksyczne	≤ 25	≤ 50	≤ 0,25 aerozole ≤ 0,50 gazy i pary
II toksyczne	25-200	50-400	0,25-1 aerozole 0,50-2 gazy i pary
III szkodliwe	200-2000	400-2000	1-5 aerozole 2-20 gazy i pary
IV mało szkodliwe	> 2000	> 2000	> 5 aerozole > 20 gazy i pary

## Bezpieczeństwo stosowania pestycydów

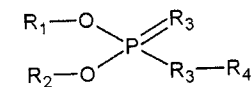
Wysoka toksyczność i brak selektywności pestycydów obligują użytkowników do przestrzegania:

- okresu karencji (czas od oprysku do zbioru plonu),
- przechowywania preparatów,
- niszczenia opakowań (niedopuszczalne jest ich używanie jako opakowań żywności, paszy, mycie lub płukanie w ujęciach wody pitnej),
- konieczność rygorystycznego stosowania się do zaleceń podanych na każdym opakowaniu pestycydu.

## 9.2. Charakterystyka wybranych grup pestycydów

## 9.2.1. Insektycydy fosforoorganiczne

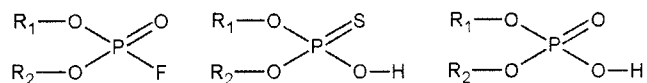
Związki te stanowią grupę triestrów kwasów fosforowych lub tiofosforowych o ogólnym wzorze:



gdzie:

- R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> – podstawniki alkilowe (najczęściej CH<sub>3</sub> lub C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>);
- R<sub>3</sub> – atom tlenu lub siarki;
- R<sub>4</sub> – grupy kwasowe, chlorowiec, grupa CN, reszty fenylove, podstawniki alifatyczne i arylove.

Insektycydy fosforoorganiczne to krystaliczne ciała stałe lub oleiste cieczy o ostrym, nieprzyjemnym zapachu, np. **malation** ma zapach czosnku. Bardzo trudno rozpuszczają się w wodzie, lepiej w rozpuszczalnikach organicznych i tłuszczach. Stosunkowo łatwo hydrolizują – szybkość tego procesu jest silnie zależna od budowy związku, pH środowiska, rodzaju rozpuszczalnika, temperatury i obecności katalizatora. Związki te są powszechnie stosowane w praktyce rolniczej, sadownictwie i warzywnictwie. Okres zalegania w glebie wynosi 2-3 tygodnie. Większość należy do trucizn, a spadek toksyczności następuje wraz z wydłużaniem łańcuchów węglowodorowych  $R_1$  i  $R_2$  oraz w szeregu:



spadek toksyczności insektydów fosforoorganicznych

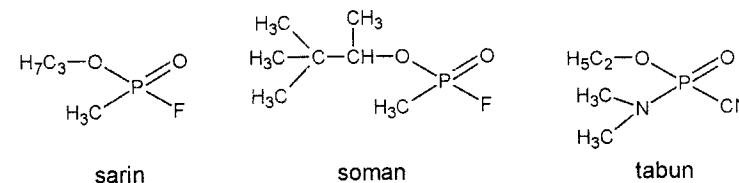
Charakterystykę toksyczności wybranych insektycydów fosforoorganicznych przedstawiono w tabeli 9.3.

Tabela 9.3. Charakterystyka toksyczności niektórych insektycydów fosforoorganicznych.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)		Klasa toksyczności
	doustnie	naskórnice	
Chlorofenwinfos	10-39	31	I
Dichlorfos	80	107	II
EPN	8-17	-	I
Malation	1375	4444	IV
Paration	3-13	21	I

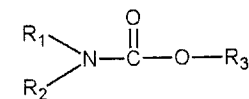
Niektóre insektycydy fosforoorganiczne o mniejszej toksyczności i lepszej rozpuszczalności w wodzie są stosowane w zabiegach sanitarnych i gospodarstwie domowym, np. trichlorfon. Do organizmu dostają się przez przewód pokarmowy, układ oddechowy, skórę i błony śluzowe, gdzie ulegają szybkim przemianom (nie kumulują się). Wszystkie insektycydy fosforoorganiczne są inhibitorami enzymów z grupy cholinesteraz, obecnych w większości tkanek ludzkich i zwierzęcych: mózgu, rdzeń kręgowy, krew, mięśnie szkieletowe i układu oddechowego, wątroba, trzustka i nadnercza. Enzymy te odpowiadają za rozkład acetylocholiny – neuroprzekaźnika chemicznego impulsów nerwowych w zakończeniach nerwowo-mięśniowych. Nagromadzona w miejscach działania insektycydów acetylocholina

zapoczątkowuje działanie toksyczne. Ostre stany zatrucia kończą się śmiercią spowodowaną porażeniem układu oddechowego i uduszeniem. Zatrucia insektycydami fosforoorganicznymi występują najczęściej przy produkcji i stosowaniu pestycydów (lekceważenie zasad bhp), a także w życiu codziennym (spożycia omyłkowe). Dawka śmiertelna dla dorosłego człowieka wynosi 30-120 mg czystej substancji. Większość jest zaliczana do I i II klasy toksyczności. Do grupy estrów fosforoorganicznych należą paralityczno-drgawkowe gazy bojowe: **sarin**, **soman** i **tabun**, których LD<sub>50</sub> dla człowieka wynosi 0,01 mg/kg masy ciała:



### 9.2.2. Insektycydy karbaminianowe

Związki te stanowią grupę estrów kwasu karbaminowego o ogólnym wzorze:



gdzie:

$R_1$  i  $R_2$  – podstawniki alkilowe (najczęściej  $CH_3$ ) lub atom wodoru;

$R_3$  – podstawniki heterocykliczne lub hydroaromatyczne.

Insektycydy karbaminianowe to drobnokrystaliczne ciała stałe trudno rozpuszczające się w wodzie, lepiej w rozpuszczalnikach organicznych i tłuszczach. Stosunkowo łatwo hydrolizują – szczególnie w środowisku zasadowym. Wadą tej grupy insektycydów jest duża toksyczność dla pszczoł i ryb. Większość z nich to trucizny. Do organizmu dostają się przez przewód pokarmowy, układ oddechowy i skórę gdzie ulegają szybkim przemianom (nie kumulują się). Wszystkie insektycydy karbaminianowe, podobnie jak fosforoorganiczne, są inhibitorami cholinesteraz. Dawka toksyczna dla zwierząt wynosi od kilku do kilku tysięcy mg/kg; dla ludzi związki te są mniej toksyczne niż dla zwierząt. Mogą powodować zatrucia ostre, zazwyczaj kończące się wyleczeniem. Niektóre insektycydy karbaminianowe (np. **karbaryl**) w dużych dawkach działają teratogennie i mogą ulegać nitrozowaniu przechodząc w silnie rakotwórcze nitrozozwiązki. Charakterystyka toksyczności wybranych insektycydów karbaminianowych przedstawiona została w tabeli 9.4.

Tabela 9.4. Charakterystyka toksyczności niektórych insektycydów karbaminianowych.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)		Klasa toksyczności
	doustnie	naskórnice	
Aldikarb	0,8	3,0	I
Izolalan	13-23	5,6-6,2	I
Karbaryl	400-850	4000	IV
Primor	147	500	II
Propoksur	90-128	2400	II

### 9.2.3. Insektycydy polichlorowe

Objęmują kilka dużych grup związków chemicznych – chloropochodne węglowodorów, fenoli i kwasów karboksylowych. Od połowy lat 70-tych XX wieku większość z nich została wycofana z użytku ze względu na ogromną szkodliwość (związki te są wyjątkowo trwałe i wykazują silną tendencję do biokumulacji). Najważniejszymi przedstawicielami tej grupy są: chlorowane węglowodory aromatyczne, bischlorofenylove – **DDT**, **metoksychlor** (homolog DDT); pochodne cyklodienowe – **aldryna**, **dieldryna**, **heptachlor**; pochodne cykloparafinowe – **heksachlorocykloheksan (HCH)**, **lindan (γ-HCH)**; chlorowane terpeny – **toksafen**. Wykazują one dużą trwałość oraz dobrą rozpuszczalność w tłuszczach i olejach. Insektycydy polichlorowe są truciznami neurotropowymi. Charakterystyka toksyczności wybranych insektycydów polichlorowych przedstawiona została w tabeli 9.5.

Tabela 9.5. Charakterystyka toksyczności niektórych insektycydów polichlorowych.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)		Klasa toksyczności
	doustnie	naskórnice	
Aldryna	39	98	II
Dieldryna	46	90	II
DDT	113-450	250-3000	II
Lindan	88-125	1000	III
Metoksychlor	6000	-	IV

### 9.2.4. Insektycydy piretroidowe

Piretroidy naturalne znane są i stosowane od wielu lat w zwalczaniu szkodników roślin i higienie zwierząt. **Piretryny I i II**, **cyneryny I i II** oraz **jasmoliny I i II** – estry powstałe z alkoholi: piretrolu, cynerolu i jasmolonu oraz kwasów: chry-

zantemowego i piretrowego – stanowią obok innych związków składniki wyciągu z koszyczków kwiatowych złocienia (*Chrysanthemum sp.*), który jest stosowany przeciwko pchłom. Najbardziej toksycznym insektycydem piretroidowym jest **piretryna I**.

W latach 70-tych XX wieku bazując na piretrynach otrzymano syntetyczne piretroidy światłotrwałe, np. **cympermetrynę** i **fenwalerat**. Charakterystyczne dla tej grupy insektycydów cechy to wybiórczość działania, duża aktywność szkodnikobójcza oraz mała toksyczność dla ludzi i zwierząt. Mała trwałość i szybki rozkład pod wpływem czynników zewnętrznych, szczególnie światła – sprawiły, że znalazły zastosowanie głównie do zwalczania szkodników w pomieszczeniach zamkniętych, w przechowalnictwie oraz higienie sanitarnej. Charakterystyka toksyczności wybranych piretroidów syntetycznych przedstawiona została w tabeli 9.6.

Piretroidy często łączy się z synergetykami – substancjami potęgującymi działanie pestycydu lub hamującymi proces nabierania odporności na daną substancję aktywną (synergetyki zwykle nie wykazują aktywności biologicznej). Do synergetyków należą pochodne piperyny (np. piperonylobutoksyd), siarczan (VI) sodu i amonu.

Do organizmu piretroidy syntetyczne dostają się przez układ pokarmowy, oddechowy i skórę. Łatwo rozpuszczają się w tłuszczach i przenikają do tkanki nerwowej. Piretroidy naruszają równowagę wapnia i sodu w komórkach, przez co hamują działanie niektórych enzymów i zaburzają proces przekazywania impulsów nerwowych.

Tabela 9.6. Charakterystyka toksyczności niektórych piretroidów syntetycznych.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Aletryna	620-1500	III
Cypermetryna	251-500	III
Fenwalerat	450	III
Permetryna	1500-4000	IV
Rozmetryna	1400-1600	III

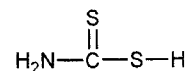
### 9.2.5. Fungicydy

Do najważniejszych środków grzybobójczych należą następujące substancje:

- nieorganiczne – siarka, polisiarczki baru i wapnia, sole miedzi (II),
- organiczne – ditiokarbaminiany, pochodne benzimidazolu (benomyl) oraz związki rtęcio- i cynoorganiczne.

Fungicydy mogą działać grzybobójczo, uniemożliwiając wzrost i rozwój grzybów, lub grzybobójczo. Hamują wówczas procesy rozwojowe grzybów w kontakcie bezpośrednim. Po usunięciu preparatu (splukanie wodą) grzybnia rozwija się dalej. Działają powierzchniowo lub układowo. Większość stosowanych obecnie fungicydów nie wykazuje toksyczności ostrej dla ssaków. Wyjątkiem są związki rtęciowe, które z powodu zagrożenia zdrowia i życia zwierząt czy ludzi wycofano ze stosowania w ochronie roślin.

**Ditiokarbaminiany** to pochodne kwasu ditiokarbaminowego o wzorze:



Są to substancje o małej toksyczności dla ssaków. Związki te należą do IV klasy toksyczności pestycydów. Przepuszczalne dawki śmiertelne dla człowieka wynoszą od 50 mg/kg (**tiuram**) do 5-15 g/kg (**zineb**). Do organizmu dostają się przez przewód pokarmowy i układ oddechowy, a następnie gromadzą się wybiórczo w tarczycy i gruczołach pciowych. Większość z nich utrzymuje się w organizmie do tygodnia (wyjątek: tiuram – do miesiąca) ulegając przemianom do bardziej toksycznych metabolitów (izotiocyaniany, etylenotiomocznik, CS<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S). Ditiokarbaminiany są bardziej niebezpieczne w kontakcie długotrwałym – potwierdzono ich działanie teratogenne, rakotwórcze i gonadotoksyczne. Są ciałami stałymi, o różnej rozpuszczalności w wodzie (sole litowców – dobrze rozpuszczalne, sole metali ciężkich i disiarczki – słabo rozpuszczalne). Najczęściej stosowane ditiokarbaminiany to: **ziram**, **zineb**, **maneb** i **tiuram (TMTD)**. Charakterystyka toksyczności wybranych ditiokarbaminianów przedstawiona została w tabeli 9.7.

Tabela 9.7. Charakterystyka toksyczności niektórych ditiokarbaminianów.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Maneb	7500	IV
Tiuram	865	IV
Zineb	5200	IV
Ziram	5000	IV

### 9.2.6. Herbicydy

**Herbicydy (środki chwastobójcze)** pochodzenia naturalnego to głównie pochodne kwasu indoliloctowego (stymulator wzrostu komórek roślinnych), gibbereliny (regulatory wzrostu roślin) i peptydy fosfinotrycyny (blokują syntezę niektórych aminokwasów). Herbicydy mogą działać wybiórczo, niszcząc niektóre gatunki roślin lub totalnie, niszcząc całe populacje roślin. Reagują z roślinami w sposób kontaktowy, np. parząco lub układowo, powodując zaburzenia czynności układów enzymatycznych i procesów fizjologicznych roślin. Herbicydy tej grupy znalazły zastosowanie w rolnictwie oraz przy konserwacji torów i autostrad. Działają chwastobójczo przez pobudzenie układu hormonalnego rośliny. Niekontrolowany rozrost części roślin powoduje ich zniszczenie. Działanie hormonalne jest wybiórcze, nie przenosi się na zwierzęta i ludzi.

Herbicydy nieorganiczne, np. chlorany, borany czy arseniany posiadają ograniczone znaczenie użytkowe i małe znaczenie toksykologiczne. Z kolei herbicydy organiczne – pochodne kwasu chlorofenoksyoctowego, dinitrofenole, związki bispirydylowe, pochodne mocznika i inne – wykazują duże znaczenie toksykologiczne z powodu zatruc ostrych i zagrożenia środowiskowego (Tabela 9.8).

Najbardziej znanymi przedstawicielami pochodnych kwasu chlorofenoksyoctowego są **kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)** i **2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T)** oraz ich sole i estry. Toksyczność ostra pochodnych 2,4-D wyrażona LD<sub>50</sub> wynosi 300-1000 mg/kg masy ciała dla różnych gatunków zwierząt doświadczalnych. Najbardziej wrażliwe są psy; LD<sub>50</sub> dla 2,4-D i 2,4,5-T wynosi 100 mg/kg masy ciała. Herbicydy tej grupy są zaliczane do III i IV klasy toksyczności. Zatrucie dużą dawką 2,4-D powoduje śmierć w wyniku migotania komór serca. Doustne lub pozajelitowe wprowadzenie mniejszych dawek powoduje u szczurów złożony zespół objawów: bezruch, apatię, depresję i śpiączkę. Pochodne kwasu dichlorofenoksyoctowego działają uczulająco, powodując przy kontakcie zapalenie skóry. Pod wpływem **2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxyny (TCDD)**, która występuje jako zanieczyszczenie, stwierdzono również działanie teratogenne i rakotwórcze.

Herbicydy należące do grupy związków pochodnych mocznika są najczęściej stosowane w rolnictwie. Występowanie chloru w cząsteczce zwiększa trwałość tych związków oraz przedłuża czas działania. Przedstawicielami tej grupy herbicydów są **monuron**, **diuron** i **linuron**, które wykazują małą toksyczność w stosunku do pszczoł i ssaków. Diuron wykazuje znaczną toksyczność dla ryb.



Tabela 9.8. Charakterystyka toksyczności niektórych herbicydów.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Tritlenek arsenu	138	II
Chloran sodu	5000	IV
2,4-D	375	III
2,4,5-T	500	III
TTCDD	0,02-0,045	I
Monuron	3600	IV
Diuron	3400	IV
Linuron	1500-4000	IV

### 9.2.7. Rodentycydy

Rodentycydy są to substancje stosowane do zwalczania gryzoni, takich jak szczury, czy myszy. Do środków gryzoniobójczych należą związki pochodzenia naturalnego (roślinne) lub syntetyczne:

- organiczne – np. pochodne kumaryny (warfaryna), pochodne tiomocznika (alfantyna), strychnina, scillirozyd;
- nieorganiczne – np. fosforek cynku, węglan baru, siarczan talu (Tabela 9.9).

Tabela 9.9. Charakterystyka toksyczności niektórych rodentycydów.

Nazwa zwyczajowa	LD <sub>50</sub> dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Scillirozyd	0,7	I
Strychnina	5	I
Warfaryna	540	III
Węglan baru	800	III
Siarczan talu	25	I
Fosforek cynku	47	II

**Alfantyna** blokuje działanie enzymów komórkowych, a **warfaryna** hamuje proces krzepnięcia krwi (antykoagulant) i uszkadza ścianki naczyń włosowatych narządów wewnętrznych. Warfaryna jest lipofilową cząsteczką o słabej rozpuszczalności w wodzie, działająca jako antagonistka witaminy K. Zatrucia objawiają się krwotokami. **Strychnina** to alkaloid występujący w nasionach kulczyby wrońskiego oka (*Strychnos nux-vomica*). Poraża ośrodkowy układ nerwowy i zakończenia nerwów. Symptomy zatrucia strychniną to konwulsje, drgawki, wywołuje paraliż. Z kolei **scillirozyd** działa jako silny glikozyd nasercowy występujący w czerwonej

cebuli (*Scilla maritima*) (*Liliaceae*). Powoduje drgawki i niewydolność oddechową. Jest szczególnie skuteczny przeciwko szczurom i myszom, ponieważ nie wywołuje u nich torsji. U innych zwierząt powoduje silne wymioty, które chronią je przed zatruciem.

## 9.3. Identyfikacja wybranych grup pestycydów

Z powodu olbrzymiej ilości substancji toksycznych występujących w środowisku człowieka, analiza toksykologiczna posługuje się metodami pozwalającymi zidentyfikować maksymalną liczbę toksyn w jednym procesie analitycznym. Do identyfikacji i oznaczania pestycydów zalecane są metody chromatograficzne: chromatografia cienkowarstwowa, gazowa i wysokosprawna chromatografia cieczowa.

### 9.3.1. Wykrywanie insektycydów fosforoorganicznych

#### METODA IZOLACJI Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO:

Próbkę materiału biologicznego doprowadzić do pH=7, a następnie ekstrahować 3-krotnie *n*-heksanem lub mieszaniną *n*-heksanu i 0,1% acetonu, używając każdorazowo porcje 3-krotnie większe od objętości próbki. Połączone ekstrakty należy suszyć bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a następnie uwolnić od rozpuszczalnika do objętości 0,5-1 cm<sup>3</sup>. Pozostałość poddaje się analizie chromatograficznej. Wydajność ekstrakcji wynosi 80-90%.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe insektycydów fosforoorganicznych (chlorfenwinfosu, fenitrotonu, malationu, metyloparationu) o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup> rozpuszczone w *n*-heksanie,
2. benzen,
3. *n*-heksan,
4. kwas octowy,
5. trichloroetylen,
6. odczynniki wywołujące:
  - 0,5% roztwór chlorku palladu (II) – 0,5 g PdCl<sub>2</sub> rozpuścić w kilku kroplach 25% HCl i uzupełnić wodą destylowaną do 100 cm<sup>3</sup>,
  - odczynnik Tollensa – zmieszać 9 cm<sup>3</sup> 5% roztworu AgNO<sub>3</sub> z 1 cm<sup>3</sup> 25% roztworu amoniaku (aby wywołać chromatogram należy płytkę ogrzewać przez 10 minut w temperaturze 105 °C),
  - jod,
  - 0,5% roztwór KMnO<sub>4</sub>,
7. płytki chromatograficzne firmy Merck DC-Plastikrolle Kieselgell 60 F<sub>254</sub>, lampa UV.

## WYKONANIE OZNACZENIA:

Na punkty startowe nanieść roztwory wzorcowe zawierające około 20 µg substancji. Obok, na 2-4 pozycjach umieścić analizowane ekstrakty. Następnie płytki włożyć do komory chromatograficznej z mieszaniną trichloroetylenu, benzenu, *n*-heksanu i kwasu octowego w stosunku 5:3:1:1 jako fazą ruchomą. Po wyjęciu i osuszeniu płytki w temperaturze pokojowej należy ją spryskać odczynnikami wywołującymi lub poddać działaniu promieni lampy UV. Wartości  $R_f$  są następujące:

Wykrywany pestycyd	$R_f \cdot 100$	Wywoływacz (zabarwienie plamy)				
		0,5% PdCl <sub>2</sub>	pary jodu	odczynnik Tollensa	0,5% KMnO <sub>4</sub>	lampa UV
Chlorfenwinfos	8,7	-	brązowa	-	-	fioletowa
Fenitrotion	12,7	żółta	brązowa	żółta	-	-
Malation	11,6	żółta	brązowa	żółta	-	fioletowa
Metyloparation	12,3	żółta	brązowa	żółta	-	fioletowa

## 9.3.2. Wykrywanie insektycydów karbaminianowych

## METODA IZOLACJI Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO:

Próbkę materiału biologicznego doprowadzić do pH=7. Ekstrakcji dokonuje się 3-krotnie różnymi rozpuszczalnikami w zależności od materiału: a) polarne: aceton, etanol – izolacja z tkanek; b) niepolarne: chloroform lub dichlorometan – izolacja z krwi, moczu, treści żołądka, używając każdorazowo porcje 3-krotnie większe od objętości próbki. Połączone ekstrakty należy suszyć bezwodnym Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a następnie uwolnić od rozpuszczalnika do objętości 0,5-1 cm<sup>3</sup>. Pozostałość poddaje się analizie chromatograficznej. Wydajność ekstrakcji wynosi 90-100%.

## ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe insektycydów karbaminianowych (aldikarbu, karbarylu, karbofuranu, propoksuru, pirykarmu) o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup> rozpuszczone w mieszaninie etanol-chloroform (1:1),
2. aceton,
3. cykloheksan,
4. eter dietylowy,
5. tetrachlorek węgla,
6. azydek sodu: 1g azydku w 100 cm<sup>3</sup> 0,005 mol/dm<sup>3</sup> roztworu KI,
7. Fast Blue B: 1g Fast Blue B w 10 cm<sup>3</sup> 9% etanolu,
8. 0,5% wodny roztwór KMnO<sub>4</sub>,
9. kwas octowy lodowaty,

10. stężony HCl,
11. 1% wodny roztwór skrobi,
12. 20% wodny roztwór KOH,
13. NaOH,
14. płytki chromatograficzne, lampa UV.

## WYKONANIE OZNACZENIA:

Na punkty startowe nanieść 100 µl roztworów wzorcowych oraz po kropli analizowanych ekstraktów. Następnie płytki włożyć do komory chromatograficznej z następującymi mieszaninami rozpuszczalników jako fazą ruchomą:

1. eter dietylowy – cykloheksan – aceton (1:1:1),
2. tetrachlorek węgla – kwas octowy lodowaty (8,5:1,5).

Po wysuszeniu chromatogramu należy zastosować następujące odczynniki wywołujące lub światło UV dla układów rozwijających:

## 1. eter dietylowy – cykloheksan – aceton (1:1:1):

Wykrywany pestycyd	$R_f \cdot 100$	Wywoływacz (zabarwienie plamy)		
		Azydek sodu	KMnO <sub>4</sub>	lampa UV
Aldikarb	60	brązowa	żółta	fioletowa
Karbaryl	69	brązowa	-	fioletowa
Karbofuran	69	brązowa	żółta	fioletowa
Propoksur	72	brązowa	-	fioletowa
Pirykarm	71	fioletowa	żółta	fioletowa

## 2. tetrachlorek węgla – kwas octowy lodowaty (8,5:1,5):

Wykrywany pestycyd	$R_f \cdot 100$	Wywoływacz (zabarwienie plamy)	
		Fast Blue B	lampa UV
Aldikarb	-	-	-
Karbaryl	58	fioletowo-różowa	brązowa
Karbofuran	51	pomarańczowa	-
Propoksur	43	pomarańczowa	-
Pirykarm	8	-	-

## 9.3.3. Wykrywanie insektycydów polichlorowych

## METODA IZOLACJI Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO:

Węglowodory chlorowane (patrz rozdział 9.2.3) wyodrębnia się z materiału biologicznego za pomocą ekstrakcji metodą Stass-Otto, która została opisana w rozdziale 4.4.

**ODCZYNNIKI:**

1. azotan (II) srebra, roztwór 0,1 mol/dm<sup>3</sup> w HNO<sub>3</sub>,
2. chloroform,
3. cykloheksan,
4. tetrachlorek węgla,
5. *p*-dimetyloaminoaniliny chlorowodorek, roztwór 0,5% w etanolu sodowym (1 g sodu w 100 cm<sup>3</sup> etanolu),
6. etanolowe roztwory wzorcowe o stężeniu 0,2%: aldryny, DDT, dieldryny, metoksychloru, heksachlorocykloheksanu (HCH),
7. eter etylowy,
8. etanoloamina,
9. *n*-heksan,
10. 0,5% roztwór KMnO<sub>4</sub> w 10% NaCO<sub>3</sub>,
11. rodamina B, roztwór 0,5% w etanolu,
12. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,
13. 10% roztwór NaCO<sub>3</sub>,
14. żel krzemionkowy.

**WYKONANIE OZNACZENIA:****a) zastosowanie płytek pokrytych tlenkiem glinowym**

Na punkty startowe nanieść roztwory wzorcowe zawierające około 20 µg substancji. Obok, na 2-4 pozycjach umieścić analizowane ekstrakty. Następnie płytki włożyć do komory chromatograficznej z *n*-heksanem jako fazą ruchomą. Czas rozwijania chromatogramu wynosi około 45 minut. Po wyjęciu i osuszeniu płytki w temperaturze pokojowej należy ją spryskać roztworem *p*-dimetyloaminoaniliny, a następnie spryskać wodą destylowaną i naświetlać przez 1 minutę lampą UV.

Węglowodory chlorowane są widoczne w postaci plam fioletowych przechodzących w zielone. Czulość metody wynosi 5 µg. Wartości R<sub>f</sub> na płytkach pokrytych tlenkiem glinowym są następujące:

Wykrywany pestycyd	Faza ruchoma	R <sub>f</sub>
Dieldryna	<i>n</i> -heksan	0,17-0,19
HCH	<i>n</i> -heksan	0,39-0,41
DDT	<i>n</i> -heksan	0,59-0,62
Aldryna	<i>n</i> -heksan	0,78-0,82

**b) zastosowanie płytek pokrytych żelem krzemionkowym**

Na punkty startowe nanieść roztwory wzorcowe zawierające około 20 µg substancji. Obok, na 2-4 pozycjach umieścić analizowane ekstrakty. Następnie płytki włożyć do komory chromatograficznej z chloroformem, eterem naftowym, cy-

kloheksanem lub tetrachlorkiem węgla. Wartości R<sub>f</sub> na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym są następujące:

Wykrywany pestycyd	Faza ruchoma	R <sub>f</sub>
DDT	chloroform	0,91
DDT	eter naftowy	0,44
α-HCH	eter naftowy	0,28
β-HCH	eter naftowy	0,02
γ-HCH	eter naftowy	0,19
δ-HCH	eter naftowy	0,16
Aldryna	cykloheksan	0,58
Dieldryna	cykloheksan	0,57

Aby uwidocznili plamy analizowanych substancji płytki należy spryskać:

- a) **roztworem rodaminą B** – pestycydy widoczne są w nadfiolecie jako różowe fluoryzujące plamy;
- b) **10% roztworem NaCO<sub>3</sub>** – pestycydy widoczne są w nadfiolecie jako żółte fluoryzujące plamy;
- c) **etanoloaminą, a następnie ogrzewać 100 °C przez 20 minut** – DDT i HCH widoczne są jako brązowe plamy, które można pogłębić spryskując roztworem azotanu srebrowego;
- d) **0,5% roztworem KMnO<sub>4</sub> z dodatkiem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – wykrycie aldryny, dieldryny i izodryny.

**9.3.4. Wykrywanie fungicydów****METODA IZOLACJI Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO:**

Fungicydy wyodrębnia się z materiału biologicznego za pomocą destylacji z parą wodną, która została opisana w rozdziale 4.2. Wcześniej próbkę materiału, np. mocz zakwasza i poddaje się hydrolizie we wrzącej łaźni wodnej w ciągu 1 godziny. W destylacji oznacza się poziom *o*-fenylofenolu metodą kolorymetryczną w reakcji z 2,6-dibromochinonochlorimidem.

**ODCZYNNIKI:**

1. alkohol etylowy,
2. 2,6-dibromochinonochlorimid: 15 mg w 10 cm<sup>3</sup> etanolu,
3. stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
4. etanolowy roztwór wzorcowy *o*-fenylofenolu: 100 µg w 1 cm<sup>3</sup>,
5. roztwór buforowy o pH=10: 2,8 g bezwodnego tetraboranu sodu i 10,5 g NaCO<sub>3</sub> w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej,

**WYKONANIE OZNACZENIA:**

20 cm<sup>3</sup> moczu zakwasić do pH=1 przy pomocy H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i poddać hydrolizie we wrzącej łaźni wodnej w ciągu 1 godziny. Następnie hydrolizat przenieść do kolby destylacyjnej i destylować z parą wodną. Destylację należy prowadzić z taką prędkością by 100 cm<sup>3</sup> destylatu zebrać w ciągu 20-30 minut. 10 cm<sup>3</sup> destylatu przenieść do 15-cm<sup>3</sup> kolby miarowej i dodać 2,5 cm<sup>3</sup> buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm<sup>3</sup> etanolowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Zawartość kolby uzupełnić wodą destylowaną.

Absorbancję zmierzyć przy długości fali 620 nm, używając jako próby ślepej wody destylowanej traktowanej analogicznie jak próba badana, tzn. 10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej przenieść do 15-cm<sup>3</sup> kolby miarowej i dodać 2,5 cm<sup>3</sup> buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm<sup>3</sup> etanolowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Zawartość kolby uzupełnić ponownie wodą destylowaną. Próbę wzorcową wykonać w następujący sposób: 10 cm<sup>3</sup> *o*-fenylofenolu przenieść do 15-cm<sup>3</sup> kolby miarowej i dodać 2,5 cm<sup>3</sup> buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm<sup>3</sup> etanolowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Zawartość kolby uzupełnić wodą destylowaną.

**9.3.5. Wykrywanie herbicydów****METODA IZOLACJI Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO:**

Herbicydy wyodrębnia się z materiału biologicznego za pomocą ekstrakcji w środowisku kwaśnym eterem według metody Curry, która została opisana w rozdziale 4.4.

**ODCZYNNIKI:**

1. aldehyd mrówkowy: roztwór 20 cm<sup>3</sup> formaliny w 5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu NaOH,
2. 0,5 % roztwór AgNO<sub>3</sub>,
3. eter naftowy,
4. odczynnik utleniający: HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) – przygotowany bezpośrednio przed użyciem,
5. parafina płynna,
6. metanolowe roztwory wzorcowe o stężeniu 0,2%: kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), kwasu 2-metylo-4-chloro-fenoksyoctowego (MCPA),
7. żel krzemionkowy G.

**WYKONANIE OZNACZENIA:**

Na punkty startowe nanieść roztwory wzorcowe zawierające około 20 µg substancji. Obok, na 2-4 pozycjach umieścić analizowane ekstrakty. Następnie płytki włożyć do komory chromatograficznej z mieszaniną eter naftowy-kwas octowy

lodowaty-parafina (10:1:2) jako fazą ruchomą. Czas rozwijania chromatogramu wynosi około 20 minut. Po wyjęciu i osuszeniu płytki w temperaturze pokojowej należy ją spryskać roztworem azotanu srebrowego, a następnie po wysuszeniu na płytce nanieść przy pomocy rozpylacza roztwór aldehydu mrówkowego. Po ponownym wysuszeniu płytki przez 30 minut w temperaturze 130 °C, płytkę spryskać odczynnikiem utleniającym. Po dokładnym osuszeniu płytkę naświetlić światłem UV. Identyfikację przeprowadzić przez porównanie wartości R<sub>f</sub> plam związków poszukiwanych z wartościami R<sub>f</sub> substancji wzorcowych (2,4-D i MCPA).

# 10 ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA

Powietrze, woda i gleba stanowią podstawowe elementy środowiska, których nadmierne zanieczyszczenie stwarza realne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi. Problem skażenia wód, atmosfery i gleb powinien być traktowany łącznie, ponieważ układy te są ze sobą powiązane i wzajemnie na siebie oddziałują. Spośród zanieczyszczeń środowiska można wyróżnić zanieczyszczenia biologiczne, fizyczne, radioaktywne oraz chemiczne. Głównym zagrożeniem dla ludzi, fauny i flory są związki organiczne pochodzenia antropogenicznego, np. pestycydy (patrz rozdział 9). Związki chemiczne lotne emitowane do powietrza łączą się z deszczem lub śniegiem, by w postaci opadów dostać się do wody i gleby. Z kolei substancje szkodliwe, które spływają z terenów przemysłowych i rolniczych do rzek i jezior po odparowaniu, jako związki lotne, zanieczyszczają atmosferę.

## 10.1. Źródła zanieczyszczeń środowiska

Główne źródła emisji związków toksycznych do środowiska naturalnego to:

1. emisje przemysłowe, motoryzacja i spalanie odpadów (substancje lotne);
2. odpady górnicze, energetyczne, przemysłowe i komunalne (substancje stałe);
3. ścieki miejskie i przemysłowe, osady ściekowe (substancje ciekłe i stałe);
4. spływ powierzchniowy po opadach deszczowych i burzowych z miejskich ulic;
5. wysypiska śmieci i zbiorniki odpadów;
6. oczyszczalnie ścieków i kompostowanie;

### 10.1. ŹRÓDŁA ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA

7. spalanie odpadów w miejscach i obiektach do tego celu nie przystosowanych;
8. nawozy i środki ochrony roślin (Ryc. 10.1).

Z kolei głównymi źródłami narażenia środowiskowego są:

1. żywność (substancje dodawane do żywności, naturalne toksyny czy chemiczne zanieczyszczenia);
2. pestycydy (ochrona roślin, zwierząt, żywności);
3. środki czystości, tworzywa sztuczne, kosmetyki i inne preparaty chemii gospodarczej;
4. skażenia biosfery (skażenie powietrza, gleby, wody, organizmów żywych).

Stężenie substancji szkodliwych w środowisku zależy od wielkości emisji z danego źródła, a ponadto:

1. w wodach powierzchniowych na zmiany stężenia związku toksycznego znaczny wpływ ma rozcieńczenie (szybkość prądu, np. rzeki);
2. adsorpcja na osadzie zawieszonym, sedymentacja osadów, odparowanie i degradacja z udziałem promieni słonecznych, biodegradacja z udziałem mikroorganizmów, itp.;
3. w osadach dennych na stężenie ksenobiotyków wpływa zależność pomiędzy świeżo zdeponowanym osadem a powierzchnią wody;
4. w glebach zawartość substancji toksycznych zależy od rodzaju nawożenia, stopnia czystości nawozów;
5. w glebach zawartość substancji toksycznych zależy od wielkości suchego i mokrego opadu atmosferycznego, stopnia wymywania substancji przez wody opadowe i gruntowe;
6. do wód podziemnych związki chemiczne przedostają się głównie z głębszych warstw gleby oraz przesiąkając przez wierzchnie jej warstwy, zwłaszcza na terenach piaszczystych;
7. w powietrzu atmosferycznym stężenie zanieczyszczeń zależy głównie od odległości od źródła emisji i intensywności degradacji i przemieszczania do wyższych obszarów i odwrotnie;
8. w organizmach wodnych stężenie związków chemicznych zależy od wielkości skażenia wody oraz współczynnika biokumulacji i biokoncentracji.

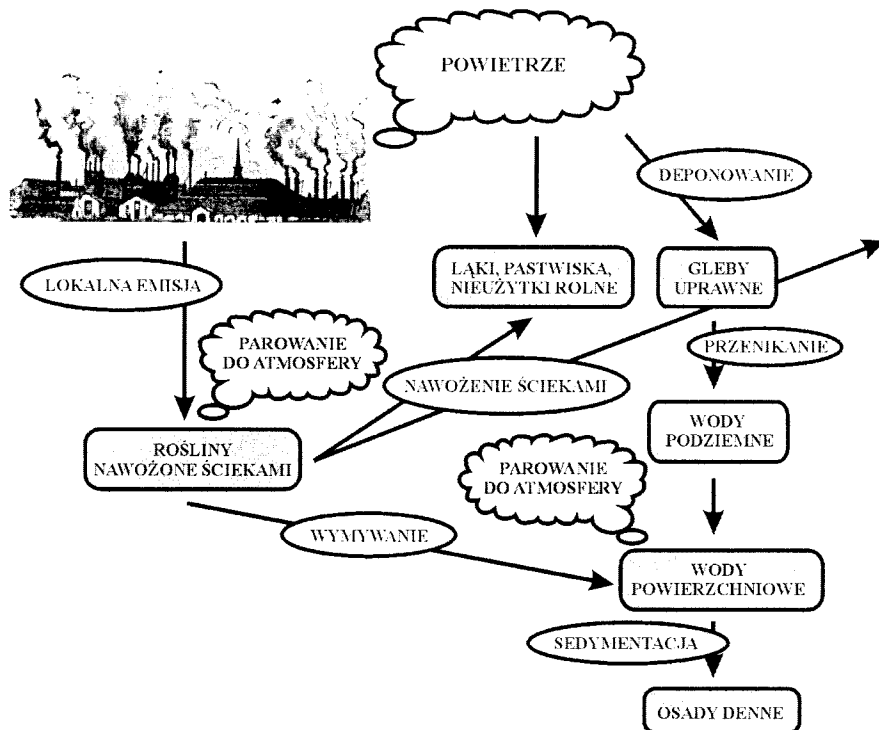
Skażenia wód, powietrza i gleb powodują w organizmie człowieka:

1. **zatrucia ostre**, które występują, np. w czasie katastrofy ekologicznej (pożar, eksplozja, rozlanie), a ich skutkiem mogą być trwałe uszkodzenie organizmu, a nawet śmierć;

2. **zatrucia przewlekłe** o różnej symptomatologii obejmują różnorodne narządy i układy.

Działanie szkodliwe substancji toksycznych zależy między innymi od:

1. formy fizycznej występowania zanieczyszczenia (gaz/para, ciecz lub ciało stałe), która decyduje o drodze wchłaniania;
2. dawki, drogi wchłaniania i czasu ekspozycji na zanieczyszczenie.



Ryc. 10.1. Drogi zanieczyszczenia środowiska.

## 10.2. Wskaźniki jakości wody

Woda odgrywa istotną rolę w przyrodzie jako rozpuszczalnik różnych substancji. Integruje wszystkie ekosystemy poprzez obieg w powietrzu, glebie, roślinach i zwierzętach. Wpływ na właściwości chemiczne wód mają takie czynniki jak: podłoże, szata roślinna, klimat i działalność człowieka.

Zanieczyszczenie wód jest procesem długotrwałym, bardzo często zauważalnym po paru latach. Ścieki niosące ze sobą wiele związków pochodzenia organicznego i nieorganicznego, obcych wodnemu środowisku naturalnemu, do-

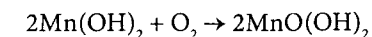
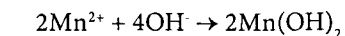
prowadzają do degradacji niekiedy całej biocenozy. Mogą być również zagrożeniem dla zdrowia i życia człowieka. Bardzo rzadko zmiany w składzie chemicznym wody powodują gwałtowne skutki uboczne. Procesy destrukcyjne zachodzą najczęściej powoli i często wymykają się spod kontroli człowieka. Woda nienadająca się do spożycia może być zanieczyszczona z przyczyn naturalnych lub w wyniku działalności człowieka. Zanieczyszczenia wynikające z powodu obumierania roślin czy zwierząt wodnych, z erozji związków mineralnych i organicznych z obrzeży gleb nadrzecznych w sposób skuteczny są usuwane przez mikroorganizmy wodne w procesie samooczyszczania. Rozwój rolnictwa, przemysłu oraz urbanizacja stanowi źródło zanieczyszczeń wód naturalnych, które najogólniej można podzielić na 5 grup:

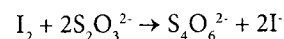
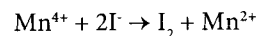
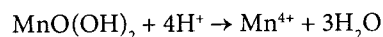
1. **zanieczyszczenia nieorganiczne**, rozpuszczalne w wodzie, np. azotany (III), azotany (V), ortofosforany (V), sole metali ciężkich, amoniak, które mogą występować nie tylko w postaci rozpuszczonej, ale także adsorbować się na cząstkach zawieszin;
2. **zanieczyszczenia organiczne**, rozpuszczone lub zaadsorbowane, np. węglowodory, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole, pestycydy;
3. **zanieczyszczenia radioaktywne** pochodzą z reaktorów jądrowych, z izotopów promieniotwórczych stosowanych w przemyśle, medycynie, np.  $^3\text{H}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ;
4. **zanieczyszczenia termiczne** są wynikiem wzrostu temperatury naturalnego środowiska wodnego, np. w konsekwencji używania wody jako czynnika chłodzącego w elektrowniach zarówno jądrowych jak i klasycznych;
5. **zanieczyszczenia biologiczne**, np. bakterie, glony, sinice.

Dla oceny ogólnego stopnia zanieczyszczenia wody oraz jej przydatności do określonych celów przyjęto oznaczać tzw. wskaźniki jakości wody. Jako podstawowe wskaźniki jakości wody przyjmuje się: temperaturę, zapach i smak, barwę, mętność, odczyn, zawiesinę, twardość wody, biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT), chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT), ogólną zawartość węgla organicznego (OWO), a także zawartość substancji rozpuszczonych.

### 10.2.1. Oznaczanie zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie

Zawartość tlenu w wodzie jest jednym z najważniejszych parametrów jakości wody. Do oznaczania zawartości tlenu stosuje się **metodę miareczkową Winklera**, podczas której zachodzą następujące reakcje:



**ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:**

1. roztwór KI w KOH,
2. 40% roztwór  $\text{MnSO}_4$ ,
3. stężony  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cz.d.a.,
4. tiosiarczan sodu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) – roztwór mianowany o stężeniu 10 mmol/dm<sup>3</sup>,
5. 0,5% roztwór skrobi,
6. biureta, strzykawki polietylenowe zaopatrzone w nakładane kapilary polietylenowe, kalibrowane na wlew butelki szklane.

Kalibrowaną na wlew butelkę szklaną z doszlifowanym korkiem napełnić całkowicie badaną próbą. Za pomocą oddzielnych strzykawek, wprowadzając ich końcówkę pod powierzchnię cieczy, dodać następujące roztwory: 2 cm<sup>3</sup> 40% roztworu  $\text{MnSO}_4$  i 2 cm<sup>3</sup> roztworu KI w KOH. Zamknąć butelkę korkiem, tak aby nie pozostał pod nim pęcherzyk powietrza i nie wypłynął wytrącający się osad. Zawartość butelki dokładnie wymieszać przez jej 20-30-krotne odwracanie, następnie pozostawić ją w ciemności przez około 0,5 godziny do momentu opadnięcia osadu. Barwa i ilość osadu wodorotlenku manganu (II) umożliwi orientacyjną ocenę zawartości tlenu w badanej próbce wody:

- osad brunatny wskazuje na dużą ilość tlenu,
- biały osad świadczy o zupełnym jego braku.

Następnie, gdy ciecz nad osadem będzie klarowna, dodać 2 cm<sup>3</sup>  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , wprowadzając końcówkę strzykawki pod powierzchnię cieczy. Zamknąć butelkę, zwracając uwagę na to, aby nie pozostał pod nim pęcherzyk powietrza i nie wypłynął osad. Po wymieszeniu do całkowitego rozpuszczenia się osadu, całą zawartość butelki przelać do kolby Erlenmayera o pojemności 500 cm<sup>3</sup> i natychmiast miareczkować roztworem tiosiarczanu sodu do uzyskania barwy jasnożółtej, a po dodaniu roztworu skrobi – do odbarwienia.

Stężenie tlenu (mg  $\text{O}_2$ /dm<sup>3</sup>) w badanej próbce wody obliczyć ze wzoru:

$$c_{\text{O}_2} = \frac{M_{\text{O}_2} \cdot c \cdot V}{f(V_{\text{but}} - f_1)}$$

gdzie:

- $V_{\text{but}}$  – objętość butelki (dm<sup>3</sup>),
- $V$  – objętość zużytego tiosiarczanu sodu (dm<sup>3</sup>),
- $c$  – stężenie roztworu tiosiarczanu sodu (M),
- $M_{\text{O}_2}$  – masa molowa tlenu (mg/mol),

- $f_1$  – objętość (cm<sup>3</sup>) dodanych roztworów  $\text{MnSO}_4$  i alkalicznego KI ( $f_1 = 4 \cdot 10^{-3}$ ),
- $f$  – współczynnik równoważności wynikający ze stosunku molowego reagujących substancji reakcji redoks ( $f=4$ ).

Następnie obliczyć procent nasycenia tlenem ( $\%_{\text{nas}}$ ) surowej próbki, korzystając ze wzoru:

$$\%_{\text{nas}} = \frac{c_{\text{O}_2} \cdot 100}{n}$$

gdzie:

- $c_{\text{O}_2}$  – oznaczona zawartość tlenu rozpuszczonego w badanej próbce wody (mg  $\text{O}_2$ /dm<sup>3</sup>),
- $n$  – zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie destylowanej o temperaturze badanej próbki wody, potrzebna do nasycenia jej tlenem (mg  $\text{O}_2$ /dm<sup>3</sup>) –Tabela 10.1.

Tabela 10.1. Ilość tlenu potrzebna do nasycenia 1 dm<sup>3</sup> wody destylowanej o temperaturze °C, stykającej się z powietrzem o zawartości 20,9% tlenu pod ciśnieniem 1013 hPa.

Temperatura wody (°C)	Rozpuszczalność tlenu (n) (mg $\text{O}_2$ /dm <sup>3</sup> )
0	14,62
1	14,23
2	13,84
3	13,48
4	13,13
5	12,80
6	12,48
7	12,17
8	11,87
9	11,59
10	11,33
11	11,08
12	10,83
13	10,60
14	10,37
15	10,15

Temperatura wody (°C)	Rozpuszczalność tlenu (n) (mg $\text{O}_2$ /dm <sup>3</sup> )
16	9,95
17	9,74
18	9,54
19	9,35
20	9,17
21	8,99
22	8,83
23	8,68
24	8,53
25	8,38
26	8,22
27	8,07
28	7,92
29	7,77
30	7,63

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.2), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

Tabela 10.2. Wartości graniczne wybranych wskaźników tlenowych w klasach jakości wód powierzchniowych.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach				
		I	II	III	IV	V
Tlen rozpuszczony	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	7	6	5	4	< 4
BZT <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	2	3	6	12	> 12
ChZT-Mn	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	3	6	12	24	> 24
ChZT-Cr	mg O <sub>2</sub> /dm <sup>3</sup>	10	20	30	60	> 60
Ogólny węgiel organiczny	mg C/dm <sup>3</sup>	5	10	15	20	> 20

### 10.2.2. Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen

Stopień zanieczyszczenia wód przez substancje organiczne, które ulegają metabolizmowi, można oznaczyć przeprowadzając test określany jako **biochemiczne zapotrzebowanie na tlen** (BZT). Polega on na pomiarze ilości tlenu potrzebnego mikroorganizmom wodnym do rozkładu substancji organicznej w określonych warunkach w przez okres 5 dób. Proces biochemicznego utlenienia substancji organicznych przebiega w dwóch fazach. W fazie pierwszej zachodzi rozkład związków organicznych, a w drugiej utlenianie amoniaku, powstałego z zanieczyszczeń azotowych i utleniania biomasy. Druga faza zaczyna się zwykle po dziesięciu dobach, tj. po wyczerpaniu przez mikroorganizmy związków węgla jako substancji pokarmowych. Z tego względu przy oznaczaniu BZT należy brać pod uwagę tylko pierwszą fazę biodegradacji, gdzie proces rozkładu zachodzi najintensywniej, tj. okres 5 dób. Natomiast prawie całkowity rozkład, prowadzący do przekształcenia związków organicznych w proste, stabilne związki nieorganiczne, następuje zazwyczaj po 20 dobach.

BZT jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem do określania sumarycznej zawartości rozkładanych biochemicznie zanieczyszczeń organicznych w wodach i ściekach. Najczęściej wykorzystywanym sposobem oznaczenia BZT jest metoda rozcieńczeń z chemicznymi oznaczeniami stężenia tlenu w próbce na początku i na końcu okresu inkubacji, który trwa 5 dób. Ze względu na biochemiczne procesy stale przebiegające w pobranej próbce wody, oznaczenie BZT powinno być wykonane jak najszybciej od momentu pobrania próbki (nie później niż po upływie 2 godzin). Jeśli nie jest to możliwe, to badaną wodę lub ścieki należy pobrać do szklanych butelek, utrwalić przez ochłodzenie do temperatury 2-5 °C i przechowywać w ciemności maksymalnie 24 godziny.

### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór KI w KOH,
2. 40% roztwór MnSO<sub>4</sub>,
3. stężony H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cz.d.a.,
4. tiosiarczan sodu (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) – roztwór mianowany o stężeniu 10 mmol/dm<sup>3</sup>,
5. 0,5% roztwór skrobi,
6. biureta, strzykawki polietylenowe zaopatrzone w nakładane kapilary polietylenowe, kalibrowane na wlew butelki szklane.

Dwie butelki inkubacyjne napełnić wodą do rozcieńczeń o znanej zawartości tlenu, zamknąć tak aby nie zostawić pod korkiem pęcherzyka powietrza i wstawić do ciepłarki w temperaturze 20 °C. Zmierzone objętości ścieków odmierzyć do butelek inkubacyjnych, dopełnić wodą do rozcieńczeń tak, aby próba ścieków pozostała niewymieszana na dnie, zamknąć, wymieszać i wstawić do ciepłarki. Po zakończeniu okresu inkubacji butelki wyjąć z ciepłarki i przeprowadzić oznaczenie zawartości tlenu (mg) w każdej butelce (patrz rozdział 10.2.1).

Obliczenie BZT polega na zbilansowaniu ubytku tlenu podczas inkubacji i odniesieniu go do objętości ścieków. Ilość tlenu (mg O<sub>2</sub>) w każdej butelce należy obliczyć za pomocą następujących wzorów:

$$O_{WT} = [O]_{WT} \cdot (V_{but} - V_{sc})$$

$$O_{sc} = [O]_{sc} \cdot V_{sc}$$

$$O_k = \frac{V \cdot c \cdot M_{O_2} \cdot V_{but}}{f(V_{but} - f_1)}$$

a na ich podstawie obliczyć wartość BZT (mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) dla danego rozcieńczenia:

$$BZT = \frac{O_{WT} + O_{sc} - O_k}{V_{sc}}$$

gdzie:

- O<sub>WT</sub> – zawartość tlenu końcowego w wodzie do rozcieńczeń (mg O<sub>2</sub>),
- O<sub>sc</sub> – zawartość tlenu początkowego w ściekach (mg O<sub>2</sub>),
- O<sub>k</sub> – zawartość tlenu końcowego w inkubowanej próbce (mg O<sub>2</sub>),
- [O]<sub>WT</sub> – stężenie tlenu w wodzie do rozcieńczeń po inkubacji (mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>),
- [O]<sub>sc</sub> – stężenie tlenu w ściekach do rozcieńczeń przed inkubacją (mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>),
- V<sub>but</sub> – objętość butelki kalibrowanej na wylew (dm<sup>3</sup>),
- V<sub>sc</sub> – objętość próby ścieków znajdującej się w butelce inkubowanej (dm<sup>3</sup>),
- V – objętość titranta (dm<sup>3</sup>),
- M<sub>O<sub>2</sub></sub> – masa molowa tlenu (mg/mol),
- f<sub>1</sub> – objętość (dm<sup>3</sup>) dodanych roztworów siarczanu manganu i alkalicznego jodku potasu (f<sub>1</sub> = 4 · 10<sup>-3</sup>),
- f – współczynnik równoważności wynikający ze stosunku molowego reagujących substancji reakcji redoks (f = 4).



Do obliczeń należy wziąć pod uwagę wartość stężenia tlenu w wodzie do rozcieńczeń po inkubacji, ponieważ tylko ten tlen może być zużyty na utlenianie substancji organicznych zawartych w próbce ścieków. Za miarodajne uznaje się tylko to rozcieńczenie, przy którym zużycie tlenu wynosi minimum  $2 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ , a końcowe stężenie tlenu w butelce inkubacyjnej nie jest niższe od  $1 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ .

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.2), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

### 10.2.3. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen

**Chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT)** jest pojęciem umownym, które oznacza ilość tlenu (pobranego z utleniacza) potrzebnego do utlenienia związków organicznych i niektórych nieorganicznych, np. soli żelaza (II), azotanów (III), siarczanów (IV) lub siarczków. Utlenienie związków organicznych nie zawsze przebiega w 100% i zależy od wielu czynników, tj. rodzaju utleniacza, warunków pomiaru ChZT i rodzaju substancji zawartych w badanych próbkach. Dlatego też oznaczanie należy wykonać w ściśle określonych warunkach, ustalonych w metodyce oznaczania, a przy wyniku podać stosowaną metodę.

Oznaczenie ChZT można przeprowadzić kilkoma metodami, różniącymi się użytym utleniaczem:

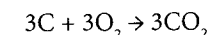
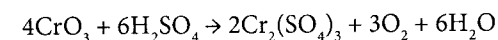
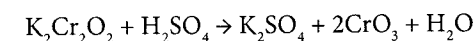
- za pomocą dichromianu (VI) potasu ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) (**metoda dichromianowa**) – oznaczenie  $\text{ChZT}_{\text{Cr}}$  dla ścieków,
- za pomocą manganianu (VII) potasu ( $\text{KMnO}_4$ ) (**metoda nadmanganianowa**) – oznaczenie  $\text{ChZT}_{\text{Mn}}$  w przypadku analizy wód,
- za pomocą jodanu potasu (**metoda jodanowa**).

Wymienione metody stosowane są najczęściej do manualnego oznaczania ChZT. Polegają one na traktowaniu próbki wody lub ścieków nadmiarem utleniacza, reakcji utleniania związków w podwyższonej temperaturze przez okres do 2 godzin i miareczkowaniem nadmiaru utleniacza. Opracowano również kilka wersji instrumentalnego oznaczania ChZT z zastosowaniem dichromianu jako utleniacza. W niniejszym rozdziale zostanie przedstawione oznaczanie ChZT metodą dichromianową.

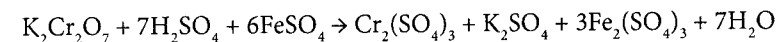
Pod wpływem dichromianu dobrze utleniają się cukry, związki alifatyczne z bocznymi łańcuchami i podstawione związki aromatyczne. Natomiast benzen i jego homologi, pirydyna oraz inne związki heterocykliczne zawierające azot, mocznik, parafiny, nafteny oraz pozostałe związki trudno rozpuszczalne w wodzie, praktycznie nie ulegają utlenieniu w warunkach metody dichromianowej. W celu utlenienia związków alifatycznych o prostym łańcuchu dodaje się siarczynu (VI) srebra jako katalizatora. W tych warunkach stopień utlenienia wielu testowych substancji osiąga 95-98%. Utlenieniu ulega także część węglowa związków

azotowych. Natomiast amoniak i związki amonowe, wydzielone na skutek rozkładu białek, nie są utleniane przez dichromian. Jony chlorkowe ulegają utlenieniu do wolnego chloru, zawyżając wynik oznaczenia. Przeciwdziała się temu najczęściej przez użycie siarczynu rtęci (II), który z jonami chlorkowymi tworzy rozpuszczalny związek kompleksowy. Wynik oznaczenia zawyżany jest także w obecności jonów żelaza (II), siarczanowych (IV), azotanowych (III), które utleniają się w warunkach prowadzenia reakcji. Oznaczenie  $\text{ChZT}_{\text{Cr}}$  polega na dodaniu do próbki wody, siarczynu rtęci (II) w ilości zależnej od stężenia jonów chlorkowych, nadmiaru mianowanego wodnego roztworu dichromianu (VI) potasu oraz stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  z  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ . Całość utrzymywana jest w stanie wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny.

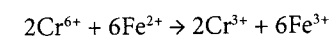
Utlenianie węgla przebiega ilościowo zgodnie z reakcją:



Początkowe stężenie  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  wynosi 7 M, natomiast  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 9 M. Po ostudzeniu nadmiar dichromianu należy oznaczyć poprzez miareczkowanie roztworem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{FeSO}_4$ , tzw. soli Mohra wobec ferroiny jako wskaźnika. W trakcie miareczkowania zachodzi reakcja:



podczas, której:



W analogiczny sposób należy oznaczyć próbę ślepą, używając wody destylowanej. Metoda daje dobre rezultaty dla wartości ChZT powyżej  $50 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  i przy zawartości jonów chlorkowych poniżej  $2,0 \text{ g}/\text{dm}^3$ . Gdy badana próbka zawiera azotany (III), należy dodać  $10 \text{ mg}$  kwasu amidosulfonowego na  $1 \text{ mg}$  azotanów (III). Ze względu na dość długi czas trwania oznaczenia standardowego (ponad 2 godziny) opracowano szereg modyfikacji tej metody, stosując krótszy czas utleniania i wyższe stężenie kwasu, pozwalające uzyskać wyższą temperaturę reakcji dzięki czemu czas utleniania w temperaturze wrzenia skrócono do 10 minut.

Oznaczenie  $\text{ChZT}_{\text{Cr}}$  należy wykonać w ciągu 4 godzin od chwili pobrania próby wody. Jeśli nie jest to możliwe, należy analizowaną próbę przechowywać w butelkach szklanych lub polietylenowych (przy małych wartościach ChZT zaleca się stosowanie tylko szklanych naczyń), utrwalić poprzez ochłodzenie do temperatury  $2-5 \text{ }^\circ\text{C}$  i przechowywać w ciemności lub zakwasić  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do  $\text{pH} \leq 2$ . Maksymalny czas przechowywania próby wynosi 5 dni.

**ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:**

1. stężony  $H_2SO_4$  cz.d.a.,
2.  $Ag_2SO_4$  (katalizator),
3. 0,2 M roztwór  $K_2Cr_2O_7$  z katalizatorem  $HgSO_4$ ,
4. 0,05 M roztwór soli Mohra –  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ,
5. roztwór ferroiny (wskaźnik),
6. pipety, kolba Erlenmayera, cylindry miarowe, biureta.

**WYKONANIE OZNACZENIA:****a) mianowanie roztworu soli Mohra**

Do kolby stożkowej odmierzyć  $90\text{ cm}^3$  wody destylowanej i  $27\text{ cm}^3$   $H_2SO_4$ . Roztwór oziębić. Dodać  $10\text{ cm}^3$  mianowanego roztworu  $K_2Cr_2O_7$ , 5 kropli ferroiny i miareczkować roztworem soli Mohra do zmiany zabarwienia z zielononiebieskiego na czerwono-brunatne. Mianowanie należy przeprowadzić każdorazowo w dniu oznaczania ChZT.

**b) oznaczenie ChZT w próbie badanej**

Do kolby dokładnie odmierzyć  $10\text{ cm}^3$  badanej próby oraz  $10\text{ cm}^3$  roztworu  $K_2Cr_2O_7$  z  $HgSO_4$ . Następnie ostrożnie wlać po ściance kolby  $27\text{ cm}^3$   $H_2SO_4$  z  $Ag_2SO_4$  i natychmiast połączyć kolbę z chłodnicą zwrotną. Roztwór wymieszać i ogrzewać do wrzenia. Utrzymywać go w stanie wrzenia przez 10 minut. Wyłączyć ogrzewanie, odstawić płaszcz grzejny, a w jego miejsce podłożyć metalowy pierścień pod kolbkę. Po 10 minutach od wyłączenia ogrzewania spłukać chłodnicę  $80\text{ cm}^3$  wody destylowanej. Odłączyć kolbę od chłodnicy, ochłodzić zawartość, dodać 5 kropli ferroiny i miareczkować roztworem soli Mohra. Jeśli w reakcji utleniania zużyte zostanie ponad 80% początkowej ilości dichromianu, powtórzyć oznaczenie, rozcieńczając odpowiednio próbę.

**c) oznaczenie ChZT w próbie kontrolnej**

Postępować analogicznie jak z próbą badaną, stosując  $10\text{ cm}^3$  wody destylowanej zamiast próby badanej

Stężenie roztworu soli Mohra ( $C_{Fe}$ ) zużytej na miareczkowanie próby badanej obliczyć według wzoru:

$$C_{Fe} = \frac{f \cdot C_{Cr} \cdot V_{Cr}}{V_{Fe}}$$

gdzie:

- f – współczynnik równoważności wynikający z równania reakcji redoks ( $f=6$ ),
- $C_{Cr}$  – stężenie roztworu  $K_2Cr_2O_7$  użytego do miareczkowania (M),

$V_{Cr}$  – objętość roztworu  $K_2Cr_2O_7$  użytego do miareczkowania ( $dm^3$ ),

$V_{Fe}$  – objętość roztworu soli Mohra użyta na miareczkowanie ( $dm^3$ ).

Wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) obliczyć z równania:

$$ChZT = \frac{M_{O_2} (V_{Fe}^{sl} - V_{Fe}^{pr})}{f \cdot V_{pr}}$$

gdzie:

$M_{O_2}$  – masa molowa tlenu (mg/mol),

$V_{Fe}^{sl}$  – objętość roztworu soli Mohra zużyta na miareczkowanie próby ślepej ( $dm^3$ ),

$V_{Fe}^{pr}$  – objętość roztworu soli Mohra zużyta na miareczkowanie próby badanej ( $dm^3$ ),

f – współczynnik równoważności wynikający z równania reakcji redoks ( $f=4$ ),

$V_{pr}$  – objętość badanej próby wody lub ścieków ( $dm^3$ ).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.2), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

**10.2.4. Oznaczenie zawartości ogólnej węgla organicznego w wodzie**

Zawartość związków organicznych w wodzie i ściekach jest określana różnorodnymi pośrednimi metodami, m. in. chemicznym zapotrzebowaniem na tlen (ChZT), biochemicznym zapotrzebowaniem na tlen (BZT). Oznaczenia zawartości ogólnej węgla organicznego (OWO) pozwala także określić zawartość związków organicznych. Wykazano istnienie korelacji pomiędzy OWO a BZT i ChZT. BZT oznacza zawartość łatwo rozkładalnych substancji organicznych, ChZT – substancji podatnych na utlenienie silnymi utleniaczami w podwyższonej temperaturze, OWO – wszystkich substancji organicznych.

Zawartość węgla organicznego oznacza się po spalaniu związków organicznych do ditlenku węgla, który oznacza się następującymi metodami: miareczkowaną, konduktometryczną, kulometryczną, spektrofluorymetryczną, spektrofotometryczną w podczerwieni, czy chromatograficzną. Spalanie przeprowadza się w niskich i wysokich temperaturach. W niskich temperaturach stosuje się silne utleniacze lub promieniowanie UV, w wysokich ( $650-1200\text{ }^\circ\text{C}$ ) – wspomaganie katalizatorami, takimi jak: Pd, Pt, CuO, CuO/Fe, BaCrO<sub>4</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> lub V<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Przy oznaczeniu zawartości węgla organicznego metodą spalania związków organicznych należy wcześniej usunąć węgiel nieorganiczny lub równolegle go oznaczyć oraz odjąć od ogólnej zawartości węgla. Przy oznaczeniu węgla organicznego rozróżnia się następujące jego formy:

- ogólny węgiel organiczny (OWO),
- rozpuszczony węgiel organiczny (RWO),

- nierozpuszczony węgiel organiczny (NWO) (w zawiesinie),
- lotny węgiel organiczny (LWO) (lotne substancje organiczne).

**Metoda spektrofotometrii w podczerwieni** pozwala na oznaczenie zawartości węgla organicznego i nieorganicznego w zakresie 1-1000 mg/dm<sup>3</sup> C. W przypadku większych stężeń należy próbkę rozcieńczyć, natomiast mniejszych – zagęścić lub wprowadzać do aparatu pomiarowego próbki o większych objętościach.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- wzorcowe roztwory węgla organicznego:
  - rozpuścić 0,5571 g bezwodnego szczawianu sodu w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> zawiera 0,1 mg C<sub>org</sub>),
  - rozpuścić 0,2128 g bezwodnego wodoroftalanu potasu w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> zawiera 0,1 mg C<sub>org</sub>),
- wzorcowe roztwory węgla nieorganicznego: rozpuścić 0,35 g NaHCO<sub>3</sub> i 0,4418 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> zawiera 0,1 mg C<sub>nieorg</sub>),

**Roztwory wzorcowe są nietrwałe, należy je sporządzać bezpośrednio przed oznaczeniem.**

- tlen lub powietrze niezawierające CO<sub>2</sub> i związków organicznych,
- stężony HCl,
- woda 2-krotnie destylowana,
- analyzer ogólnego węgla organicznego, mikser do homogenizowania próbek wody, mieszadło magnetyczne, strzykawki o pojemności 0-50, 0-500 μl.

#### WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ:

Do kolb miarowych o pojemności 100 cm<sup>3</sup> odmierzyć kolejno: 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 cm<sup>3</sup> wzorcowego roztworu A lub B węgla organicznego lub nieorganicznego, rozcieńczyć wodą destylowaną do kreski. Zawartość węgla w próbach wzorcowych wynosi odpowiednio: 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 mg/dm<sup>3</sup> C. Z uzyskanych pomiarów w spektrofotometrze na podczerwień (lub analitycznym ogólnego węgla organicznego) wykreślić krzywą wzorcową.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do pobierania próbek wody i ścieków należy stosować butelki szklane lub z tworzyw sztucznych, po sprawdzeniu, że nie powodują zanieczyszczenia wody substancjami organicznymi. Próby można przechowywać w temperaturze 4-6 °C przez okres 2 godzin po pobraniu. Jeżeli oznaczenia nie można przeprowadzić bezpośrednio, próbkę należy zakwasić do pH ≤ 2, np. za pomocą stężonego HCl lub H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Do kanału C<sub>org</sub> analizatora ogólnego węgla organicznego wprowadzić 20 μl próby badanej (oznaczenie zawartości węgla organicznego i nieorganicznego). Do kanału C<sub>nieorg</sub> analizatora wstrzyknąć kolejne 20 μl próby badanej (oznaczenie zawartości węgla nieorganicznego). Z różnicy między ogólną zawartością węgla a zawartością węgla nieorganicznego można obliczyć zawartość ogólną węgla organicznego (OWO).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.2), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

#### 10.2.5. Oznaczanie twardości wody oraz zawartości wapnia i magnezu w wodzie

**Twardość ogólna** jest to całkowita zawartość kationów dwuwartościowych w wodzie. W wodach naturalnych istnieje przewaga jonów wapnia i magnezu nad innymi jonami dwuwartościowymi. Dlatego też o twardości ogólnej wody decyduje stężenie jonów wapnia i magnezu. Toksyczność metali, takich jak: kadm, kobalt, miedź i cynk, jest wyższa w wodach miękkich. Przy wyższej twardości wody łatwiej wytrącają się zanieczyszczenia, które następnie trafiają do osadów dennych i organizmów tam żyjących, na które mogą oddziaływać niekorzystnie. W Polsce obowiązującymi jednostkami twardości ogólnej jest stopień niemiecki (°n) lub miligramrównoważnik (mval/dm<sup>3</sup>), które wynoszą: 1 °n = 10 mg/dm<sup>3</sup> CaO lub 17,84 mg/dm<sup>3</sup> CaCO<sub>3</sub>; 1 mval/dm<sup>3</sup> = 20,04 mg/dm<sup>3</sup> CaO lub 50,04 mg/dm<sup>3</sup> CaCO<sub>3</sub>. Opisowe określenia skali twardości wody przedstawia tabela 10.3.

Tabela 10.3. Skala twardości wody.

Stopień twardości (°n)	mg/dm <sup>3</sup> CaCO <sub>3</sub>	mval/dm <sup>3</sup>	Skala twardości wody
0-5	0-90	0-1,78	bardzo miękka
5-10	90-180	1,78-3,57	miękka
10-15	180-270	3,57-5,35	o średniej twardości
15-20	270-360	5,35-7,13	o znacznej twardości
20-30	360-450	7,13-10,70	twarda
> 30	> 450	> 10,70	bardzo twarda

Twardość wody można oznaczać następującymi metodami: a) obliczeniową, b) wersenianową.

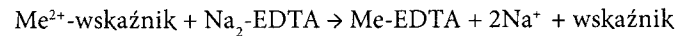
Próbę wody przeznaczoną do pomiaru twardości wody należy analizować w ciągu 24 godzin od pobrania. Jeżeli oznaczenia nie można przeprowadzić bezpośrednio, próbkę należy zakwasić do pH ≤ 2, np. za pomocą stężonego HCl lub H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Umożliwia to przechowywanie próby przez okres miesiąca.

Najdokładniejszą metodą określenia twardości wody jest obliczenie jej na podstawie wyników oznaczania wapnia i magnezu (**metoda obliczeniowa**). W przypadku gdy w badanej wodzie występują w znacznych ilościach inne kationy wpływające na twardość, należy koniecznie oznaczyć ich stężenie. Twardość wody oblicza się wtedy jako sumę pomnożonych stężeń wszystkich kationów przez mnożniki przedstawione w tabeli 10.4. Zatem twardość wody będzie stanowić sumę otrzymanych w ten sposób stężeń kationów wyrażoną w mval/dm<sup>3</sup>.

Tabela 10.4. Współczynniki przeliczeniowe do obliczania twardości wody.

Kation	Mnożnik	Kation	Mnożnik
Ca <sup>2+</sup>	0,04990	Fe <sup>3+</sup>	0,05372
Mg <sup>2+</sup>	0,08224	Al <sup>3+</sup>	0,11120
Sr <sup>2+</sup>	0,02282	Zn <sup>2+</sup>	0,03059
Fe <sup>2+</sup>	0,03581	Mn <sup>2+</sup>	0,07281

**Metoda wersenianowa** stosowana jest do oznaczeń twardości ogólnej wody powyżej 0,357 mval/dm<sup>3</sup> (1 stopień twardości, 17 mg/dm<sup>3</sup> CaCO<sub>3</sub>). Z kolei wody naturalnej o twardości wody równej lub mniejszej od 0,357 mval/dm<sup>3</sup> na ogół nie spotyka się. Woda ta ma zastosowanie do celów technicznych lub kondensatów. Metoda wersenianowa opiera się na tworzeniu przez wersenian sodu kompleksów z różnymi kationami metali (Me):



Miareczkując roztwór przy pH=10 oraz w obecności czerni eriochromowej T, można dodatkowo oznaczyć sumę wapnia i magnezu, natomiast miareczkowanie przy pH=12 wobec mureksydu pozwala oznaczyć wyłącznie zawartość wapnia.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g Na<sub>2</sub>-EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm<sup>3</sup>,
- 0,1 M roztwór HCl,
- bufor amoniakalny (pH=10): rozpuścić 26,8 g NH<sub>4</sub>Cl w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i mieszać z 300 cm<sup>3</sup> 25% roztworu NH<sub>4</sub>OH; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50 cm<sup>3</sup> 0,05 M roztworu MgSO<sub>4</sub> oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M Na<sub>2</sub>-EDTA, którą należy określić przez zmiareczkowanie roztworu MgSO<sub>4</sub>. Dodać 5 cm<sup>3</sup> roztworu buforowego do 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i zmierzyć odczyn tego roztworu (pH=10),
- czern eriochromowa T (wskaźnik): rozetrzeć 0,5 g czerni eriochromowej T ze 100 g NaCl,

- siarczek sodu: rozpuścić 5 g Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O lub 3,7 g Na<sub>2</sub>S·5H<sub>2</sub>O w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej,
- 1% roztwór chlorowodoru hydroksylaminy (NH<sub>2</sub>-OH·HCl),
- pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć odpowiednią ilość wody, taką by na jej zmiareczkowanie nie trzeba było zużyć więcej niż 15 cm<sup>3</sup> roztworu wersenianu sodu. Orientacyjnie można przyjąć, że dla zakresu twardości > 20 mval/dm<sup>3</sup> należy odmierzyć do oznaczania 25 cm<sup>3</sup> wody, dla twardości 10-20 mval/dm<sup>3</sup> – 100 cm<sup>3</sup> wody, dla twardości 5-10 mval/dm<sup>3</sup> – 200 cm<sup>3</sup> wody, a dla twardości 0,357-5 mval/dm<sup>3</sup> – 250 cm<sup>3</sup> wody. Próbkę wody mniejszą niż 50 cm<sup>3</sup> należy dopełnić wodą destylowaną do tej objętości.

Do odmierzonej ilości wody dodać taką ilość 0,1 M roztworu HCl jaką zużyto do oznaczenia ogólnej zasadowości wody (patrz rozdział 10.3.3) oraz 0,5 cm<sup>3</sup> 0,1 M HCl. Następnie ogrzewać próbkę wody do wrzenia i utrzymywać w tym stanie 1 minutę. Ostudzić zawartość kolby do temperatury 20 °C. Dodać 1 cm<sup>3</sup> roztworu buforowego na każde 50 cm<sup>3</sup> roztworu w kolbie, a następnie tak samo na każde 50 cm<sup>3</sup> po 1 cm<sup>3</sup> roztworu chlorowodoru hydroksylaminy i po 0,1 cm<sup>3</sup> roztworu siarczku sodu oraz 0,1 g wskaźnika czerni eriochromowej T. Natychmiast miareczkować 0,01 M roztworem Na<sub>2</sub>-EDTA do zmiany zabarwienia z czerwonego na błękitne. Pod koniec miareczkowania, gdy pojawi się zabarwienie fioletowe roztworu należy dodawać roztwór wersenianu po kropli i za każdym razem mieszać zawartość kolby. Jeżeli po 2-3 minutach barwa zmiareczkowanej próbki nie ulegnie zmianie, należy miareczkowanie uznać za zakończone.

Twardość wody (T<sub>w</sub>) obliczyć według wzoru:

$$T_w = \frac{V \cdot 0,02 \cdot 1000}{V_{pr}} \left( \text{mval} / \text{dm}^3 \right)$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA zużyta do miareczkowania próbki (cm<sup>3</sup>),  
 V<sub>pr</sub> – objętość badanej próbki (cm<sup>3</sup>),  
 0,02 – współczynnik przeliczeniowy określający ilość wapnia i magnezu odpowiadającą 1 cm<sup>3</sup> 0,01 M roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA (mval).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.3), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej skali twardości.

Związki wapnia znajdują się w wodach naturalnych w największych ilościach w przeliczeniu na kationy ogólnej zawartości soli mineralnych. Związki wapnia, występujące w postaci kamienia wapiennego, dolomitów i gipsu w złożach na-

turalnych, warstwach wodonośnych i glebie VI ulegają rozpuszczaniu w wodzie z nimi się stykającej. Przechodzą one do wody w postaci wodorowęglanów i siarczanów. Związki wapnia mogą pochodzić również z zanieczyszczeń w formie odpadów i ścieków przemysłowych. Niskie stężenia soli wapnia w wodzie przeciwdziałają korozji przewodów metalowych, tworząc na ich powierzchni warstwy ochronne. Większe ilości soli wapnia występujących w wodzie ulegają rozkładowi w podwyższonej temperaturze i tworzą kamień w kotłach parowych, przewodach i naczyniach domowych do gotowania wody.

Związki magnezu występują niemal zawsze w naturalnych wodach powierzchniowych i podziemnych. Stężenie związków magnezu jest na ogół niższe od związków wapnia (przeciętnie 1:4). Do oznaczenia zawartości wapnia i magnezu w wodzie stosuje się metodę miareczkowania kompleksometrycznego wersenianem sodu lub metodę AAS.

#### a) oznaczanie zawartości wapnia:

##### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000  $\text{cm}^3$ ,
- 1 M roztwór NaOH,
- mureksyd (wskaźnik): rozetrzeć 0,2 g mureksydu ze 100 g NaCl,
- pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

##### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 50  $\text{cm}^3$  badanej wody. Dodać 2  $\text{cm}^3$  1 M NaOH do uzyskania pH w zakresie 12-13. Wymieszać i sprawdzić odczyn za pomocą pehametru. Dodać 0,2 g wskaźnika mureksydu i natychmiast miareczkować 0,01 M roztworem  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  do zmiany barwy. Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną z 3 równolegle wykonanych oznaczeń różniących się objętością zużytego titranta nie większą niż 0,1  $\text{cm}^3$ .

Stężenie wapnia ( $C_{\text{Ca}}$ ) w wodzie obliczyć według wzoru:

$$C_{\text{Ca}} = \frac{V \cdot 0,4008 \cdot 1000}{V_{\text{pr}}} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} \right)$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  zużyta do miareczkowania próbki ( $\text{cm}^3$ ),
- $V_{\text{pr}}$  – objętość badanej próbki ( $\text{cm}^3$ ),
- 0,4008 – współczynnik przeliczeniowy określający ilość wapnia odpowiadającą 1  $\text{cm}^3$  0,01 M roztworu  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (mg).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

Tabela 10.5. Wartości graniczne wybranych wskaźników zasolenia w klasach jakości wód powierzchniowych.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach				
		I	II	III	IV	V
Zasadowość ogólna	mg $\text{CaCO}_3/\text{dm}^3$	> 200	100	20	10	< 10
Siarczany	mg $\text{SO}_4/\text{dm}^3$	100	150	250	300	> 300
Chlorki	mg $\text{Cl}/\text{dm}^3$	100	200	300	400	> 400
Wapń	mg $\text{Ca}/\text{dm}^3$	50	100	200	400	> 400
Magnez	mg $\text{Mg}/\text{dm}^3$	25	50	100	200	> 200
Fluorki	mg $\text{F}/\text{dm}^3$	0,5	1,0	1,5	1,7	> 1,7

#### b) oznaczanie zawartości magnezu:

##### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- szczawian amonu i chlorek amonu (roztwór do wytrącania wapnia z wody): oddzielnie rozpuścić 1,5 g szczawianu amonu i 35 g chlorku amonu w wodzie destylowanej, zmieszać oba roztwory, dodać 3,5  $\text{cm}^3$  25% roztworu  $\text{NH}_4\text{OH}$  i dopełnić do 250  $\text{cm}^3$ ,
- bufor amoniakalny (pH=10): rozpuścić 26,8 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  w 100  $\text{cm}^3$  wody destylowanej i zmieszać z 300  $\text{cm}^3$  25% roztworu  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50  $\text{cm}^3$  0,05 M roztworu  $\text{MgSO}_4$  oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , którą należy określić przez miareczkowanie roztworu  $\text{MgSO}_4$ . Dodać 5  $\text{cm}^3$  roztworu buforowego do 100  $\text{cm}^3$  wody destylowanej i zmierzyć odczyn roztworu,
- czerń eriochromowa T (wskaźnik): rozetrzeć 0,5 g czerni eriochromowej T ze 100 g NaCl,
- 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000  $\text{cm}^3$ ,
- pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

##### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 100  $\text{cm}^3$  badanej wody, dodać 25  $\text{cm}^3$  roztworu szczawian amonu i chlorku amonu, następnie dokładnie wymieszać. Wytrącony szczawian wapnia odsączyć ilościowo przez suchy sącdek do suchego naczynia. Z przesącza odmierzyć 50  $\text{cm}^3$  do kolby stożkowej, dodać 2,5  $\text{cm}^3$  roztworu buforowego oraz 0,1 g wskaźnika czerni eriochromowej T. Miareczkować 0,01 M roztworem  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  do zmiany barwy z czerwonej przez fioletową do błękitnej. Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną z 3 równolegle wykonanych oznaczeń różniących się objętością zużytego titranta nie większą niż 0,1  $\text{cm}^3$ .

Stężenie magnezu ( $C_{Mg}$ ) w wodzie obliczyć według wzoru:

$$C_{Mg} = \frac{V_1 \cdot 0,243 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_{pr}} \left( \frac{mg}{dm^3} \right)$$

gdzie:

- $V_1$  – objętość 0,01 M roztworu  $Na_2$ -EDTA zużyta do miareczkowania próbki ( $cm^3$ ),
- $V_2$  – objętość roztworu buforowego ( $cm^3$ ),
- $V_{pr}$  – objętość badanej próbki ( $cm^3$ ),
- 0,243 – współczynnik przeliczeniowy określający ilość magnezu odpowiadającą 1  $cm^3$  0,01 M roztworu  $Na_2$ -EDTA (mg).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

### 10.2.6. Oznaczanie zasadowości ogólnej wody

**Zasadowość** jest to zdolność wody do zobojętniania kwasów mineralnych w określonych warunkach. Właściwość tę nadają wodzie występujące w niej wodorowęglany i węglany oraz rzadziej – wodorotlenki, krzemiany, borany i fosforany. Obok wodorowęglanów i węglanów wapnia oraz magnezu w wodach mogą być obecne węglany i wodorowęglany sodu i potasu. W takich przypadkach woda cechuje się większą zasadowością od twardości ogólnej. Różnica pomiędzy zasadowością a twardością ogólną to **zasadowość alkaliczna**. Zależnie od związku nadającego charakter zasadowy badanej wody wyróżnia się następujące rodzaje zasadowości: ogólną, węglanową, wodorowęglanową, wodorotlenową i zasadowość wobec fenoloftaleiny.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,1 M roztwór HCl,
2. 0,1% roztwór oranżu metylowego,
3. pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 100  $cm^3$  badanej wody. Dodać 2-3 krople roztworu oranżu metylowego i miareczkować 0,1 M roztworem HCl do zmiany barwy na żółtoróżową. W celu usunięcia  $CO_2$  z miareczkowanej próby kolbę ogrzewać do wrzenia, utrzymywać w tym stanie przez 2-3 minuty, następnie szybko ochłodzić. Jeżeli żółte zabarwienie próbki stanie się ponownie widoczne należy domiareczkować 0,1 M roztworem HCl do zmiany zabarwienia na żółtoróżowe. Jeśli zabarwienie nie ulegnie zmianie na skutek ogrzewania można uznać oznaczenie za zakończone.

Zasadowość wody ( $Z_m$ ) obliczyć według wzoru:

$$Z_m = \frac{V \cdot 100}{V_{pr}} \left( \frac{mval}{dm^3} \right)$$

gdzie:

- $V$  – objętość 0,1 M roztworu HCl zużyta do miareczkowania próbki ( $cm^3$ ),
- $V_{pr}$  – objętość badanej próbki ( $cm^3$ ).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

### 10.2.7. Oznaczanie kwasowości ogólnej wody

**Kwasowość** wody naturalnej polega na jej zdolności do uwalniania protonów, czyli zobojętniania dodawanych do wody silnych zasad lub węglanów potasowców. Kwasowość może być również spowodowana obecnością słabo zjonizowanych kwasów, np. kwasu węglowego czy taninowego, wolnych kwasów nieorganicznych oraz ulegających hydrolizie niektórych soli, np.  $FeSO_4$ . Czynniki powodujące kwasowość wody mogą pochodzić z zanieczyszczeń powietrza, z terenów bagiennych lub torfowych, ze spływów powierzchniowych z terenów hut i ścieków przemysłowych. Niepożądaną dla wody pitnej kwasowość wywołują jedynie wolne kwasy nieorganiczne (woda ma wtedy niski odczyn).

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 1% roztwór fenoloftaleiny,
2. 0,05 M roztwór NaOH,
3. pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 100  $cm^3$  badanej wody. Dodać 15 kropli roztworu fenoloftaleiny, ogrzewać próbkę do wrzenia, utrzymywanego przez kolejne 2 minuty. Miareczkować 0,05 M roztworem NaOH do pojawienia się słabo różowego zabarwienia.

Kwasowość wody ( $X_{og}$ ) obliczyć według wzoru:

$$X_{og} = \frac{V \cdot 50}{V_{pr}} \left( \frac{mval}{dm^3} \right)$$

gdzie:

- $V$  – objętość 0,05 M roztworu NaOH zużyta do miareczkowania próbki ( $cm^3$ ),
- $V_{pr}$  – objętość badanej próbki ( $cm^3$ ).

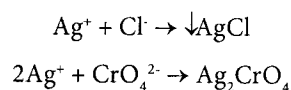
### 10.2.8. Oznaczanie zawartości chlorków w wodzie

Chlorki stanowią jeden z anionów najczęściej występujących w wodach i ściekach. Źródła chlorków w wodzie można podzielić na:

- **naturalne**, np. wymywanie z gleby;
- **antropogeniczne**, np. ścieki przemysłowe.

Wysokie stężenie chlorków w wodzie wpływa niekorzystnie na wzrost i rozwój roślin, zwiększa jej korozyjność i sprawia, że nie nadaje się do spożycia.

Najczęściej do oznaczania chlorków stosuje się **metodę Mohra**. Polega ona na miareczkowaniu badanej wody mianowanym roztworem  $\text{AgNO}_3$  wobec  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  jako wskaźnika do momentu wytrącenia się czerwono-brunatnego osadu chromianu srebra, zgodnie z reakcją:



Maksymalny czas przechowywania próbki wody pobranej w celu analizy chlorków wynosi miesiąc.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,1 M mianowany roztwór  $\text{AgNO}_3$ ,
2. 5% roztwór  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (wskaźnik),
3. 2 M roztwór  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,
4. 1 M roztwór  $\text{NaOH}$ ,
5. biureta, pipety, wkraplacz, kolby stożkowe, pehametr.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

Pomiar oznaczenia chlorków w wodzie należy rozpocząć od pomiaru pH badanej wody. Jeśli pH mieści się w zakresie 6,5-10, chlorki można oznaczać metodą Mohra. Jeżeli pH wykracza poza ten zakres należy odczyn wody doprowadzić do podanej wartości, dodając  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lub  $\text{NaOH}$ . Następnie odmierzyć 100  $\text{cm}^3$  badanej wody dodać kilka kropel wskaźnika i miareczkować 0,1 M roztworem  $\text{AgNO}_3$  do momentu wytrącenia się czerwono-brunatnego osadu chromianu srebra. Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną z 3 równoległe wykonanych oznaczeń różniących się objętością zużytego titranta nie większą niż 0,1  $\text{cm}^3$ .

Ze wzoru obliczyć objętość jonów chlorkowych ( $X_{\text{Cl}^-}$ ):

$$X_{\text{Cl}^-} = \frac{V \cdot C \cdot M_{\text{Cl}^-}}{V_{\text{pr}}} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} \right)$$

gdzie:

- V – objętość roztworu  $\text{AgNO}_3$  zużyta do miareczkowania ( $\text{dm}^3$ ),
- C – stężenie roztworu  $\text{AgNO}_3$  zużytego do miareczkowania (M),
- $M_{\text{Cl}^-}$  – masa molowa jonu chlorkowego (mg/mol),
- $V_{\text{pr}}$  – objętość badanej próbki wody ( $\text{dm}^3$ ).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

### 10.2.9. Oznaczanie zawartości ortofosforanów (V) w wodzie

Wśród zanieczyszczeń nieorganicznych wód znajdują się takie, które nie są szczególnie toksyczne, lecz występując w dużych ilościach mogą powodować zmiany środowiskowe. Należą do nich aniony: azotany (III i V) i fosforany (V), których wzrost stężenia wywołuje zakwity glonów (proces eutrofizacji), ostatecznie doprowadzając w zbiorniku do głodu tlenowego, spowodowanego rozkładem martwych glonów przez mikroorganizmy.

Fosfor w środowisku wodnym pochodzi głównie z rozkładu związków organicznych roślinnych lub zwierzęcych, z pól nawożonych nawozami fosforowymi oraz z zanieczyszczeń ściekami przemysłowymi i bytowymi. W przyrodzie najczęściej występuje w postaci ortofosforanów (V), organicznych ortofosforanów oraz nieorganicznych i organicznych skondensowanych ortofosforanów (V). Wszystkie formy fosforu oznacza się metodami spektrofotometrycznymi wyłącznie w formie ortofosforanów (V) po uprzednim przeprowadzeniu w tę postać za pomocą hydrolyzy lub mineralizacji. Najczęściej stosuje się metodę oznaczania ortofosforanów za pomocą molibdenianu (VI) amonu i chlorku cyny (II) jako reduktora. Molibdenian (VI) amonu w roztworze kwaśnym tworzy kwas fosfomolibdenowy o żółtym zabarwieniu, który pod wpływem chlorku cyny (II) ulega redukcji, tworząc związek kompleksowy – błękit molibdenowy o intensywnej barwie, proporcjonalnej do stężenia ortofosforanów (V) w badanej próbce. Pobraną próbę wody należy jak najszybciej przebadać na zawartość ortofosforanów (V). Jeżeli nie jest to możliwe próbkę można przechowywać przez okres 24 godzin w temperaturze 2-5 °C.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór molibdenianu (VI) amonu (25 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  rozpuścić w 175  $\text{cm}^3$  wody destylowanej. 280  $\text{cm}^3$  stężonego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 400  $\text{cm}^3$ . Roztwory ostudzić, połączyć razem i uzupełnić do objętości 1000  $\text{cm}^3$ ),
2. roztwór chlorku cyny (II) (2,5 g  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  rozpuścić na gorąco w 100  $\text{cm}^3$  gliceryny),

- 1% roztwór fenoloftaleiny,
- roztwór mieszaniny kwasu siarkowego (VI) i azotowego (V) ( $300 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$  dodawać powoli do  $600 \text{ cm}^3$  wody destylowanej, roztwór ostudzić, dodać  $4 \text{ cm}^3$  stężonego  $\text{HNO}_3$ , a następnie całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości  $1000 \text{ cm}^3$ ),
- roztwór wzorcowy podstawowy  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o stężeniu  $1 \text{ mg PO}_4^{3-}/\text{cm}^3$ ,
- spektrofotometr, pipety, kolby miarowe, cylinder.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

##### a) wykres wzorcowy:

Sporządzić roboczy roztwór wzorcowy ortofosforanów (V). W tym celu do kolby miarowej o pojemności  $100 \text{ cm}^3$  odmierzyć  $1 \text{ cm}^3$  podstawowego roztworu wzorcowego roztworu ortofosforanów (V) i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. W  $1 \text{ cm}^3$  tego roztworu znajduje się  $0,01 \text{ mg PO}_4^{3-}$ .

Sporządzić serię roztworów wzorcowych w kolbach miarowych o pojemności  $100 \text{ cm}^3$  w zakresie stężeń od  $0,01$  do  $0,2 \text{ mg PO}_4^{3-}$ . W tym celu do kolb odmierzyć kolejno następujące objętości wzorca roztworu roboczego ortofosforanów (V):  $0; 0,03; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 \text{ cm}^3$ . Zawartość kolbek uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie do wszystkich dodać, dokładnie mieszając  $2 \text{ cm}^3$  roztworu molibdenianu (VI) amonu i  $0,5 \text{ cm}^3$  roztworu chlorku cyny (II). Po upływie 10 minut zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej (woda destylowana) przy długości fali  $\lambda=690 \text{ nm}$ . Wykreślić krzywą wzorcową.

##### b) badanie próbki wody:

Odmierzyć  $100 \text{ cm}^3$  wody, dodać kroplę roztworu fenoloftaleiny. Jeżeli wystąpi różowe zabarwienie dodawać kroplami mieszaninę kwasów do zaniku barwy. Następnie dodać, dokładnie mieszając,  $2 \text{ cm}^3$  roztworu molibdenianu (VI) amonu i  $0,5 \text{ cm}^3$  roztworu chlorku cyny (II). Po upływie 10 minut zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej (woda destylowana) przy długości fali  $\lambda=690 \text{ nm}$ . Zawartość ortofosforanów odczytać z krzywej wzorcowej.

Obliczyć zawartość ortofosforanów (V) według wzoru:

$$X_{\text{PO}_4^{3-}} = \frac{a}{V_{\text{pr}}} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} \right)$$

gdzie:

- a – masa ortofosforanów (V) odczytana z wykresu wzorcowego (mg),  
 $V_{\text{pr}}$  – objętość pobranej próbki wody ( $\text{dm}^3$ ).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.6), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

Tabela 10.6. Wartości graniczne wybranych wskaźników biogenych w klasach jakości wód powierzchniowych.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach				
		I	II	III	IV	V
Amoniak	$\text{mg NH}_4/\text{dm}^3$	0,5	1	2	4	> 4
Azot Kjeldahla	$\text{mg N}/\text{dm}^3$	0,5	1	2	4	> 4
Azotany (V)	$\text{mg NO}_3/\text{dm}^3$	5	15	25	50	> 50
Azotany (III)	$\text{mg NO}_2/\text{dm}^3$	0,03	0,1	0,5	1,0	> 1,0
Azot ogólny	$\text{mg N}/\text{dm}^3$	2,5	5	10	20	> 20
Fosforany	$\text{mg PO}_4/\text{dm}^3$	0,2	0,4	0,7	1,0	> 1,0
Fosfor ogólny	$\text{mg P}/\text{dm}^3$	0,2	0,4	0,7	1,0	> 1,0

#### 10.2.10. Oznaczanie zawartości azotanów (V) i azotanów (III) w wodzie

Głównym źródłem azotanów w przyrodzie są powszechnie stosowane w rolnictwie nawozy azotowe. W okresie wzrostu upraw większość użytych nawozów jest absorbowana przez korzenie roślin. Jednak kiedy ich wzrost ustaje, azotany, w tym także te uwalniane podczas rozkładu materii martwych roślin i zwierząt, przenikają przez glebę i mogą zasilać okoliczne ciekły wodne. Wzrost stężenia azotanów, podobnie jak ortofosforanów, często prowadzi do eutrofizacji zbiorników wodnych.

Azotany (III) są związkami nietrwałymi w wodzie. W zależności od warunków utleniają się do azotanów (V) lub redukują do amoniaku. Azotany (V) występują zazwyczaj w wodach powierzchniowych w niewielkich ilościach. Jon azotanowy (V) jest końcowym produktem przemian związków organicznych oraz nieorganicznych w środowisku naturalnym.

Oznaczenie sumarycznej zawartości jonów azotanowych (III) i (V) przeprowadza się po wcześniejszym utlenieniu  $\text{NO}_2^-$  do  $\text{NO}_3^-$  i końcowym oznaczeniu azotanów (V). Metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze jonu powstałego po dysocjacji kwasu nitrosalicylowego. Zabarwienie roztworu jest wprost proporcjonalne do ilości jonów azotanowych (V) w badanym roztworze.

Oznaczanie azotanów (III) należy wykonać natychmiast po pobraniu próbki wody. W przypadku oznaczania azotanów (V) próbkę można analizować w ciągu 24 godzin, po jej uprzednim zakonserwowaniu poprzez dodanie kwasu siarkowego do  $\text{pH} \leq 2$ .

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,5% roztwór salicylanu sodu,
- 0,5% roztwór NaOH,
- roztwór wzorcowy podstawowy  $\text{KNO}_3$  o stężeniu  $0,1 \text{ mg NO}_3^-/\text{cm}^3$ ,



4. stężony  $H_2SO_4$  cz.d.a.,
5. roztwór winianu sodowo-potasowego (w wodzie destylowanej rozpuścić 400 g NaOH i 60 g winianu sodowo-potasowego, roztwór uzupełnić wodą do 1000  $cm^3$ ),
6. roztwór  $Al_2(SO_4)_3$  o stężeniu 0,7  $g/cm^3$ ,
7. 0,4% roztwór  $Ag_2SO_4$ ,
8. roztwór nadtlenu wodoru,
9. spektrofotometr, łaźnia wodna, parownica porcelanowa, bagietki, zlewki, cylinder, wskaźnikowe papierki uniwersalne, kolby miarowe, pipety, lejek szybkossący, kolby Erlenmayera, zakraplacze.

### WYKONANIE OZNACZENIA:

#### a) wykres wzorcowy:

Sporządzić roztwór wzorcowy roboczy azotanów (V)  $NO_3^-$ . W tym celu do parownicy odmierzyć 10  $cm^3$  roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu 1  $mg/cm^3$ , dodać 2-3 krople 0,5% roztworu NaOH i 20  $cm^3$  roztworu salicylanu sodu. Mieszaninę w parownicy odparować do sucha w łaźni wodnej. Do suchej pozostałości dodać 1  $cm^3$  stężonego  $H_2SO_4$ , rozprowadzając go po ściankach w miejscu, gdzie znajduje się biały osad. Po 10 minutach dodać do parownicy 30  $cm^3$  wody destylowanej, dokładnie wymieszać, przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100  $cm^3$  i uzupełnić wodą do kreski. W 1  $cm^3$  roztworu wzorcowego roboczego znajduje się 0,01 mg azotu azotanowego (V).

Sporządzić serię roztworów wzorców w kolbach miarowych o pojemności 100  $cm^3$ . W zakresie stężeń od 0,003 do 0,05  $mg NO_3^-$  w próbce tj.: 0; 0,003; 0,007; 0,01; 0,03; 0,05  $mg$ . Do każdej kolbki dodać po 7  $cm^3$  roztworu winianu sodowo-potasowego. Zawartość kolbek uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Zmierzyć absorbancję względem próby ślepej (zamiast roztworu wzorcowego woda destylowana – próba 0) przy długości fali  $\lambda = 410$  nm. Wykreślić krzywą wzorcową.

#### b) usuwanie czynników przeszkadzających i chlorków:

Jeżeli barwa wody przeznaczonej do oznaczeń sumy azotanów (III) i (V) przekracza 30<sup>o</sup> według skali chromianowo-kobaltowej, należy poddać ją koagulacji, dodając do 150  $cm^3$  próbki 1,5  $cm^3$  roztworu  $Al_2(SO_4)_3$ . Dokładnie wymieszać i następnie kroplami dodawać roztwór NaOH do pH=7. Ponownie wymieszać, odstawić na kilka minut, przesączyć, odrzucając pierwsze partie przesączu.

Po oznaczeniu zawartości chlorków w oddzielnej próbce wody (patrz rozdział 10.2.8) do 100  $cm^3$  próby dodać wyliczoną ilość siarczany (VI) srebra, wymieszać, pozostawić na godzinę w ciemnym miejscu i przesączyć.

#### c) utlenianie azotanów (III):

Przygotować 100  $cm^3$  próbki wody (patrz w punkcie b) i dodać 1  $cm^3 H_2SO_4$  i 0,5  $cm^3$  roztworu  $H_2O_2$ . Pozostawić na 15 minut.

#### d) badanie próbki wody na zawartość azotanów (V):

Do porcelanowej parownicy odmierzyć 100  $cm^3$  próbki z punktu c. Dalsze postępowanie podobnie jak przy oznaczaniu azotanów (V) w roztworach wzorcowych roboczych (punkt a). Trzykrotnie zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej (woda destylowana). Odczytać wynik z krzywej wzorcowej i obliczyć zawartość azotu azotanowego (V) według wzoru:

$$X_{N-NO_3} = \frac{a}{V_{pr}} \left( \frac{mg}{dm^3} \right)$$

gdzie:

- a – zawartość azotanów (V) odczytana z wykresu wzorcowego (mg),  
 $V_{pr}$  – objętość wody pobranej do badania ( $dm^3$ ).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.6), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

#### 10.2.11. Oznaczanie zawartości detergentów anionoaktywnych w wodzie

**Detergenty (substancje powierzchniowo czynne)** są to związki organiczne, które mają zarówno właściwości polarne, jak i niepolarne. W swojej cząsteczce posiadają jednocześnie długi łańcuch hydrofobowy oraz grupę polarną (hydrofilową) (Tabela 10.7). Dzięki temu mogą się gromadzić na granicy faz, zmniejszając napięcie powierzchniowe rozpuszczalnika.

Tabela 10.7. Podział detergentów na podstawie typu grupy polarnej.

		Detergenty				
		anionowe		kationowe		niejonowe
Klasa toksyczności	IV	alkiloarylosulfoniany	III	czwartorzędowe związki amoniowe	V-VI	alkiloglikole
	IV	siarczany alkoholi tłuszczowych	III	czwartorzędowe związki pirydynowe	V-VI	alkilofenole
	IV	siarczanowe produkty oksyetylenowane			V-VI	polietylenoglikole
	IV	sulfobursztyniany				estry kwasów tłuszczowych z alkoholami wielowodorotlenowymi
	IV	sulfonowe oleje				
	V	mydła sodowe i potasowe kwasu stearynowego i palmitynowego				

Detergenty wchodzą w skład wielu środków czystości, które są powszechnie wykorzystywane w gospodarstwach domowych i obiektach przemysłowych. Są one także szeroko stosowane do przygotowania użytkowych preparatów pestycydów oraz w celu rozpraszania wycieków ropy oraz innych substancji oleistych w wodzie. Główną drogą przedostawania się detergentów do wody jest zrzut ścieków do wód powierzchniowych.

Detergenty anionowe i kationowe posiadają trwałe ładunki ujemne lub dodatnie, dołączone do niepolarnych (hydrofobowych) łańcuchów węglowych. Z kolei detergenty niejonowe nie posiadają trwałego ładunku, mają tylko pewną grupę atomów słabo elektrododatnich lub elektroujemnych. Toksyczność detergentów (Tabela 10.7), z wyjątkiem kationowych, nie jest wysoka (IV, V i VI klasa). Detergenty kationowe zalicza się do III klasy toksyczności, a prawdopodobna dawka śmiertelna dla dorosłego człowieka wynosi około 4 g. Niebezpieczną grupą detergentów stanowią alkilofenole polioksyetylenowane (detergenty niejonowe), których degradacja polega na wytworzeniu alkilofenoli, zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego zwierząt. Poza toksycznością związaną z bezpośrednim spożyciem detergentów, związki te są dużym problemem dla funkcjonowania zbiorników wodnych. Ich występowanie w ściekach i wodach powierzchniowych powoduje powstanie trwałej piany, która utrudnia proces samooczyszczania się wód i zakłóca pracę oczyszczalni ścieków.

Najwyższe dopuszczalne stężenie detergentów anionowych w wodach pitnych wynosi 0,2 mg/dm<sup>3</sup>, kationowych – 0,1 mg/dm<sup>3</sup>, a niejonowych – 0,2 mg/dm<sup>3</sup>. Natomiast dopuszczalna zawartość detergentów anionowych i niejonowych w wodach powierzchniowych wynosi odpowiednio:

**I klasa czystości** – 0,2 i 0,5 mg/dm<sup>3</sup>,

**II klasa czystości** – 0,5 i 1,0 mg/dm<sup>3</sup>,

**III klasa czystości** – 1,0 i 2,0 mg/dm<sup>3</sup>.

Zawartość detergentów anionoaktywnych można oznaczyć za pomocą błękitu metylenowego. Oznaczenie należy wykonać nie później niż 4 godziny po pobraniu próby wody. Gdy nie jest to możliwe próbę wody konserwuje się, dodając H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do uzyskania pH ≤ 2. Zasada oznaczania tą metodą polega na tworzeniu się zabarwionego na niebiesko produktu reakcji błękitu metylenowego z anionoaktywnym detergentem. Powstająca sól dobrze rozpuszcza się w chloroformie, a intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia substancji powierzchniowo czynnych w wodzie. W oznaczeniu przeszkadzają (zawyżają wynik) wszystkie związki reagujące z błękitem metylenowym (organiczne siarczany, sulfoniany, fosforany, fenole, cyjaniny, chlorki, azotany, rodanki). Z tego względu wynik oznaczenia można podać jako zawartość substancji reagujących z błękitem metylenowym.

### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór błękitu metylenowego: 100 mg błękitu metylenowego rozpuścić w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, następnie 30 cm<sup>3</sup> tego roztworu przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 cm<sup>3</sup>. Dodać 500 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, 6,8 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 50 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Wstrząsnąć do rozpuszczenia odczynników. Uzupelnąć wodą destylowaną do kreski,
2. 1% roztwór fenoloftaleiny,
3. chloroform cz.d.a,
4. 1 M roztwór NaOH,
5. 1 M roztwór H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
6. roztwór do przemywania: do 500 cm<sup>3</sup> wody destylowanej dodać 6,8 cm<sup>3</sup> stężonego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 50 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wstrząsnąć do rozpuszczenia odczynników i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm<sup>3</sup>,
7. roztwór dodecylosiarczanu sodu (SDS) o stężeniu 0,1 mg/cm<sup>3</sup>,
8. spektrofotometr, rozdzielacze, zlewki, statyw, łapy, łączniki, kolby miarowe, lejek, pipety, cylindry.

### WYKONANIE OZNACZENIA:

#### a) badanie próbki wody:

Odmierzyć 100 cm<sup>3</sup> badanej wody i zalkalizować roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny do lekko różowego zabarwienia. Następnie kroplami dodawać 1 M roztwór H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do zaniku barwy. Próbkę przenieść do rozdzielacza, dodać 10 cm<sup>3</sup> chloroformu i 25 cm<sup>3</sup> roztworu błękitu metylenowego. Wytrząsać przez 30 sekund, po czym warstwę chloroformową (dolną) przenieść do drugiego rozdzielacza. Ekstrakcję powtórzyć jeszcze 2 razy, używając za każdym razem po 10 cm<sup>3</sup> chloroformu. Zebrane ekstrakty chloroformowe (30 cm<sup>3</sup>) przemyć 50 cm<sup>3</sup> roztworu do przemywania, energicznie wytrząsając przez 30 sekund. Po rozdzieleniu się, warstwę chloroformową przesączyć do kolby miarowej o objętości 50 cm<sup>3</sup>. Pozostałość w rozdzielaczu wytrząsać z 10 cm<sup>3</sup> chloroformu i warstwę chloroformową przenieść do tej samej kolby miarowej. Zawartość kolbki dopełnić do kreski czystym chloroformem, dokładnie wymieszać i zmierzyć absorbancję przy długości fali λ = 652 nm wobec próby ślepej – czystego chloroformu. Z wykresu wzorcowego odczytać zawartość substancji anionoaktywnej w badanej wodzie.

#### b) wykres wzorcowy:

Przygotować 1000 cm<sup>3</sup> roztworu wzorcowego podstawowego substancji anionoaktywnej – dodecylosiarczanu sodu (SDS) przez rozpuszczenie 0,1 g SDS w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> i uzupełnienie wodą do kreski. Roztwór ten zawiera 0,1 mg detergentu w 1 cm<sup>3</sup> wody. W dniu wykonania oznaczenia przygotować wzorcowy roztwór roboczy przez rozcieńczenie 10 cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego wodą destylowaną w kolbie miarowej na 100 cm<sup>3</sup>. Roztwór ten zawiera 0,01 mg detergentu w 1 cm<sup>3</sup>.

Następnie do szeregu rozdzielaczy odmierzyć podane ilości wzorcowego roztworu roboczego: 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 i 20 cm<sup>3</sup>, co odpowiada następującym ilościom SDS w próbce: 0; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,15 i 0,2 mg. Roztwory dopełnić wodą do objętości 100 cm<sup>3</sup> i poddać wzorce takim samym czynnościom jak próbę badaną. Zmierzyć absorbancję dla kolejnych roztworów wzorcowych i na podstawie uzyskanych wyników wykreślić krzywą wzorcową.

Zawartość detergentu anionoaktywnego w badanej próbce wody obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{a}{V_{pr}} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dm}^3} \right)$$

gdzie:

- a – zawartość detergentu anionoaktywnego w badanej próbce wody odczytana z krzywej wzorcowej (mg),  
 V<sub>pr</sub> – objętość badanej próbki wody (dm<sup>3</sup>).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.8), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

Tabela 10.8. Wartości graniczne wybranych wskaźników zanieczyszczeń przemysłowych w klasach jakości wód powierzchniowych.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach				
		I	II	III	IV	V
Cyjanki wolne	mg CN/dm <sup>3</sup>	0,02	0,02	0,05	0,05	> 0,05
Fenole	mg/dm <sup>3</sup>	0,001	0,005	0,01	0,05	> 0,05
Oleje mineralne	mg/dm <sup>3</sup>	0,01	0,05	0,2	0,5	> 0,5
Substancje powierzchniowo czynne anionowe	mg/dm <sup>3</sup>	0,1	0,2	0,5	1,0	> 1,0
Pestycydy (suma lindanu i dieldryny)	µg/dm <sup>3</sup>	0,1	1,0	2,5	5,0	> 5,0

### 10.2.12. Oznaczanie zawartości wybranych metali w wodzie

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe metali: cynku, miedzi, ołowiu, kadmu, niklu, manganu, kobaltu i żelaza o stężeniu 1 mg/cm<sup>3</sup>,
2. stężony HNO<sub>3</sub>,
3. 1% roztwór HNO<sub>3</sub>,
4. pipety, kolby miarowe o pojemności 50 cm<sup>3</sup>, spektrometr AAS.

Próbkę wody przeznaczoną do badań przesączyć przez sączki membranowe średniej gęstości, tj. 0,45 µm i utrwalić za pomocą stężonego HNO<sub>3</sub> do pH≤2. Jeżeli

w zakwaszonej próbce obecne są substancje nierozpuszczone, należy je usunąć. Do zlewki o pojemności 150 cm<sup>3</sup> odmierzyć 50 cm<sup>3</sup> próbki, dodać 2,5 cm<sup>3</sup> stężonego HNO<sub>3</sub>, roztwór ogrzać do wrzenia i utrzymywać w tym stanie przez około 15 minut. Po ostygnięciu roztwór przenieść do kolby miarowej o pojemności 50 cm<sup>3</sup> i uzupełnić do kreski. W przypadku gdyby ciecz pozostawała nadal mętna, przesączyć przez sączki membranowe.

Dla każdego metalu wykonać pomiary absorbancji wzorca i próby badanej. Stosować następujące długości fal dla: **cynku** λ=213,9 nm, **miedzi** λ=324,7 nm, **ołowiu** λ=217,0 nm lub 283,3 nm, **kadmu** λ=228,8 nm, **niklu** λ=232,0 nm, **manganu** λ=279,5 nm, **kobaltu** λ=240,7 nm i **żelaza** λ=248,3 nm. Absorbancję odczytać wobec próby ślepej, którą jest 1% roztwór HNO<sub>3</sub>. Na podstawie wyników absorbancji uzyskanych dla prób wzorcowych wykreślić krzywą wzorcową. Z wykresu wzorcowego odczytać zawartość metalu w badanej wodzie.

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.9), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

Tabela 10.9. Wartości graniczne wybranych wskaźników zanieczyszczeń metalami w klasach jakości wód powierzchniowych.

Wskaźnik jakości wody	Jednostka	Wartości graniczne w klasach				
		I	II	III	IV	V
Cynk	mg/dm <sup>3</sup>	0,3	0,5	1,0	2,0	> 2,0
Glin	mg/dm <sup>3</sup>	0,1	0,2	0,4	0,8	> 0,8
Kadm	mg/dm <sup>3</sup>	0,0005	0,001	0,001	0,005	> 0,005
Mangan	mg/dm <sup>3</sup>	0,05	0,1	0,5	1,0	> 1,0
Miedź	mg/dm <sup>3</sup>	0,02	0,04	0,06	0,1	> 0,1
Nikiel	mg/dm <sup>3</sup>	0,01	0,02	0,05	0,2	> 0,2
Ołów	mg/dm <sup>3</sup>	0,01	0,01	0,02	0,05	> 0,05
Rtęć	mg/dm <sup>3</sup>	0,0005	0,001	0,001	0,005	> 0,005
Żelazo	mg/dm <sup>3</sup>	0,1	0,3	1,0	2,0	> 2,0

### 10.3. Badanie chemicznych zanieczyszczeń gleby

Chemiczne zanieczyszczenia gleb powstają głównie w wyniku niewłaściwej działalności człowieka. Skażenia w środowisku glebowym stanowią najpoważniejszy problem wśród wszystkich skażeń środowiska. Przyczyna tkwi w znaczeniu gleb dla życia biologicznego. Gleba jest miejscem wegetacji roślin, również tych przeznaczonych do konsumpcji. Znajdujące się w niej zanieczyszczenia bez problemu przedostają się więc do żywności. Ponadto, w odróżnieniu od

powietrza i wód powierzchniowych, zanieczyszczonych gleb nie można praktycznie szybko oczyścić, a proces ich samooczyszczania przebiega bardzo powoli. Chemiczne zanieczyszczenia gleb powodują przede wszystkim:

1. zmianę odczynu gleby (zakwaszenie lub alkalizację),
2. naruszenie równowagi składników pokarmowych dla roślin,
3. akumulację w glebie pierwiastków śladowych, metali ciężkich, organicznych toksyn, np. pozostałości pestycydów, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, polichlorowanych bifenyli.

Związki zakwaszające środowisko glebowe pochodzą głównie z niewłaściwego nawożenia mineralnego i organicznego oraz emisji do atmosfery zanieczyszczeń gazowych: ditlenku siarki, tlenków azotu oraz amoniaku. W atmosferze przebiegają procesy, w wyniku których powstaje kwas siarkowy (VI), kwas azotowy (V) i ich sole, które w wyniku suchej lub mokrej depozycji osiadają na powierzchni gruntów i wód powierzchniowych (**kwaśna depozycja**). Amoniak natomiast ulega w atmosferze uwodnieniu, w wyniku czego powstają jony amonowe  $\text{NH}_4^+$ . Wpływają one pośrednio na proces zakwaszenia, ponieważ po zdeponowaniu w glebach lub wodach ulegają nityfikacji według reakcji:



Zwiększenie kwasowości środowiska glebowego poniżej wartości  $\text{pH} = 4,2$ , obserwowane w odniesieniu do jakiegoś przedziału czasu, powoduje szereg niekorzystnych procesów:

1. zubożenie zawartości składników odżywczych (kationów zasadowych) przez ich wypłukiwanie (ługowanie) z gleby;
2. występowanie dysharmonii pokarmowej w zakresie zaopatrzenia roślin w składniki odżywcze;
3. uwalnianie glinu ( $\text{Al}^{3+}$ ), który jest silnie fitotoksyczny, oddziałuje szkodliwie na system korzeniowy roślin, powodując ich zamieranie;
4. wzrost mobilności i dostępności dla roślin metali ciężkich zawartych w glebie;
5. wypłukiwanie anionów, jonów wodorowych, glinu, metali ciężkich do wód powierzchniowych i podziemnych;
6. zaburza rozwój i aktywność niektórych grup mikroorganizmów glebowych;
7. ogranicza, a nawet eliminuje ze środowiska dżdżownice uczestniczące w tworzeniu próchnicy;
8. wypłukiwane z gleby substancje odżywcze oraz toksyczne mogą przenikać do wód powierzchniowych, gdzie powodują zmiany ilościowe i jakościowe w tych biocenozach.

Wapnowanie gleb kwaśnych, jako jeden z zabiegów mających na celu poprawę ich właściwości, wiąże się ze zwiększaniem zasolenia gleb. Duża koncentracja soli w środowisku gruntowo-wodnym utrudnia lub wręcz uniemożliwia pobieranie wody przez korzenie większości gatunków roślin w klimacie umiarkowanym lub suchym i narusza równowagę jonową składników pokarmowych.

Szczególnie niekorzystnym zjawiskiem jest występowanie w glebie metali ciężkich pochodzących z gazowych i pyłowych zanieczyszczeń atmosfery. Zanieczyszczenia te mogą być przenoszone na dalekie odległości i osadzać się w wyniku procesów **suchej depozycji** na powierzchni gruntów. W tej formie metale są niedostępne dla roślin wyższych, lecz mikroorganizmy glebowe i makrofauna glebowa (dżdżownice, krety) mogą powodować zmianę formy występowania metali ciężkich. Ponadto postępujące zakwaszenie środowiska ułatwia przechodzenie jonów metali do roztworu glebowego, gdzie są bezpośrednio dostępne dla roślin.

Pośród zanieczyszczeń organicznych stwierdza się obecność pozostałości pestycydów i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Są to połączenia z reguły bardzo trwałe, nierozpuszczalne w wodzie, silnie oddziałujące z materią organiczną gleb.

Pobierając próbkę gleby do analizy, należy ją w pierwszej kolejności wysuszyć w temperaturze pokojowej (próbka powietrznie sucha), a następnie oddzielić części szkieletowe od ziemistych, przesiewając glebę przez sito.

### 10.3.1. Oznaczanie zasolenia w glebie

Oznaczanie zasolenia w przeprowadza się za pomocą **konduktometru**. Konduktometria polega na pomiarze przewodnictwa elektrolitycznego (konduktancji) lub oporu roztworu znajdującego się między dwiema elektrodami obojętnymi w warunkach stosowania zmiennego napięcia. Zdolność do przewodzenia prądu jest jedną z cech elektrolitów, a polega ona na ruchu jonów w zewnętrznym polu elektrycznym, co nazywane jest przewodnictwem elektrolitycznym (konduktancją elektrolityczną).

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,1 M roztwór KCl,
2. pojemnik plastikowy, biureta, lejek Büchnera, sączki, konduktometr, szkiełko zegarkowe, statyw, łapy, pompka wodna.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

W plastikowym naczyniu odważyć 200 g gleby powietrznie suchej. Dodać za pomocą biurety wodę destylowaną aż utworzy się pasta glebowa. Odczytać obję-

tość dodanej wody. Otrzymaną pastę pozostawić pod przykryciem na kilka dni. Następnie przefiltrować na lejku Büchnera i zmierzyć przewodnictwo ekstraktu (G) oraz przewodnictwo właściwe ( $\kappa$ ), po uprzednim skalibrowaniu konduktometru za pomocą 0,1 M roztworu KCl. Zasolenie gleby obliczyć z zależności kalibracyjnej:

$$S_{\% \text{ soli w glebie}} = 0,064 \cdot \kappa \cdot \frac{\% \text{ wody w glebie w stanie nasycenia}}{100}$$

gdzie:

$\kappa$  [mS/cm] – oznacza **przewodnictwo właściwe**: przewodnictwo słupa elektrolitu o grubości 1 cm i przekroju 1 cm.

Odczytany wynik przewodnictwa gleby za pomocą konduktometru porównać z danymi z tabeli 10.10, następnie określić stopień zasolenia badanej gleby.

Tabela 10.10. Stopień zasolenia gleb określony na podstawie przewodnictwa.

Stopień zasolenia	Przewodnictwo (mS)
bardzo małe	0-0,87
małe	0,88-1,74
średnie	1,75-3,04
duże	3,05-4,34
bardzo duże	4,35

### 10.3.2. Oznaczanie zawartości chlorków w glebie

Zawartość chlorków w glebie oznacza się **metodą potencjometryczną**. W metodzie tej mierzy się potencjał elektryczny, który jest zależny od stężenia (aktywności) oznaczanego jonu w badanym roztworze. Potencjał ten wyznacza się na podstawie pomiaru siły elektromotorycznej ogniwa (SEM), którego jednym półogniwem jest elektroda wskaźnikowa, a drugim – elektroda porównawcza. Obie elektrody muszą być w kontakcie elektrycznym. Elektroda wskaźnikową może być elektroda jonoselektywna do oznaczania jonów metali ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) oraz anionów ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ). Jako elektrodę porównawczą stosuje się elektrodę wodorową lub chlorosrebrową.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 0,05 M roztwór  $\text{AgNO}_3$ ,
- roztwór żelatyny w  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,
- stężony roztwór KCl do przechowywania elektrody odniesienia,
- mieszadło magnetyczne z mieszadłem, statyw z łapami do elektrod, biurety, potencjometr, elektroda jonoselektywna  $\text{Cl}^-$ , elektroda odniesienia chlorosrebrowa, zlewki, tygiel, tryskawka.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

20 g gleby wyprażonej w ciągu 3 godzin w temperaturze  $450\text{ }^\circ\text{C}$  umieścić w zlewce i dodać  $20\text{ cm}^3$  roztworu żelatyny w stężonym  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Delikatnie włożyć mieszadło i umieścić na płytce mieszadła magnetycznego. Podłączyć elektrody do pehametru zgodnie z instrukcją użytkownika. Oplukane i osuszone elektrody: wskaźnikową i odniesienia zanurzyć w badanym roztworze do głębokości 1,5 cm od dna zlewki. Włączyć mieszanie. Ustawić biuretę wypełnioną roztworem  $\text{AgNO}_3$  w takiej pozycji, aby koniec biurety znajdował się w zlewce, ale nie był zanurzony w roztworze. Nastawić pehametr na bezpośredni pomiar mV. Włączyć i zanotować SEM przed miareczkowaniem. Roztwór miareczkować porcjami roztworu  $\text{AgNO}_3$  jednocześnie mieszając. Dodawanie roztworu  $\text{AgNO}_3$  rozpocząć od objętości  $0,05\text{ cm}^3$ . Podczas miareczkowania notować SEM po każdej dodanej porcji odczynnika, po ustaleniu się wskazań. Gdy zmiany potencjału będą rzędu 4 mV, dodać jeszcze dwa razy po  $0,2\text{ cm}^3$  odczynnika i zakończyć miareczkowanie. Na podstawie danych sporządzić krzywą, odkładając na osi rzędnych potencjały, a na osi odciętych objętości dodawanego odczynnika miareczkującego. Wyznaczyć punkt końcowy miareczkowania.

Zawartość chlorków obliczyć według wzoru:

$$X_{\text{Cl}^-} = M_{\text{Cl}^-} \cdot V_{\text{AgNO}_3} \cdot C_{\text{AgNO}_3}$$

gdzie:

- $X_{\text{Cl}^-}$  – zawartość chlorków  $\text{Cl}^-$  (mg),  
 $V_{\text{AgNO}_3}$  – objętość roztworu zużytego podczas miareczkowania ( $\text{dm}^3$ ),  
 $C_{\text{AgNO}_3}$  – stężenie roztworu  $\text{AgNO}_3$  (M),  
 $M_{\text{Cl}^-}$  – masa molowa  $\text{Cl}^-$  (mg/mol).

Zawartość jonów chlorkowych wyrażoną w miligramach można przeliczyć na kilogram badanej gleby.

### 10.3.3. Oznaczanie kwasowości gleby

**Kwasowość gleby** oznacza stężenie jonów wodorowych w roztworze glebowym i jest wyrażana najczęściej w milirównoważnikach lub milimolach ładunków dodatnich na 100 g gleby. Z analitycznego punktu widzenia wyróżniamy w glebie kwasowość:

- czynną**, spowodowaną obecnością jonów wodorowych pojawiających się w roztworze glebowym po zadaniu gleby wodą (wolne jony wodorowe),
- potencjalną**, związaną z tą częścią jonów wodorowych, która jest silnie związana w kompleksie glebowym. Wyróżnia się tutaj kwasowość potencjalną wymienną i hydrolytyczną.

**Kwasowość wymienna** spowodowana jest obecnością jonów wodorowych, które przechodzą do roztworu po zadaniu gleby roztworem soli obojętnej (np. 0,1 M KCl) oraz jonów wodorowych powstających w wyniku hydrolizy związków glinu.

W glebie pozostaje jeszcze pewna ilość jonów wodorowych, które przechodzą do roztworu w środowisku alkalicznym bądź po zadaniu gleby roztworem soli hydrolizującej zasadowo. Powstający słaby kwas oznacza się przez miareczkowanie go mianowanym roztworem zasady sodowej. Ilość kwasu odpowiada ilości jonów wodorowych wypartych z kompleksu glebowego przez kationy soli hydrolizującej zasadowo, co odpowiada z kolei **kwasowości hydrolitycznej**. Przy oznaczeniach pH w glebie przyjęło się, że stosunek masy gleby do objętości roztworu wynosi 1:2,5.

Przy pomiarach pH gleby stosuje się elektrodę szklaną, której elementem czułym na obecność jonów wodorowych jest szklana membrana. Zestawia się ją z elektrodą odniesienia, którą jest zazwyczaj elektroda chlorosrebrowa. Przed przystąpieniem do pomiarów pH należy takie ogniwo skalibrować.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

- 1 M roztwór KCl,
- 0,1 M roztwór NaOH,
- 1% roztwór fenoloftaleiny,
- 0,5 M roztwór octanu wapnia,
- pehametr, naczynko wagowe, mieszadło do gleb, lejek Büchnera, pipety, zlewki, cylindry, bagietki.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

##### a) oznaczanie kwasowości czynnej:

Odważyć 10 g gleby powietrznie suchej. Dodać 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i wymieszać. Po 10 minutach zmierzyć pH zawiesiny.

##### b) oznaczanie kwasowości wymiennej:

Odważyć 10 g gleby powietrznie suchej. Dodać 25 cm<sup>3</sup> 1 M roztworu KCl i wymieszać. Po 10 minutach zmierzyć pH zawiesiny.

##### c) oznaczanie kwasowości hydrolitycznej:

Odważyć 100 g gleby powietrznie suchej i przesianej przez sito (o średnicy oczek 1 mm). Dodać 250 cm<sup>3</sup> 0,5 M roztworu octanu wapnia. Mieszać na mieszadło przez 1 godzinę. Następnie przesączyć na lejku Büchnera. Pobrać 125 cm<sup>3</sup> klarownego przesącza i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny. Kwasowość hydrolityczną wyraża się ilością zużytego roztworu 0,1 M NaOH lub w milirównoważnikach wodoru w przeliczeniu na 100 g gleby.

Kwasowość hydrolityczną ( $H_h$ ) obliczyć ze wzoru:

$$H_h = V \cdot c \cdot 2 \cdot k \left( \frac{\text{mmol}(+) }{100\text{g}} \right)$$

gdzie:

- V – objętość roztworu NaOH zużytego na miareczkowanie (cm<sup>3</sup>),
- c – stężenie roztworu NaOH (mmol),
- 2 – współczynnik przeliczenia na 100 g gleby,
- k – współczynnik empiryczny, który pozwala wyliczyć całkowitą kwasowość na podstawie jednorazowego wytrząsania, waha się od 1,5 do 2 w zależności od składu granulometrycznego gleby.

Uzyskany wynik kwasowości gleby porównać z danymi w tabeli 10.11 i zakwalifikować badaną glebę do określonej klasy.

Tabela 10.11. Gleboznawcza skala odczynu gleby.

pH (KCl)	Gleby
< 4,5	bardzo kwaśne (bielice, torfowe torfowisk wysokich)
4,6-5,5	kwaśne (bielicowe, rdzawe, płowe, torfowe torfowisk wysokich)
5,6-6,5	słabo kwaśne (czarnoziemy, brunatne, płowe, deluwialne)
6,6-7,2	obojętne (czarnoziemy, brunatne, mady, mułowo-gytiove)
> 7,2	zasadowe (rędziny, słone)

#### 10.3.4. Oznaczanie zawartości wapnia i magnezu metodą wersenianową w glebie

Zwiększenie stężenia kationów metalicznych w glebie: Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> może wpływać szkodliwie na warunki rozwoju środowiska. Wzrost zawartości wapnia w wyniku wapnowania gleb kwaśnych, wiąże się ze zwiększaniem zasolenia środowiska i naruszeniem równowagi jonowej składników pokarmowych. Pyły magnezowe (MgO) emitowane przez zakłady przeróbki magnezytu są jednym z głównych źródeł zanieczyszczenia gleb magnezem, którego wzrost stężenia może powodować zaburzenia w rozwoju roślin i zwierząt.

Jedną z właściwości gleby jest jej zdolność do sorbowania wolnych jonów z roztworu glebowego. Ilościowym parametrem określającym tę właściwość jest wielkość zwana pojemnością sorpcyjną gleby (T), zdefiniowana jako maksymalna ilość jonów, które mogą być zasorbowane w glebie wymiennie. Wylczenie wartości T polega na zsumowaniu kwasowości hydrolitycznej ( $H_h$ ), czyli jonów H<sup>+</sup> z sumą kationów zasadowych (S), np.: Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>. Pojemność sorpcyjna jest parametrem charakterystycznym dla każdej gleby.

**ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:**

1. roztwór ekstrakcyjny (octan amonu),
2. stężony roztwór NaOH,
3. 1 M roztwór NaOH,
4. 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g Na<sub>2</sub>-EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm<sup>3</sup>,
5. mureksyd (wskaźnik): rozetrzeć 0,2 g mureksydu ze 100 g NaCl,
6. 1 M roztwór HCl,
7. bufor amoniakalny (pH=10): rozpuścić 26,8 g NH<sub>4</sub>Cl w 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i mieszać z 300 cm<sup>3</sup> 25% roztworu NH<sub>4</sub>OH; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50 cm<sup>3</sup> 0,05 M roztworu MgSO<sub>4</sub> oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M Na<sub>2</sub>-EDTA, którą należy określić przez zmiareczkowanie roztworu MgSO<sub>4</sub>. Dodać 5 cm<sup>3</sup> roztworu buforowego do 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i zmierzyć odczyn tego roztworu,
8. czerń eriochromowa T (wskaźnik): rozetrzeć 0,5 g czerni eriochromowej T ze 100 g NaCl,
9. mieszadło magnetyczne, statyw, pierścień, łącznik, biureta Peleta, kolby Erlenmayera, lejek szybkozający, kolby miarowe, pipety, zlewki, cylinder, tygiel, bagietki.

**WYKONANIE OZNACZENIA:****a) oznaczenie zawartości wapnia:**

Odważyć 10 g gleby wysuszonej w temperaturze około 120 °C (uprzednio wyprażonej w temperaturze 450 °C). Umieścić w kolbie Erlenmayera, dodać 200 cm<sup>3</sup> roztworu octanu amonu i mieszać mieszadłem magnetycznym przez 2 godziny. Po tym czasie roztwór przesączyć i odmierzyć 50 cm<sup>3</sup> klarownego ekstraktu. Następnie zalkalizować stężonym roztworem zasady sodowej (NaOH) do pH=12-13 (**Uwaga!** Roztwór pobierać pipetą z gruszką). Dodać 0,2 g mureksydu i miareczkować roztworem Na<sub>2</sub>-EDTA do uzyskania barwy zgodnej ze wzorcem (uzyskanego roztworu po miareczkowaniu nie wylewać – całość pozostawić do oznaczenia stężenia magnezu).

**WZORZEC:** do kolby Erlenmayera wlać 50 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, 2 cm<sup>3</sup> roztworu 1 M NaOH, 0,2 g mureksydu oraz kroplę Na<sub>2</sub>-EDTA. Powstaje intensywne fioletowe zabarwienie mieszaniny.

Zawartość wapnia obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{V \cdot M_{Ca} \cdot c \cdot f}{m} \left( \frac{\text{mg Ca}^{2+}}{\text{kg gleby}} \right)$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA zużytego na miareczkowanie próby (dm<sup>3</sup>),  
 c – stężenie roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA (M),  
 m – masa gleby użytej do ekstrakcji (kg),

- M<sub>Ca</sub> – masa molowa wapnia (mg/mol),  
 f – współczynnik równoważności (f=4).

**b) oznaczenie zawartości magnezu:**

Fioletowy roztwór po oznaczeniu wapnia zobojętnić 1 M roztworem HCl. Podgrzewać w łaźni wodnej do zaniku zabarwienia wywołanego przez mureksyd. Ochłodzić, dodać 10 cm<sup>3</sup> buforu amoniakalnego i 0,5 g czerni eriochromowej T. Następnie miareczkować roztworem Na<sub>2</sub>-EDTA do uzyskania błękitnego zabarwienia. Obliczyć zawartość magnezu (X) ze wzoru:

$$X = \frac{V \cdot M_{Mg} \cdot c \cdot f}{m} \left( \frac{\text{mg Mg}^{2+}}{\text{kg gleby}} \right)$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA zużytego na miareczkowanie próby (dm<sup>3</sup>),  
 c – stężenie roztworu Na<sub>2</sub>-EDTA (M),  
 m – masa gleby użytej do ekstrakcji (kg),  
 M<sub>Mg</sub> – masa molowa magnezu (mg/mol),  
 f – współczynnik równoważności (f=4).

**10.3.5. Oznaczanie zawartości wybranych metali metodą AAS w glebie**

Powierzchnia gleby może być skażona metalami ciężkimi z kilku źródeł. Głównym źródłem metali jest przemysłowa i górnicza działalność człowieka. Metale ciężkie mogą również przedostawać się z opadu atmosferycznego, np. w wyniku emisji zawierających ołów spalin samochodowych. Z zakładów hutniczych do atmosfery emitowane są takie metale jak: cynk, kadm i ołów. W glebie stwierdza się także zawartość arsenu, chromu, miedzi i ołowiu, których źródło pochodzenia datuje się jeszcze na XIX wiek w wyniku powszechnego w tym okresie stosowania pestycydów (grzybobójczych) zawierających wymienione metale. Gleba często także ulega zanieczyszczeniu truciznami metalicznymi podczas pozbywania się szlamów z oczyszczalni lub nawożenia roślin ściekami, które bardzo często zawierają odpady przemysłowe o dużym stężeniu metali ciężkich.

Najczulszą metodą oznaczenia zawartości metali w glebie jest metoda **absorpcyjnej spektrometrii atomowej – AAS**. Podstawy teoretyczne metody AAS oraz zasady pomiaru zostały opisane w rozdziale 7.13.

**ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:**

1. 0,5 M roztwór HNO<sub>3</sub>,
2. 0,14 M roztwór HNO<sub>3</sub>,
3. roztwory wzorcowe metali: cynku, kadmu, kobaltu, miedzi i ołowiu o stężeniu 1 g/dm<sup>3</sup>,
4. pipety, kolby miarowe o pojemności 50 cm<sup>3</sup>, kolby Erlenmayera, mieszadło magnetyczne, spektrometr AAS.

## WYKONANIE OZNACZENIA:

## a) oznaczanie zawartości wybranych metali w próbie gleby:

Odważyć w kolbie Erlenmayera 20 g gleby powietrznie suchej i dodać 20 cm<sup>3</sup> 0,5 M roztworu HNO<sub>3</sub>. Mieszać na mieszadle magnetycznym przez 30 minut. Po tym czasie próbkę przesączyć. W przesączu oznaczyć metale metodą AAS ustawiając w spektrometrze odpowiednią długość fali dla wybranych metali (Tabela 7.5). Odczytać absorbancje, a z krzywej wzorcowej – stężenie metalu w badanej próbce.

## b) próby wzorcowe wybranych metali:

W kolbach miarowych przygotować 50 cm<sup>3</sup> roztwory wzorcowe robocze o stężeniach: 5, 10 i 20 mg/dm<sup>3</sup>, odmierzając odpowiednie ilości podstawowego roztworu wzorcowego związku metalu ciężkiego. Następnie ustawić właściwe parametry aparatu AAS: przepływ gazów oraz długość fali dla wybranych metali (Tabela 7.5). Odczytać absorbancje.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć stężenie metali ciężkich w analizowanej glebie i porównać z dopuszczalnymi stężeniami metali w glebach (Tabela 10.12).

Tabela 10.12. Dopuszczalne stężenia metali w glebach (mg/kg suchej masy).

Metal	Grupa gleb										
	A	B					C				
		Głębokość (m)									
		0-0,3		0,3-15		>15	0-2		2-15		
		Wodoprzepuszczalność gruntów (m/s)									
do		poniżej		do		poniżej		do		poniżej	
1·10 <sup>-7</sup>		1·10 <sup>-7</sup>		1·10 <sup>-7</sup>		1·10 <sup>-7</sup>		1·10 <sup>-7</sup>		1·10 <sup>-7</sup>	
Arsen	20	20	20	25	25	55	60	25	100		
Bar	200	200	250	350	300	650	1000	300	3000		
Chrom	50	150	150	190	150	380	500	150	800		
Cyna	20	20	30	50	40	300	350	40	300		
Cynk	100	300	350	300	300	720	1000	300	3000		
Kadm	1	4	5	6	4	10	15	6	20		
Kobalt	20	20	30	60	50	120	20	50	300		
Miedź	30	150	100	100	100	200	600	200	1000		
Molibden	10	10	10	40	30	210	250	30	200		
Nikiel	35	100	50	100	70	210	300	70	500		
Ołów	50	100	100	200	100	200	600	200	1000		
Rtęć	0,5	2	3	5	4	10	30	4	50		

Grupa A gleb – obszary chronione; grupa B gleb – użytki rolne, leśne, grunty zabudowane i zurbanizowane; grupa C gleb – tereny przemysłowe, kopalnie, tereny komunikacyjne. Głębokość gleby wyrażono w metrach pod poziomem terenu.

## 10.4. Badanie chemicznych zanieczyszczeń powietrza

Głównymi zanieczyszczeniami powietrza atmosferycznego są zanieczyszczenia pyłowe i gazowe: tlenki węgla, tlenki siarki, tlenki azotu, związki ołowiu i innych metali ciężkich, węglowodory alifatyczne i aromatyczne i ich pochodne chlorowe, związki fluoru. Zanieczyszczenia powietrza można sklasyfikować według następujących kryteriów:

- rodzaju działalności będącej przyczyną emisji zanieczyszczeń. Zalicza się do nich zanieczyszczenia:
  - biogenne** (naturalne), powstające w wyniku wybuchów wulkanów, erozji kontynentu i przenoszone przez wiatr nawet na duże odległości, rozpylanie wody morskiej, zawierającej chlorek sodu i siarczan magnezu, rozkładu materii martwej oraz procesów mikrobiologicznych, podczas których do atmosfery uwalniane są gazy takie jak: siarkowodór, amoniak, tlenek węgla, metan, węglowodory;
  - antropogenne**, czyli powstające w wyniku działalności człowieka (np. spalanie paliw stałych jak i gazowych, motoryzacja, przemysł metali żelaznych i nieżelaznych, przemysł materiałów budowlanych, nawozów sztucznych, chemiczny, papierniczy);
- lokalizacji emitera: punktowe, liniowe, powierzchniowe, objętościowe, stacjonarne, ruchome;
- typu emisji zanieczyszczeń: emisja zorganizowana (zakłady produkcyjne), niezorganizowana (indywidualne domy, kamienice, mieszkania);
- stanu skupienia emitowanych zanieczyszczeń (gazy, pary i aerozole);
- pochodzenia zanieczyszczeń: zanieczyszczenia własne i transgraniczne, tj. pochodzące z krajów sąsiednich;
- sposobu, w jaki zanieczyszczenie znalazło się w powietrzu:
  - pierwotne** (podstawowe) (Tabela 10.13) – występujące w postaci takich substancji chemicznych, w jakich zostały uwolnione do atmosfery ze źródła ich wytwarzania;
  - wtórne** (Tabela 10.14) – produkty reakcji chemicznych lub fotochemicznych, jakie zaszły pomiędzy naturalnymi składnikami atmosfery i zanieczyszczeniami w określonych warunkach wilgotności, temperatury i intensywności promieniowania słonecznego. Zanieczyszczenia wtórne są mniej trwałe, ale mogą być bardziej szkodliwe dla środowiska.



Tabela 10.13. Stężenia pierwotnych zanieczyszczeń powietrza.

Składnik gazowy	Przedział stężeń (ppm)
Tlenek siarki (IV)	0,002-0,5
Tlenek siarki (VI)	<0,05
Siarkowodór	0,002-0,03
Tlenek węgla (II)	0,1-50
Tlenek azotu (II)	0,01-0,4
Tlenek azotu (IV)	0,01-0,2
Amoniak	0,001-0,02
Fluorowodór	0,0001-0,5
Chlorowodór	0,005-5
Węglowodory niemetanowe	10 <sup>-5</sup> -0,01
Węglowodory aromatyczne	0,01-0,1
Aldehydy	0,001-0,1

Aerozol	Przedział stężeń (µg/m <sup>3</sup> )
Pył i sadza	10-200
Ołów	0,1-5
Cynk	0,1-2
Żelazo	0,1-10
Miedź	0,03-1
Arsen	0,01-0,5
Kadm	0,001-0,5
Mangan	0,01-0,5
Wanad	0,001-0,2
Rtęć	0,002-0,05
Sód	0,1-10
Chlor	0,1-10
Kwas siarkowy (VI)	0,1-10

Tabela 10.14. Stężenia wtórnych zanieczyszczeń powietrza.

Składnik gazowy	Przedział stężeń (ppm)
Ozon	0,01-0,2
Nadtlenek acetylu (PAN)	0-0,1
Homologi PAN	0-0,01
Inne utlenione produkty	0-0,1
Aldehydy	0-0,2

Aerozol	Przedział stężeń (µg/m <sup>3</sup> )
Siarczany	1-50
Azotany	0,1-15
Amoniak	0,1-15
Organiczne	1-50
Benzo[a]piren	0,001-0,2

Zanieczyszczenia powietrza mają szkodliwy wpływ na środowisko naturalne i zdrowie człowieka, powodują:

- zmiany widzialności oraz parametrów meteorologicznych (efekt cieplarniany, wzrost promieniowania UV, redukcja warstwy ozonowej),
- degradację roślin (redukcję plonów, zamieranie lasów),
- niszczenie materiałów budowlanych (erozja fizyczna i korozja chemiczna),
- zmiany w metabolizmie człowieka i zwierząt, prowadzące do różnych stanów chorobowych (Tabela 10.15).

Tabela 10.15. Biologiczne oddziaływanie gazów toksycznych na organizm człowieka.

Krytyczne układy	Trucizny gazowe
Układ krążenia	CO, NO <sub>x</sub>
Układ krwionośny	SO <sub>x</sub> , O <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S
Ośrodkowy układ nerwowy	NO <sub>x</sub> , CO, H <sub>2</sub> S, NH <sub>3</sub>
Układ oddechowy	SO <sub>x</sub> , NO <sub>x</sub> , O <sub>3</sub> , CO, H <sub>2</sub> S, NH <sub>3</sub> , HF
Układ odpornościowy	O <sub>3</sub>
Układ hormonalny	O <sub>3</sub>

Oznaczanie stężeń substancji toksycznych znajdujących się w powietrzu składa z następujących etapów:

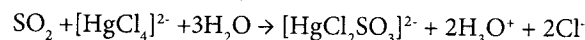
1. pobierania próbki powietrza odpowiednimi metodami:
  - a) manualnymi dokonywanymi przez człowieka (**pasywnymi** – zanieczyszczenia osadzają się na powierzchni substancji aktywnej; **aspiracyjnymi** – powietrze przepuszcza się przez substancje pochłaniające, reagujące z odpowiednim związkiem toksycznym; **izolacyjnymi** – pobiera się określoną objętość powietrza do analiz),
  - b) automatycznymi, gdzie pobieranie i analizę próby wykonuje autoanalyzer gazowy;
2. analizy ilościowej pobranej próbki zanieczyszczeń, głównie za pomocą pomiarów spektrofotometrycznych, kulometrycznych, potencjometrycznych, AAS (metale ciężkie), grawimetrii (pyły) oraz wszelkich rodzajów chromatografii (związki organiczne);
3. przeliczenia wyników analizy na wymaganą jednostkę stężeń.

#### 10.4.1. Oznaczanie zawartości ditlenku siarki w powietrzu

Ditlenek siarki w atmosferze pochodzi głównie z aktywności wulkanicznej oraz spalania paliw kopalnianych, zawierających duże ilości siarki. Toksyczne działanie ditlenku siarki na organizmy zwierzęce polega na podrażnieniu a nawet uszkodzeniu tkanek górnych dróg oddechowych, czego skutkiem jest skurcz oskrzeli i utrudnione oddychanie. U roślin związek ten powoduje uszkodzenia i wybielenie liści. SO<sub>2</sub> dobrze rozpuszcza się w kroplach wody tworząc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, które opadają jako kwaśne deszcze. Powoduje to bezpośrednie uszkodzenie liści i korzeni roślin oraz zakwaszenie gleb. Skutkiem zakwaszenia gleb jest wymywanie substancji odżywczych, ponieważ jony wodorowe wypierają niezbędne pierwiastki (np. wapń, magnez, potas, sód). Rośliny rosnące w takim środowisku mogą więc wykazywać braki jednego lub więcej mikroelementów. Kwaśny deszcz zwiększa ruchli-

wość jonów i w ten sposób dostępność zanieczyszczeń zawierających metale ciężkie (np. glin, mangan, żelazo) w glebie oraz ich toksyczny wpływ na organizmy żywe.

W celu oznaczenia ditlenku siarki powietrze jest przepuszczane przez wodny roztwór tetrachlorortęcianu (II) sodu, który pochłania  $\text{SO}_2$  ilościowo już od stężenia 0,002 ppm według równania reakcji:



Do otrzymanego roztworu dodaje się kwas amidosulfonowy  $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ , w celu zredukowania ditlenku azotu obecnego w powietrzu, który mógłby zaburzyć barwę reagentów. Następnie dichlorosiarczan rtęci reaguje z aldehydem mrówkowym i *p*-rozaliną w roztworze, którego niskie pH utrzymywane jest za pomocą  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Kwas metylosulfonowy powstający w tej reakcji wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda = 575 \text{ nm}$  i  $\text{pH} = 1$ . Metoda ta pozwala oznaczyć zawartość  $\text{SO}_2$  w zakresie stężeń 0,002-5 ppm.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór pochłaniający (do kolby miarowej o pojemności 1000  $\text{cm}^3$  odważyć 13,6 g  $\text{Hg}_2\text{Cl}$ , 5,85 g  $\text{NaCl}$  i 0,07 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  rozpuścić w wodzie destylowanej. Roztwór uzupełnić do objętości 1000  $\text{cm}^3$ ),
2. roztwór podstawowy chlorowodoru *p*-rozaliny i rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000  $\text{cm}^3$ . Przed użyciem rozcieńczyć według poniższego przepisu (punkt a),
3. 0,2% roztwór aldehydu mrówkowego,
4. roztwór kwasu amidosulfonowego (0,3 g rozpuścić w 25  $\text{cm}^3$  wody),
5. roztwór roboczy  $\text{SO}_2$  (1  $\text{cm}^3$  zawiera 0,01 mg  $\text{SO}_2$ ),
6. stężony  $\text{HCl}$  cz.d.a.,
7. spektrofotometr, kuwety, aspirator powietrza (do pobrania prób), licznik gazu, płuczki (aparaty wypełnione odpowiednim, płynnym sorbentem, przez który przepuszcza się próbkę powietrza do analiz), pipety, kolby miarowe, cylinder.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

##### a) przygotowanie roztworu roboczego chlorowodoru *p*-rozaliny:

Do kolby miarowej o pojemności 100  $\text{cm}^3$  odmierzyć 20  $\text{cm}^3$  roztworu podstawowego chlorowodoru *p*-rozaliny i 3  $\text{cm}^3$  stężonego  $\text{HCl}$ . Dokładnie wymieszać i po 5 minutach uzupełnić do kreski wodą destylowaną (roztwór jest trwały przez 2 tygodnie w temperaturze 4 °C).

##### b) wykres wzorcowy:

Skalę wzorcową przygotować, odmierzając do kolbek stożkowych o pojemności 25  $\text{cm}^3$  odpowiednie objętości roztworów:  $\text{SO}_2$  (zawierającego 0,01 mg  $\text{SO}_2/1 \text{ cm}^3$ ) i roztworu pochłaniającego (Tabela 10.16).

Tabela 10.16. Skład roztworów wzorcowych  $\text{SO}_2$ .

Nr wzorca	Objętość roztworu roboczego <i>p</i> -rozaliny ( $\text{cm}^3$ )	Objętość roztworu pochłaniającego ( $\text{cm}^3$ )	Zawartość $\text{SO}_2$ (mg)
1	0	10	0
2	0,1	9,9	0,001
3	0,5	9,5	0,005
4	1,0	9,0	0,010
5	2,0	8,0	0,020
6	3,0	7,0	0,030

Następnie dodać po 0,5  $\text{cm}^3$  kwasu amidosulfonowego, wymieszać, po 10 minutach dodać 1  $\text{cm}^3$  aldehydu mrówkowego i roztworu roboczego chlorowodoru *p*-rozaliny, każdorazowo mieszając. Po upływie 20 minut zmierzyć 3-krotnie absorbancję przy długości fali  $\lambda = 560 \text{ nm}$  w kuwetach o grubości warstwy 1 cm, wobec próby ślepej (roztwór nr 1 z tabeli 10.14). Na podstawie uzyskanych danych wykreślić krzywą wzorcową (zależność absorbancji od zawartości  $\text{SO}_2$  wyrażonej w mg).

##### c) oznaczanie ditlenku siarki w próbie badanej:

Napełnić płuczkę 10  $\text{cm}^3$  roztworu pochłaniającego i przepuszczać powietrze przez 20 minut z prędkością 60  $\text{dm}^3/\text{godz}$ . (mierząc ilość przepuszczonego powietrza). Zawartość płuczki przenieść do kolby miarowej o pojemności 50  $\text{cm}^3$ , dopełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać. Do kolby stożkowej o pojemności 25  $\text{cm}^3$  odmierzyć 10  $\text{cm}^3$  badanego roztworu, dodać 0,5  $\text{cm}^3$  roztworu kwasu amidosulfonowego, wymieszać i pozostawić na 10 minut. Następnie dodać kolejno, mieszając: 1  $\text{cm}^3$  aldehydu mrówkowego i 1  $\text{cm}^3$  roztworu wzorcowego roboczego. Po 20 minutach i nie później niż po 40 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali  $\lambda = 550 \text{ nm}$ , stosując jako odnośnik próbę ślepą (próba nr 1 sporządzona dla wykresu wzorcowego). Ilość ditlenku siarki w próbce odczytać z krzywej wzorcowej. Zawartość  $\text{SO}_2$  w  $\text{m}^3$  badanego powietrza ( $X$ ) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{f \cdot m}{V} \left( \frac{\text{mg SO}_2}{\text{m}^3} \right)$$

gdzie:

$m$  – zawartość ditlenku siarki odczytana z krzywej wzorcowej (mg),

$V$  – objętość przepuszczonego powietrza ( $\text{m}^3$ ),

$f$  – stosunek objętości cieczy wprowadzonej do płuczki do objętości pobranej do oznaczenia.

Uzyskane wyniki zawartości  $\text{SO}_2$  w badanym powietrzu porównać z dopuszczalnymi poziomami stężeń zanieczyszczeń powietrza (Tabela 10.17).

Tabela 10.17. Poziomy dopuszczalnych stężeń wybranych substancji toksycznych powietrza.

Substancja	Dopuszczalny poziom substancji ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) w powietrzu uśredniony dla:	
	jednej godziny	roku kalendarzowego
Ditlenek azotu	200	40
Tlenki azotu	-	40
Ditlenek siarki	350	20
Tlenek węgla	30000	-
Pył zawieszony	280	40
Arsen	0,2	0,01
Bar	30	1,6
Chrom	4,6	0,4
Cyna	50	3,8
Cynk	50	3,8
Kadm	0,52	0,01
Kobalt	5	0,4
Miedź	20	0,6
Molibden	35	0,1
Nikiel	0,23	0,025
Ołów	5	0,5
Rtęć	0,7	0,04
Tal	1	0,13

#### 10.4.2. Oznaczanie zawartości tlenków azotu w powietrzu

Tlenek azotu (NO) i ditlenek azotu (NO<sub>2</sub>) często są traktowane łącznie jako tlenki azotu NO<sub>x</sub>. W powietrzu tlenki azotu mogą pochodzić ze źródeł naturalnych, takich jak wyładowania atmosferyczne, wybuchy wulkanów, bakteryjne trawienie materii organicznej. Naturalne stężenie NO<sub>x</sub> kształtuje się na poziomie 0,01 ppm. Antropogeniczne (zarówno w warunkach domowych jak i przemysłowych) wytwarzanie tlenków azotu jest związane ze spalaniem paliw kopalnych stałych jak i gazowych w wysokiej temperaturze, gdy możliwa jest reakcja azotu z tlenem. Ważnym źródłem NO<sub>x</sub> są silniki spalinowe i odrzutowe. Tlenki azotu mogą przedstawiać się do atmosfery również z procesów produkcyjnych z udziałem stężonego kwasu azotowego oraz procesów pirotechnicznych.

Tlenki azotu są związkami aktywnymi chemicznie. Dobrze rozpuszczają się w wodzie, tworząc HNO<sub>3</sub> i HNO<sub>2</sub>, które mają znaczny udział w tworzeniu kwaśnych deszczy. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego reagują z węglowodarami, przyczyniając się do tworzenia smogu fotochemicznego. Działają drażniąco na błony śluzowe dróg oddechowych, przy wyższych stężeniach mogą wywoływać obrzęk płuc, rozszerzenie naczyń krwionośnych wywołujące spadek ciśnienia krwi,

bóle i zawroty głowy. Nadmierne stężenie tlenków azotu w środowisku powoduje uszkodzenie roślin, tworzenie się w glebie mutagennych i rakotwórczych nitrozamin.

Oznaczanie tlenków azotu NO<sub>x</sub> polega na przepuszczeniu próbki powietrza przez roztwór kwasu sulfanilowego (sorbent) wypełniającego specjalne płuczki (metoda aspiracyjna). W obecności tlenków azotu kwas sulfanilowy ulega reakcji dwuazowania, a otrzymany produkt poddaje się sprzęganiu z chlorowodorkiem *N*-1-naftyloetylenodiaminy. W wyniku reakcji tworzy się barwnik azowy koloru różowego. Pomiarów absorbancji barwnego roztworu dokonuje się przy długości fali  $\lambda = 550 \text{ nm}$ . Jeżeli pożądane jest oznaczanie sumy tlenków azotu NO<sub>x</sub>, to konieczne jest wstępne utlenienie tlenku azotu do N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, najczęściej za pomocą manganianu (VII) potasu.

Technikę tę można wykorzystać także do oznaczania tlenków azotu metodą pasywną. Krążki z włókna sztucznego nasycy się wówczas 20% roztworem trietanoloaminy i w odpowiednich próbnikach wystawia na ekspozycję powietrza przez 24 godziny. Następnie krążki spłukuje się roztworem soli Saltzmana i mierzy absorbancję roztworu analogicznie do metody aspiracyjnej.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. plyn pochłaniający: do kolby miarowej o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> odważyć 1 g arsenianu (III) sodu, 10 g NaOH, 7,5 g kwasu sulfanilowego. Wszystkie składniki rozpuścić w wodzie destylowanej. Uzupełnić do objętości 1000 cm<sup>3</sup>,
2. roztwór utleniający: do kolby miarowej o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> odważyć 3 g manganianu (VII) potasu i rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej. Dodać 2 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i uzupełnić wodą destylowaną do kreski,
3. roztwór chlorowodoru *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy (odważyć 0,2 g chlorowodoru *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy i 60 g kwasu szczawowego (dwuwodnego), rozpuścić w wodzie destylowanej. Roztwór uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 cm<sup>3</sup>),
4. roztwór wzorcowy podstawowy azotanu (III) sodu, w którym w 1 cm<sup>3</sup> znajduje się 0,1 mg NO<sub>2</sub> (0,150 g azotanu (III) sodu rozpuścić w 1000 cm<sup>3</sup> wody destylowanej),
5. spektrofotometr, kuwety, aspirator powietrza, licznik gazu, płuczki, pipety, kolby miarowe, cylinder, zlewki, bagietki.

#### WYKONANIE OZNACZENIA:

##### a) wykres wzorcowy:

Z roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu 0,1 mg NO<sub>2</sub>/cm<sup>3</sup> przygotować roztwór wzorcowy roboczy. W tym celu do kolby miarowej na 100 cm<sup>3</sup> wprowadzić 10 cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego i dopełnić wodą destylowaną do kreski (1 cm<sup>3</sup> zawiera 10  $\mu\text{g}$  NO<sub>2</sub>).

Serię wzorców przygotować, odmierzając do zlewek o pojemności 25 cm<sup>3</sup> następujące składniki: roztwór wzorcowy roboczy ditlenku azotu, plyn pochłaniający i roztwór chlorowodorku *N*-1-(naftylo)-etylenodiaminy według tabeli 10.18. Dokładnie wymieszać i po 5 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali  $\lambda=550$  nm w kuwetach o grubości warstwy 1 cm, stosując jako roztwór odniesienia (próbę ślepa) wzorzec numer 1. Pomiar absorbancji powtórzyć trzy razy. Sporządzić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia ditlenku azotu (mg).

Tabela 10.18. Skład roztworów wzorcowych NO<sub>2</sub>.

Nr wzorca	Objętość roztworu (cm <sup>3</sup> )			Zawartość NO <sub>2</sub> (μg)
	wzorcowego roboczego	pochłaniającego	chlorowodorku <i>N</i> -1-(naftylo)-etylenodiaminy	
1	0	5	3	0
2	0,1	4,9	3	1
3	0,2	4,8	3	2
4	0,4	4,6	3	4
5	0,6	4,4	3	6
6	0,8	4,2	3	8
7	1,0	4,0	3	10

#### b) oznaczanie tlenków azotu w próbce badanej:

Do pierwszej płuczkii zestawu wlać pipetą 10 cm<sup>3</sup> roztworu utleniającego, do drugiej 10 cm<sup>3</sup> roztworu pochłaniającego. Powietrze przepuszczać przez zestaw w ciągu 30 minut z prędkością 10 dm<sup>3</sup>/godz. Zmierzyć objętość roztworu w drugiej płuczce po przepuszczeniu powietrza. Pobrać 5 cm<sup>3</sup> tego płynu, dodać 3 cm<sup>3</sup> roztworu chlorowodorku *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy, wymieszać i zmierzyć absorbancję na spektrofotometrze przy długości fali  $\lambda=550$  nm, stosując jako odnośnik próbę nr 1. Zawartość ditlenku azotu (m) odczytać z krzywej wzorcowej. Stężenie sumy tlenków azotu (c) (mg/m<sup>3</sup>), przeliczone na pięciotlenek diazotu (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), obliczyć według wzoru:

$$c = \frac{1,17 \cdot V_r \cdot m}{V_p \cdot V_a} \left( \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} \right)$$

gdzie:

- 1,17 – współczynnik przeliczeniowy ditlenku azotu na pięciotlenek diazotu,
- $V_r$  – objętość roztworu pochłaniającego w płuczce zmierzona po przepuszczeniu powietrza (cm<sup>3</sup>),
- $m$  – masa ditlenku azotu odczytana z krzywej wzorcowej (μg),
- $V_p$  – objętość powietrza przepuszczonego przez płuczkę (dm<sup>3</sup>),
- $V_a$  – objętość roztworu pobranego do analizy (cm<sup>3</sup>).

Uzyskane wyniki zawartości tlenków azotu w badanym powietrzu porównać z dopuszczalnymi stężeniami zanieczyszczeń powietrza (Tabela 10.17).

#### 10.4.3. Oznaczanie zanieczyszczeń pyłowych i zawartości wybranych metali w pyłe

Obok substancji chemicznych, emitowanych w postaci par i gazów, ważnym zanieczyszczeniem powietrza są różnego rodzaju dymy, pyły, kurz, metale i inne związki w postaci stałej. Pyłami przyjęto nazywać układ koloidalny, w którym fazą rozpraszającą jest gaz, a fazą rozproszoną – ciało stałe. Pyły występujące na Ziemi mogą być pochodzenia:

1. **naturalnego** (wietrzenie i erozja skał, działalność wulkaniczna, burze piaskowe, dyspersja wody morskiej, pożary lasów i stepów),
2. **antropogennego**, związanego z działalnością człowieka (zanieczyszczenia motoryzacyjne, przemysłowe: górnictwo, ciepłownictwo, cementownie, nawozy sztuczne).

Emisja pyłów do środowiska powoduje redukcję promieniowania słonecznego i ogranicza widzialność. Pyły mogą wpływać katalitycznie na reakcje zachodzące w atmosferze, np. biorą udział w powstaniu smogu fotochemicznego i kwaśnych opadów. Osiedlają na roślinach, uszkadzając je, a wdychane przez ludzi mogą zalegać w układzie oddechowym, przyczyniając się do poważnych schorzeń (podrażnienia mechaniczne górnych dróg oddechowych, choroby chroniczne płuc, infekcje, stany zapalne). Pył zawieszony w rejonach uprzemysłowionych zawiera znaczne ilości metali ciężkich (kadm, ołów, rtęć, beryl), które są toksyczne już w stosunkowo małym stężeniu. Ponadto cząstki pyłu bardzo łatwo absorbują na swojej powierzchni SO<sub>2</sub>, który w obecności wilgoci tworzy kwas siarkowy (VI). Jeśli w tej postaci dostaną się do układu oddechowego, warstwa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ulega rozpuszczeniu przez płyn płucny, powodując poważne uszkodzenia tkanek układu oddechowego.

W zależności od działania biologicznego pyły można podzielić na:

- **pyły o działaniu zwłókniającym (pylicowym)**: pyły pochodzenia mineralnego – pyły zawierające pochodne krzemu (azbest) po wnikięciu do układu oddechowego powodują rozrost w płucach tkanki łącznej;
- **pyły o działaniu alergizującym**: pyły pochodzenia organicznego – pył bawełny, lnu, konopi, tytoniu, herbaty, zboża, jedwabiu, sierści zwierzęcej, po wnikięciu do układu oddechowego może powodować uczulenia;
- **pyły o działaniu drażniącym**: nierozpuszczalne ciała stałe – korund, szkło, węgiel kamienny, rudy żelaza mogą powodować nieżyty dróg oddechowych;
- **pyły o działaniu toksycznym**: związki chemiczne rozpuszczalne w płynach ustrojowych – np. związki fluoru, ołowiu, chromu;

- **pyły radioaktywne i aerozole pyłowe:** zawierają pierwiastki promieniotwórcze.

Szkodliwe działanie pyłów zależy od ich rodzaju (jak wyżej), wielkości ziarna, stężenia i czasu narażenia. W pęcherzykach płucnych głównie odkładają się ziarna o wielkości 1-5  $\mu\text{m}$ . Stopień zapylenia określa się jako ilość mg pyłu w  $\text{m}^3$  lub jako liczbę cząstek pyłu w  $1 \text{ cm}^3$  powietrza (powierzchnia właściwa pyłu).

Wykonanie oznaczenia zawartości metali ciężkich w pyłe można dokonać za pomocą metody **absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS)**. Podstawy teoretyczne metody AAS oraz zasady pomiaru zostały opisane w rozdziale 7.13.

#### ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. stężony  $\text{HNO}_3$ ,
2. 0,14 M roztwór  $\text{HNO}_3$ ,
3. roztwory wzorcowe metali o stężeniu 1  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ,
4. zestaw do pobierania próbek powietrza, spektrometr AAS, ekcykator, szalki Petriego, zlewki, łaźnia wodna, kolbki miarowe, pipety.

Założyć zważony dokładnie sącdek i zestawić aparaturę do pobierania próbek powietrza. Odczytać stan licznika. Włączyć pompę i ustalić przepływ powietrza na  $60 \text{ dm}^3/\text{godz}$ . Po pobraniu próbki (po 24 godzinach ekspozycji) pompę wyłączyć i odczytać stan licznika. Obliczyć stężenie pyłu zawieszonego w  $\text{mg}/\text{m}^3$  powietrza. Następnie sącdek umieścić w zlewce o pojemności  $150 \text{ cm}^3$  i dodać  $7,5 \text{ cm}^3$  stężonego  $\text{HNO}_3$ . Ogrzewać delikatnie w łaźni wodnej do rozłożenia sącza i odparować prawie do sucha. Ponownie dodać  $2,5 \text{ cm}^3$  porcję stężonego  $\text{HNO}_3$  i znowu odparować prawie do sucha. Pozostałość przenieść do kolbki  $50 \text{ cm}^3$ , przemyć zlewki  $0,14 \text{ M}$  roztworem  $\text{HNO}_3$  i tym roztworem uzupełnić kolbkę do kreski. Równolegle, przygotować analogicznie próbę kontrolną (sącdek tej samej wielkości niewystawiony na działanie powietrza).

Wykonać pomiar stężenia metali ciężkich w pyłe zawieszonym ustawiając w spektrometrze AAS odpowiednie długości fal dla metali (Tabela 7.5). Odczytać absorbancje dla roztworów wzorcowych metali. Na podstawie uzyskanych danych obliczyć zawartość metali w powietrzu. Wyniki podać w  $\text{mg}$  metalu/ $\text{m}^3$  i porównać z wartościami dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń powietrza (Tabela 10.17).

## 11 TESTY TOKSYCZNOŚCI DLA ORGANIZMÓW

Toksykologia opiera się na standardowych testach toksyczności różnych substancji chemicznych. Testy te przeprowadza się na zwierzętach kręgowych i bezkręgowych oraz roślinach. Testy toksykologiczne są podstawowym narzędziem działu toksykologii zwanej **toksykometrią**, która zajmuje się ilościową oceną toksyczności substancji chemicznych na podstawie pomiarów toksyczności u różnych organizmów. Testy toksyczności służą do oceny zależności dawka-odpowiedź, obejmują badania toksyczności ostrej (wyznaczenie dawki letalnej lub stężenia letalnego w krótkotrwałym teście), toksyczności podostrej (powtarzanie dawkowania w okresie 2, 3 i 4 tygodni) i toksyczności podprzewlekłej (powtarzanie dawkowania do 3 miesięcy). Ocenia się także działanie rakotwórcze, teratogenne, drażniące, uczulające, neurotoksyczne oraz wpływ na wybrane parametry demograficzne.

### 11.1. Testy toksyczności na kręgowcach

W badaniach na zwierzętach wyróżnia się trzy typy zatrucia: ostre, podostre i przewlekłe. Określenie stopnia **zatrucia ostrego** dotyczy określenia wartości  $\text{LD}_{50}$ . Grupie zwierząt (5-10 samców i takiej samej liczbie samic) podaje się badany związek chemiczny w 3-6 różnych dawkach. Następnie tabelaryzuje się liczbę zwierząt, które padną w ciągu 14 dni. Systematycznie odnotowywane są następujące parametry: masa ciała zwierząt i zauważone zmiany w ich zachowaniu. Na zakończenie doświadczenia uśmierca się także zwierzęta, które przeżyły. Grupę badaną wraz ze zwierzętami kontrolnymi bada się pod względem zmian patologicznych.

Badania zatrucia podostrego obejmują codzienne podawanie testowanego związku w trzech różnych dawkach: **maksymalnie tolerowanej dawce** (MTD), **najniższego obserwowalnego efektu szkodliwego** (LOAEL) oraz **nieobserwowalnego efektu szkodliwego** (NOAEL). Testowany związek jest podawany na dwa sposoby, z których jeden jest taki sam, na jaki może być narażony człowiek. Badaną substancję można wprowadzić drogą oddechową, dożyłkowo, podskórnie, dożylnie lub otrzewnowo. Czas trwania testu wynosi do 90 dni. Systematycznie odnotowywane są następujące parametry: śmiertelność badanych zwierząt, masa ciała i zmiany w zachowaniu. Analizę krwi przeprowadza się w połowie doświadczenia i przed jego zakończeniem. Na koniec doświadczenia uśmierca się wszystkie zwierzęta do badań patologicznych.

Badania prowadzi się na zdrowych i dojrzałych płciowo białych myszach, szczurach, świnkach morskich, kotach, psach i królikach. Kryterium wyboru zwierzęcia do badań jest metabolizm substancji toksycznej najbardziej podobny do jej metabolizmu u człowieka. Dobierając zwierzęta do badań należy określić ich płeć, masę ciała i wiek, a także ustalić drogę wprowadzenia substancji do ustroju oraz czas trwania doświadczenia. Najczęstszym rodzajem zwierząt w testach toksyczności są białe szczury, samce i samice szczepu Wistar, w wieku 2-4 miesięcy i masie ciała 150-300 g, przy czym różnica masy ciała nie może przekraczać  $\pm 15\%$ .

W celu wstępnego określenia dawki śmiertelnej wykorzystuje się **metodę Deichmana i LeBlanca**. Według niej pierwszym testowanym zwierzętom podaje się 100% dawki substancji, zaś każdemu następnemu zwierzęciu dawkę o 50% mniejszą lub większą w zależności od tego czy pierwsze zwierzę padło, czy przeżyło. Najniższą dawkę, przy której stwierdzono padnięcie zwierzęcia przyjmuje się jako **wstępnie określoną dawkę śmiertelną**.

W celu oznaczenia dawki  $LD_{50}$  wykorzystuje się szereg metod, które pozwalają z dostateczną precyzją ocenić tę dawkę stosując odpowiednie, statystyczne wyliczenia, nawet gdy liczba zwierząt nie przekracza 10 sztuk. Znane są metody Kärbera, Behrensa, Thompsona, Trevena czy Kadłubowskiego.  $LD_{50}$  jest dawką wywołującą śmierć 50% zwierząt wziętych do doświadczenia.

#### a. Oznaczenie $LD_{50}$ metodą Thompsona

W metodzie Thompsona używa się 4 grupy zwierząt (po 6 sztuk w każdej grupie) stosując 4 poziomy dawkowania. Zwierzętom z każdej grupy podaje się badaną substancję, każdorazowo zwiększając dawkę o współczynnik postępu geometrycznego ustalony na podstawie doświadczenia wstępnego. Na 16 godzin przed podaniem badanej substancji wstrzymuje się podawanie pokarmu, jedynie podając bez ograniczeń wodę. W pierwszym okresie występowania objawów zatrucia, po wprowadzeniu substancji do ustroju, należy dokonywać obserwacji i odnotowywać padnięcia w 2-godzinnych odstępach, później co 24 godziny przez okres 14 dni.

Średnią dawkę śmiertelną  $A-LD_{50}$  oblicza się według wzoru Weila:

$$\log m \cong \log D_a + d \cdot (f + 1)$$

gdzie:

- $m$   $\cong$  wartość  $A-LD_{50}$ ,
- $D_a$  – najniższa stosowana dawka,
- $d$  – logarytm iloczynu kolejnych dawek (współczynnika postępu geometrycznego),
- $f$  – wartość tabelaryczna odczytana z tablic Weila.

#### b. Oznaczenie $LD_{50}$ metodą Kärbera

Dawkę  $LD_{50}$  metodą Kärbera oblicza się według następującego wzoru:

$$LD_{50} = D - \frac{z \cdot d}{n}$$

gdzie:

- $D$  – dawka, przy której giną wszystkie zwierzęta w grupie,
- $z$  – połowa sumy zwierząt padłych po 2 kolejnych dawkach,
- $d$  – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek,
- $n$  – liczba zwierząt w grupie.

#### ĆWICZENIE

Na podstawie przedstawionych powyżej informacji oznaczyć wstępnie określoną dawkę śmiertelną oraz  $LD_{50}$  badanej substancji jedną z wybranych metod oraz określić wartości toksyczne badanej substancji (Tabela 11.1). Uzyskane obserwacje i wyniki doświadczenia przedstawić w tabelach 11.2 i 11.3.

Tabela 11.1. Stopień i klasa toksyczności według Hodge'a i Sternera.

Wartości toksyczne	Klasa toksyczności	$LD_{50}$ jednorazowo doustnie u szczurów
1	nadzwyczaj toksyczna	$\leq 1$ mg/kg
2	silnie toksyczna	1-50 mg/kg
3	średnio toksyczna	50-500 mg/kg
4	słabo toksyczna	0,5-5 g/kg
5	praktycznie nietoksyczna	5-15 g/kg
6	stosunkowo nietoksyczna	$\geq 15$ g/kg

Tabela 11.2. Zależność między śmiertelnością zwierząt a wielkością dawki.

Dawka (g/kg)	Liczba zwierząt		Odsetek zwierząt padłych	Czas od podania do uzyskania efektu śmiertelnego
	w grupie	padłych		

Tabela 11.3. Toksyczność ostra A-LD<sub>50</sub>.

Dawka A-LD <sub>50</sub> (g/kg)	Granice 95% przedziału ufności	Stopień i klasa toksyczności

## 11.2. Testy toksyczności na organizmach wodnych

Podstawowe zasady testowania toksyczności substancji chemicznych na organizmach wodnych są podobne do wyżej opisanych testów dla kręgowców. Różnica jedynie polega na drodze wnikania toksyn, które u organizmów wodnych dostają się bezpośrednio z wody lub z pokarmem. Testy toksyczności wykonywane na zwierzętach i roślinach wodnych dotyczą bezpośredniego przenikania substancji chemicznych z wody. Związki toksyczne mogą występować w roztworze, zawiesinie lub obu formach. Aby określić medianę stężenia letalnego, organizmy ekspozuje się na różne stężenia toksyn w wodzie. Dużą trudność w testowaniu toksyn na organizmach wodnych sprawia utrzymanie stałego stężenia substancji chemicznej w wodzie. Straty substancji z wody powoduje absorpcja i metabolizm przez organizm testowy oraz ulatnianie się, degradacja i adsorpcja z wody. W związku z tym testy można przeprowadzać w następujących układach:

1. **statycznym** – gdy szybkość zmniejszania się stężenia jest mała (brak wymiany wody w czasie trwania eksperymentu);
2. **semistatycznym** – woda wymieniana jest regularnie, zazwyczaj co 24 godziny.

Toksyczny wpływ danej substancji zależy od stężenia w miejscu działania, który wiąże się ze stężeniem substancji w wodzie i czasem ekspozycji organizmu. Ze wzrostem czasu ekspozycji wartość LD<sub>50</sub> maleje, aż osiąga progowe stężenie letalne. Przedłużanie ekspozycji organizmu na działanie toksyny nie powoduje już wtedy żadnych zmian w śmiertelności. Zatem można założyć, że układ jest w stanie równowagi. W celu wstępnego określenia dawki śmiertelnej wykorzystuje się meto-

dę Deichmana i LeBlanca, której zasada została przedstawiona w powyższym podrozdziale. Zasadniczym problemem jest określenie czasu działania testowanej substancji na organizm wodny. Typową miarą toksyczności jest 48-godzinny LD<sub>50</sub> dla *Daphnia* i 96-godzinny LD<sub>50</sub> dla ryb w układach statycznych.

### 11.2.1. Test toksyczności na rozwielitkach

#### ĆWICZENIE

W teście wykorzystuje się świeżo przeobrażone rozwielitki *Daphnia magna*, jednak nie starsze niż 24-godzinne. Osobniki umieszcza się pojedynczo w 100 cm<sup>3</sup> zlewce z 60-80 cm<sup>3</sup> roztworu. Zazwyczaj wykonuje się 10 powtórzeń dla 5 testowanych stężeń, w tym kontroli. Test odbywa się w temperaturze 20 °C, przy 16-godzinnym czasie naświetlania i 8-godzinnym okresie ciemności. W trakcie hodowli rozwielitki karmi się glonami z rodzaju *Chlorella* bądź *Scenedesmus*. Co 2-3 dni liczy się, ile osobników przeżyło i ile urodziło się młodych. Następnie dorosłe osobniki przenosi się do świeżego roztworu testowanego, a młode usuwa się. Pierwszy wylęg obserwuje się po 8-10 dniach, kolejne pojawiają się przeciętnie w 2-dniowych odstępach czasu. Test trwa 21 dni, co stanowi pięć wylęgów rozwielitek. Dane dotyczące reprodukcji wykorzystuje się do obliczeń najniższego stężenia wywołującego efekt szkodliwy (LOEC) oraz największego stężenia niepowodującego dający się obserwować efekt szkodliwy (NOEC). Dodatkowo porównuje się liczbę nowo urodzonych w przeliczeniu na samicę, która przeżyła traktowanie toksyną, z potencjałem rozrodczym rozwielitek kontrolnych. Należy oznaczyć wstępnie określoną dawkę śmiertelną oraz obliczyć LD<sub>50</sub> badanej substancji metodą Kärbera. Uzyskane obserwacje i wyniki doświadczenia przedstawić w tabeli 11.4.

Tabela 11.4. Zależność między śmiertelnością rozwielitek a wielkością dawki.

Dawka (g/kg)	Liczba rozwielitek		Odsetek rozwielitek padłych	Czas od podania do uzyskania efektu śmiertelnego
	całkowita	padłych		

Dawkę LD<sub>50</sub> metodą Kärbera oblicza się według następującego wzoru:

$$LD_{50} = D - \frac{z \cdot d}{n}$$

gdzie:

- D – dawka, przy której giną wszystkie rozwielitki,
- z – połowa sumy rozwielitek padłych po 2 kolejnych dawkach,
- d – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek,
- n – całkowita liczba rozwielitek w grupie.

## 11.2.2. Test toksyczności na glonach

## ĆWICZENIE

W teście wykorzystuje się kultury glonu zielenicy *Chlorella vulgaris*, które przed zasadniczym eksperymentem należy poddać synchronizacji faz rozwojowych. W tym celu kultury glonów należy przenieść na skosy agarowe i poddać działaniu światła ciągłego o niskim natężeniu (2-3 klx) i stałej temperatury (25 °C). Po okresie 7-10 dni glony z inokulum przenieść do pożywki Knopa (Tabela 11.5) i poddać działaniu wysokiego natężenia światła (10 klx) w ciągu 5 dni i niskiego (1 klx) w ciągu kolejnych 2-3 dni. Ostatecznie kultury glonów poddać optymalnym warunkom dla synchronizacji, tj. 3-4 cyklom 70-godzinnego naświetlania o natężeniu 10 klx i 24-godzinnego okresu ciemności. Następnie glony przenieść do kolby Erlenmayera o pojemności 250 cm<sup>3</sup> ze 100 cm<sup>3</sup> roztworu. Zazwyczaj wykonuje się 10 powtórzeń dla 5 testowanych stężeń, w tym kontroli. Test odbywa się w temperaturze 25 °C, przy 16-godzinnym czasie naświetlania i 8-godzinnym czasie ciemności. Co 12-24 godzin lub krócej, w zależności od badanej substancji, oznacza się liczbę komórek *Chlorella vulgaris*. Zagęszczenie komórek można ocenić w **pomiarach bezpośrednich** (liczenie w komorze Bürkera pod mikroskopem). W tym celu należy wykonać następujące czynności:

1. przygotować mikroskop oraz komorę Bürkera do mikroskopowania;
2. pobrać, po uprzednim dokładnym wymieszaniu, 100 μl zawiesiny glonów;
3. zawiesinę wpuścić pod szkiełko nakrywkowe komory Bürkera;
4. przeliczyć ilość komórek glonów w 81 małych kwadratach, pomijając jeden; oznaczenie należy powtórzyć, co najmniej 3-krotnie. Liczbę komórek glonów obliczyć według następującego wzoru:

$$LK = a \cdot v \cdot 5 \cdot 10^4$$

gdzie:

- LK – liczba komórek,
- a – ilość komórek w 80 kwadratach,
- v – objętość zawiesiny w cm<sup>3</sup>.

Jedną z metod **pomiarów pośrednich** jest metoda spektrofotometrycznego pomiaru gęstości przy długości fali 680 nm lub wykorzystanie elektronicznego licznika cząstek.

Dane dotyczące liczby komórek glonów wykorzystuje się do obliczeń najniższego stężenia wywołującego efekt szkodliwy (LOEC) oraz największego stężenia niepowodującego dający się obserwować efekt szkodliwy (NOEC). Należy

oznaczyć wstępnie określoną dawkę śmiertelną oraz obliczyć LD<sub>50</sub> badanej substancji metodą Kärbera. Uzyskane obserwacje i wyniki doświadczenia przedstawić w tabeli 11.6.

Tabela 11.5. Skład pożywki Knopa (mg/cm<sup>3</sup>; pH=6,8).

1.	KNO <sub>3</sub>	0,5
2.	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,5
3.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
4.	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,15
5.	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01
6.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003
7.	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,002
8.	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,0003
9.	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0002
10.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0001

Tabela 11.6. Zależność między śmiertelnością glonów a wielkością dawki.

Dawka (g/kg)	Liczba glonów		Odsetek glonów padłych	Czas od podania do uzyskania efektu śmiertelnego
	całkowita	padłych		

Dawkę LD<sub>50</sub> metodą Kärbera oblicza się według następującego wzoru:

$$LD_{50} = D - \frac{z \cdot d}{n}$$

gdzie:

- D – dawka, przy której giną wszystkie glony,
- z – połowa sumy glonów padłych po 2 kolejnych dawkach,
- d – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek,
- n – całkowita liczba glonów.



# 12 PROGRAM RAMOWY DO ZAJĘĆ Z TOKSYKOLOGII ŚRODOWISKA

## 1. Forma zaliczenia przedmiotu przez studenta

Przedmiot kończy się egzaminem pisemnym i wpisem oceny z egzaminu do indeksu. Egzamin obejmuje wszystkie treści programu nauczania. Warunkiem dopuszczenia studenta do egzaminu jest zaliczenie praktycznych ćwiczeń laboratoryjnych oraz uzyskanie pozytywnej oceny z kolokwium.

## 2. Cel nauczania

Celem nauczania jest rozszerzenie wiedzy studentów z toksykologii o zagadnienia dotyczące oddziaływania substancji toksycznych na środowisko, a w konsekwencji na organizmy i populacje. Ukształtowanie nawyku postępowania zgodnego z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej w toku prowadzenia analizy toksykologicznej. Opanowanie przez studentów umiejętności wykonywania podstawowych analiz z toksykologii środowiska oraz interpretacji uzyskanych wyników.

## 3. Formy nauczania

Wykłady i ćwiczenia laboratoryjne.

## 4. Program nauczania

### Wykłady – propozycja zagadnień

Program wykładów zawiera rozszerzoną wiedzę z toksykologii ogólnej oraz zagadnienia z toksykologii środowiskowej. Poruszane zagadnienia obejmują:

- związki toksykologii środowiska z innymi dziedzinami wiedzy;
- podstawowe definicje toksykologiczne;
- chemiczne skażenia środowiska (powietrza, wody i gleby), klasy i drogi zanieczyszczeń, dopuszczalne normy stanu środowiska;

- trucizny pochodzenia roślinnego i zwierzęcego;
- chemiczne związki celowo dodawane do żywności (substancje dodatkowe): substancje przedłużające trwałość, zapobiegające zmianom chemicznym i fizycznym oraz nadające produktom określone cechy sensoryczne;
- szkodliwe związki chemiczne występujące w surowcach i produktach żywnościowych jako skutek zanieczyszczenia chemicznego powietrza, wód i gleby; chemizacji rolnictwa; stosowania w hodowli, lecznictwie i produkcji pasz: stymulatory wzrostu, antybiotyki, środki konserwujące;
- substancje nieorganiczne (wybrane metale, azotany (III) i (V), gazy) i organiczne (pestycydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, dioksyny, furany);
- losy substancji toksycznych (toksyczność, detoksykacja) w organizmie, w łańcuchu troficznym, ekosystemie;
- interakcje między substancjami toksycznymi;
- ewolucję odporności na zanieczyszczenia.

#### Ćwiczenia laboratoryjne – propozycja tematyki zajęć teoretyczno-praktycznych

- Regulamin pracowni toksykologicznej, zasady bezpieczeństwa i higieny pracy, oznakowanie i charakterystyka stosowanych substancji toksycznych, udzielanie pierwszej pomocy, inne sprawy organizacyjno-porządkowe.
- Metody wyodrębniania trucizn z materiału biologicznego.
- Reakcje charakterystyczne i oznaczanie ilościowe wybranych trucizn lotnych.
- Identyfikacja wybranych nielotnych trucizn organicznych.
- Badanie jakości wody (BZT, ChZT, OWO, zasadowość, kwasowość, twardość) pobranej z różnych źródeł (rzeka Biała, Supraśl, Bug; zbiornik wodny Siemianówka).
- Oznaczanie ilościowe ortofosforanów (V) i azotanów (III) i (V) w wodzie i ściekach komunalnych.
- Oznaczanie jonów chlorkowych w wodach powierzchniowych i ściekowych z użyciem elektrody jonoselektywnej.
- Oznaczanie metali ciężkich w wodzie i glebie metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej po zagęszczeniu metodą SPE.
- Reakcje charakterystyczne wybranych trucizn metalicznych.
- Wpływ metali ciężkich na wzrost i rozwój roślin.
- Wykrywanie alkaloidów i glikozydów z materiału roślinnego.
- Testy toksyczności na rozwiłtkach i glonach wybranych pestycydów.

# 13 INFORMACJE UZUPEŁNIAJĄCE

Tabela 13.1. Charakterystyka zagrożeń stosowanych substancji chemicznych.

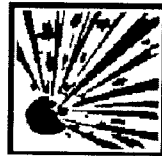



Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia	Piktogram
<b>1. Substancje i preparaty wybuchowe:</b> – zagrożenie wybuchem powstaje wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu; – skrajne zagrożenie wybuchem powstaje wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu.	E	
<b>2. Substancje i preparaty utleniające:</b> – kontakt z materiałami zapalnymi może spowodować pożar; – grozi wybuchem po zmieszaniu z materiałem zapalnym.	O	
<b>3. Substancje i preparaty skrajnie łatwo palne:</b> – substancje i preparaty ciekłe o temperaturze zapłonu < 0 °C oraz temperaturze wrzenia (lub w przypadku zakresu temperatur wrzenia, temperaturze początku wrzenia) ≤ 35 °C; – substancje i preparaty w postaci gazu, palne w kontakcie z powietrzem przy ciśnieniu atmosferycznym i w temperaturze otoczenia.	F+	
<b>4. Substancje i preparaty wysoce łatwo palne:</b> – substancje i preparaty w stanie stałym, które mogą łatwo zapalić się w wyniku krótkotrwałego kontaktu ze źródłem zapłonu oraz spalić się lub wypalić po usunięciu tego źródła; – substancje i preparaty ciekłe o temperaturze zapłonu < 21 °C, które nie są skrajnie łatwo palne; – substancje i preparaty, które w kontakcie z wodą lub wilgotnym powietrzem uwalniają skrajnie łatwo palne gazy, w ilościach niebezpiecznych, z szybkością wynoszącą co najmniej 1 dm <sup>3</sup> /kg/h; – substancje i preparaty, które mogą rozgrzać się i w rezultacie zapalić w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia, bez jakiegokolwiek dostarczenia energii.	F	

Tabela 13.1. Charakterystyka zagrożeń stosowanych substancji chemicznych – *ciąg dalszy*.



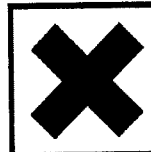

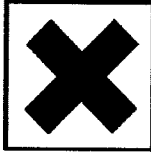

Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia	Piktogram
<b>5. Substancje i preparaty bardzo toksyczne:</b> – działają bardzo toksycznie po połyknięciu: • LD <sub>50</sub> (doustnie, szczury): < 25 mg/kg; – działają bardzo toksycznie w kontakcie ze skórą: • LD <sub>50</sub> (naskórnice, szczury lub królik): < 50 mg/kg; – działają bardzo toksycznie przez drogi oddechowe: • LC <sub>50</sub> (inhalacja, szczury): < 0,25 mg/dm <sup>3</sup> przez 4 godziny; – zagrażają powstaniem bardzo poważnych, nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia.	T+	
<b>6. Substancje i preparaty toksyczne:</b> – działają toksycznie po połyknięciu: • LD <sub>50</sub> (doustnie, szczury): 25-200 mg/kg; – działają toksycznie w kontakcie ze skórą: • LD <sub>50</sub> (naskórnice, szczury lub królik): 50-400 mg/kg; – działają toksycznie przez drogi oddechowe: • LC <sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 0,25-1 mg/dm <sup>3</sup> przez 4 godziny; – zagrażają powstaniem bardzo poważnych, nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia.	T	
<b>7. Substancje i preparaty szkodliwe:</b> – działają szkodliwie po połyknięciu: • LD <sub>50</sub> (doustnie, szczury): 200-2000 mg/kg; – działają szkodliwie w kontakcie ze skórą: • LD <sub>50</sub> (naskórnice, szczury lub królik): 400-2000 mg/kg; – działają szkodliwie przez drogi oddechowe: • LC <sub>50</sub> (inhalacja, szczury): 1-5 mg/dm <sup>3</sup> przez 4 godziny; – możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia; – stwarzają poważne zagrożenie zdrowia w następstwie długotrwałego narażenia; – mogą wywoływać uczulenia, w kontakcie z wodą lub kwasami mogą powodować uwalnianie gazów.	Xn	
<b>8. Substancje i preparaty żrące:</b> – powodują oparzenia w wyniku narażenia trwającego do 4 godzin lub do 3 minut (poważne oparzenia).	C	

Tabela 13.1. Charakterystyka zagrożeń stosowanych substancji chemicznych – *ciąg dalszy*.

Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia	Piktogram
<b>9. Substancje i preparaty drażniące:</b> – powodują zarumienienie skóry, zaczerwienienie oczu lub działają drażniąco na układ oddechowy.	Xi	
<b>10. Substancje i preparaty niebezpieczne dla środowiska:</b> – działają toksycznie na rośliny, zwierzęta, organizmy glebowe, pszczoły; – np. toksyczność ostra wynosi: • dla 96 godzin LC <sub>50</sub> (ryby): < 1 mg/dm <sup>3</sup> ; • dla 48 godzin EC <sub>50</sub> (rozwiłtki): < 1 mg/dm <sup>3</sup> ; • dla 72 godzin LC <sub>50</sub> (głony): < 1 mg/dm <sup>3</sup> .	N	
wyjaśnienia skrótów LC <sub>50</sub> , LD <sub>50</sub> , EC <sub>50</sub> znajdują się w rozdziale 3 – „Wybrane terminy toksykologiczne”		

## WZÓR

.....  
imię i nazwisko studenta

.....  
rok i kierunek studiów

## OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w dniu ..... zapoznałem (am) się z regulaminem porządkowym oraz z przepisami i zasadami bezpieczeństwa i higieny pracy w pracowni toksykologicznej.

## Podstawa prawna:

1. Ustawa z dnia 12 września 1990 r. o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 1990, nr 65, poz. 385);
2. Rozporządzenie Ministra Edukacji Narodowej z dnia 11 marca 1998 r. w sprawie przepisów bezpieczeństwa i higieny pracy w szkołach wyższych (Dz. U. z 1998, nr 37, poz. 209);
3. Rozporządzenie Ministra Pracy i Polityki Socjalnej z dnia 28 maja 1996 r. w sprawie szczegółowych zasad szkolenia w dziedzinie bezpieczeństwa i higieny pracy (Dz. U. z 1996, nr 62, poz. 285).

.....  
podpis studenta

## 14 PIŚMIENICTWO

- Alloway B. J., Ayres D. C., Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- Biziuk M. (red.), Pestycydy. Występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- Dojlido J. (red.), Fizyko-chemiczne badanie wody i ścieków. Wydawnictwo Arkady, Warszawa 1999.
- Dojlido J., Zerbe J., Instrumentalne metody badania wody i ścieków. Wydawnictwo Arkady, Warszawa 1997.
- Dutkiewicz T. (red.), Ćwiczenia z toksykologii. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Łodzi, 1969.
- Gadzała-Kopciuch R., Buszewski B. (red.), Fizykochemiczne metody analizy w chemii środowiskowej. Cz. I. Ćwiczenia laboratoryjne z analityki i kontroli w ochronie środowiska. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2003.
- Gadzała-Kopciuch R., Buszewski B. (red.), Fizykochemiczne metody analizy w chemii środowiskowej. Cz. II. Ćwiczenia laboratoryjne z ochrony wód i gleb. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2003.
- Jodynis-Liebert J., Młynarczyk W., Orłowski J., Zielińska-Psujka B., Seńczuk W., Ćwiczenia z toksykologii. Wydawnictwo Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 1995.
- Kołodziejczyk A., Naturalne związki organiczne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Krechniak J. (red.), Materiały do ćwiczeń z toksykologii. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Gdańsku, 1996.
- Laskowski R., Miguła P., Ekotoksykologia od komórki do ekosystemu. PWRiL, Warszawa 2004.

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (Dz. U. z 2002 r. nr 165, poz. 1359).

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 5 grudnia 2002 r. w sprawie wartości odniesienia dla niektórych substancji w powietrzu (Dz. U. z 2003 r. nr 1, poz. 12).

Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz. U. z 2004 r. nr 32, poz. 284).

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobu klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych (Dz. U. z 2003 r. nr 171, poz. 1666).

Seńczuk W. (red.), Toksykologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.

Siemiński M., Środowiskowe zagrożenia zdrowia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.

Ustawa z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz. U. z 2004 r. nr 11, poz. 94).

Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B., Podstawy ekotoksykologii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.

Zakrzewski S. F., Podstawy toksykologii środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.



286560