

Andrzej Bajguz Alicja Piotrowska-Niczyporuk

Elementy ekotoksykologii

Wybrane metody analityczne



BIAŁYSTOK 2015

Recenzent: dr hab. n. med. Maria Jurczuk

Projekt okładki: Andrzej Bajguz

Redakcja: Elżbieta Kozłowska-Świątkowska, Katarzyna Sakowska

Korekta: Zespół

Redakcja techniczna i skład: Katarzyna Sakowska

© Copyright by Uniwersytet w Białymstoku, Białystok 2015

ISBN 978-83-7431-443-5

Wydanie publikacji zostało sfinansowane ze środków Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku i Instytut Biologii Uniwersytetu w Białymstoku

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: Ouick-Druk s.c., Łódź

Spis treści

1. WPROWADZENIE	21
2. BEZPIECZEŃSTWO CHEMICZNE	25
3. WYBRANE TERMINY TOKSYKOLOGICZNE	59
4. IZOLACJA NIEZNANEJ TRUCIZNY Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	66
4.1. Próby wstępne w analizie toksykologicznej.....	68
4.2. Izolacja trucizn lotnych – destylacja z parą wodną.....	70
4.2.1. Destylacja z parą wodną z roztworu kwaśnego.....	71
4.2.1.1. Próba Schönbeina na cyjanki.....	73
4.2.2. Destylacja z parą wodną z roztworu alkalicznego.....	73
4.3. Izolacja trucizn lotnych – metoda mikrodyfuzji.....	74
4.4. Izolacja i oczyszczanie nielotnych trucizn organicznych.....	75
4.4.1. Ekstrakcja z materiału stałego o niewielkiej zawartości wody.....	78
4.4.2. Ekstrakcja z materiału płynnego.....	79
4.4.3. Ekstrakcja z materiałów bogatych w tłuszcze.....	80
4.4.4. Podział ekstraktów nielotnych trucizn organicznych.....	80
4.5. Metody mineralizacji materiału biologicznego.....	84
4.5.1. Mineralizacja metodą suchą.....	84
4.5.2. Mineralizacja metodą mokrą.....	85
4.5.3. Mineralizacja metodą ciśnieniową.....	86
4.5.4. Mineralizacja w atmosferze wzbudzonego tlenu.....	87
4.5.5. Mineralizacja przez naświetlanie promieniami UV.....	88
4.5.6. Mineralizacja mikrofalowa.....	88
4.6. Dializa.....	90

5. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN LOTNYCH	91
5.1. Aceton	91
5.1.1. Właściwości i toksyczność.....	91
5.1.2. Reakcje charakterystyczne.....	92
5.1.2.1. Reakcja jodoformowa Liebena.....	92
5.1.2.2. Reakcja Legala.....	92
5.2. Aldehyd mrówkowy	93
5.2.1. Właściwości i toksyczność.....	93
5.2.2. Reakcje charakterystyczne.....	93
5.2.2.1. Reakcja z kwasem chromotropowym.....	93
5.2.2.2. Reakcja z tiokolem.....	93
5.2.2.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera.....	94
5.2.2.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa.....	94
5.2.2.5. Reakcja z azotanem (V) srebra i wodorotlenkiem sodu.....	94
5.2.2.6. Reakcja Shryvera.....	95
5.2.2.7. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i morfiną.....	95
5.2.3. Analiza ilościowa.....	95
5.2.3.1. Oznaczenie ilościowe zawartości aldehydu mrówkowego w badanej próbce.....	95
5.3. Aldehyd trichlorooctowy	98
5.3.1. Właściwości i toksyczność.....	98
5.3.2. Reakcje charakterystyczne.....	98
5.3.2.1. Reakcja izonitrylowa.....	98
5.3.2.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu.....	98
5.3.2.3. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II).....	99
5.3.2.4. Reakcja z odczynnikiem Nesslera.....	99
5.4. Alkohol etylowy	100
5.4.1. Właściwości i toksyczność.....	100
5.4.2. Reakcje charakterystyczne.....	100
5.4.2.1. Reakcja jodoformowa Liebena.....	100
5.4.2.2. Reakcja estryfikacji.....	101
5.4.2.3. Reakcja z dichromianem (VI) potasu.....	101
5.4.2.4. Reakcja z chlorkiem benzoilu.....	102

5.4.3. Analiza ilościowa	102
5.4.3.1. Oznaczanie etanolu we krwi metodą Widmarka	102
5.5. Alkohol metylowy	104
5.5.1. Właściwości i toksyczność	104
5.5.2. Reakcje charakterystyczne	104
5.5.2.1. Reakcja estryfikacji	104
5.5.2.2. Reakcja utleniania metanolu do aldehydu mrówkowego	104
5.5.2.3. Reakcja Denigesa	105
5.6. Anilina	106
5.6.1. Właściwości i toksyczność	106
5.6.2. Reakcje charakterystyczne	106
5.6.2.1. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z solą R	106
5.6.2.2. Reakcja izonitrylowa	107
5.6.2.3. Reakcja bromowania	107
5.6.2.4. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i dichromia- nem (VI) potasu	107
5.6.2.5. Reakcja z aldehydem mrówkowym	107
5.6.2.6. Próba indofenolowa	108
5.6.3. Analiza ilościowa	108
5.6.3.1. Oznaczanie zawartości p-aminofenolu (metabolit aniliny) w moczu	108
5.7. Benzen	111
5.7.1. Właściwości i toksyczność	111
5.7.2. Reakcje charakterystyczne	112
5.7.2.1. Reakcja Friedela–Craftsa	112
5.7.2.2. Reakcja nitrowania	112
5.7.2.3. Reakcja z odczynnikiem Marquisa	112
5.7.3. Analiza ilościowa	113
5.7.3.1. Oznaczanie zawartości fenolu (metabolit benzenu) w moczu	113
5.8. Chloroform	114
5.8.1. Właściwości i toksyczność	114
5.8.2. Reakcje charakterystyczne	115
5.8.2.1. Reakcja izonitrylowa	115

5.8.2.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu.....	115
5.8.2.3. Reakcja Fujiwary.....	115
5.8.2.4. Reakcja z α -naftolem.....	116
5.8.2.5. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i siarczanem (VI) miedzi (II).....	116
5.9. Cyjanowodór.....	117
5.9.1. Właściwości i toksyczność.....	117
5.9.2. Reakcje charakterystyczne.....	117
5.9.2.1. Reakcja z siarczanem (VI) żelaza (II) i chlorkiem żelaza (III).....	117
5.9.2.2. Reakcja z polisarczkiem amonu.....	118
5.9.2.3. Reakcja z kwasem pikrynowym.....	118
5.9.2.4. Reakcja z azotanem (V) srebra.....	118
5.10. Fenol.....	119
5.10.1. Właściwości i toksyczność.....	119
5.10.2. Reakcje charakterystyczne.....	119
5.10.2.1. Reakcja z 4-aminoatrypiną.....	120
5.10.2.2. Reakcja z wodą bromową.....	120
5.10.2.3. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	121
5.10.2.4. Reakcja z 5-nitrozo-8-hydroksychinoliną.....	121
5.10.2.5. Reakcja z odczynnikiem Millona.....	121
5.10.2.6. Próba Melzera.....	122
5.10.2.7. Reakcja z dwuazowaną <i>p</i> -nitroaniliną.....	122
5.10.2.8. Reakcja z metawanadanem (IV) amonu.....	122
5.11. Ksylen.....	123
5.11.1. Właściwości i toksyczność.....	123
5.11.2. Analiza ilościowa.....	123
5.11.2.1. Oznaczanie zawartości kwasu <i>m</i> -metylohipurowego (metabolit ksylenu) w moczu.....	123
5.12. Kwas mrówkowy.....	126
5.12.1. Właściwości i toksyczność.....	126
5.12.2. Reakcje charakterystyczne.....	126
5.12.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	126

5.12.2.2. Reakcja z chlorkiem rtęci (II)	126
5.12.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra	126
5.13. Kwas octowy	127
5.13.1. Właściwości i toksyczność	127
5.13.2. Reakcje charakterystyczne	127
5.13.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)	127
5.13.2.2. Reakcja z tritlenkiem arsenu (III)	127
5.13.2.3. Reakcja estryfikacji	128
5.14. Nitrobenzen	128
5.14.1. Właściwości i toksyczność	128
5.14.2. Reakcje charakterystyczne	129
5.14.2.1. Redukcja do aniliny	129
5.14.2.2. Reakcja z rezorcyną	129
5.15. Pirydyna	130
5.15.1. Właściwości i toksyczność	130
5.15.2. Reakcje charakterystyczne	130
5.15.2.1. Reakcja z aniliną i bromocyjanem	130
5.15.2.2. Reakcja z benzydyną	130
5.15.2.3. Reakcja z siarczanem (VI) miedzi (II) i tiocyjanianem potasu	131
5.15.2.4. Reakcja z 2,4-dinitrochlorobenzenem	131
5.16. Toluen	131
5.16.1. Właściwości i toksyczność	131
5.16.2. Analiza ilościowa	132
5.16.2.1. Oznaczenie zawartości kwasu hipurowego (metabolit toluenu) w moczu	132
5.17. Trichloroetylen	134
5.17.1. Właściwości i toksyczność	134
5.17.2. Analiza ilościowa	134
5.17.2.1. Oznaczanie zawartości kwasu trichlorooctowego ...	135
5.17.2.2. Oznaczanie zawartości trichloroetanolu	135
5.17.2.3. Oznaczanie całkowitej zawartości związków trichlorowych	136

6. TOKSYKOLOGIA LEKÓW	139
6.1. Kwas salicylowy	143
6.1.1. Właściwości i toksyczność.....	143
6.1.2. Reakcje charakterystyczne.....	144
6.1.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	144
6.1.2.2. Reakcja z wodą bromową.....	144
6.1.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym.....	144
6.1.2.4. Reakcja z kwasem azotowym (V).....	144
6.1.2.5. Reakcja Salfa.....	145
6.1.2.6. Wykrywanie salicylanów w moczu.....	145
6.2. Kwas acetylosalicylowy	146
6.2.1. Właściwości i toksyczność.....	146
6.2.2. Reakcje charakterystyczne.....	146
6.2.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu i kwasem siarko- wym (VI).....	146
6.2.2.2. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	147
6.2.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym.....	147
6.2.2.4. Reakcja z chlorkiem żelaza (III), octanem ołowiu (II) i siarczanem (VI) miedzi (II).....	147
6.3. Fenacetyna	147
6.3.1. Właściwości i toksyczność.....	147
6.3.2. Reakcje charakterystyczne.....	148
6.3.2.1. Reakcja z kwasem chromowym (VI).....	148
6.3.2.2. Reakcja z kwasem azotowym (V).....	148
6.3.2.3. Reakcja estryfikacji.....	148
6.3.2.4. Reakcja indofenolowa.....	148
6.3.2.5. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z β -naftolem.....	149
6.3.2.6. Reakcja z wodorotlenkiem potasu.....	149
6.4. Fenazon	149
6.4.1. Właściwości i toksyczność.....	149
6.4.2. Reakcje charakterystyczne.....	150
6.4.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	150
6.4.2.2. Reakcja z kwasem azotowym (V).....	150
6.4.2.3. Reakcja z tanią.....	150

6.4.2.4. Reakcja z odczynnikiem Millona.....	150
6.4.2.5. Reakcja z kwasem pikrynowym.....	151
6.5. Aminofenazon.....	151
6.5.1. Właściwości i toksyczność.....	151
6.5.2. Reakcje charakterystyczne.....	151
6.5.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III).....	151
6.5.2.2. Reakcja z azotanem (V) srebra.....	152
6.5.2.3. Odróżnienie fenazonu od aminofenazonu.....	152
6.6. Barbiturany.....	152
6.6.1. Właściwości i toksyczność.....	152
6.6.2. Reakcje charakterystyczne.....	153
6.6.2.1. Reakcja hydrolizy do amoniaku.....	154
6.6.2.2. Reakcja tiocyjanianowa.....	154
6.6.2.3. Reakcja Zwickera.....	154
6.6.2.4. Reakcja z odczynnikiem Millona.....	154
6.6.2.5. Reakcja z chlorkiem sodu.....	154
6.7. Meprobamat.....	155
6.7.1. Właściwości i toksyczność.....	155
6.7.2. Reakcje charakterystyczne.....	155
6.7.2.1. Reakcja z <i>p</i> -dimetyloaminobenzaldehydem.....	155
6.8. Kofeina.....	156
6.8.1. Właściwości i toksyczność.....	156
6.8.2. Reakcje charakterystyczne.....	157
6.8.2.1. Próba mureksydowa.....	157
6.8.2.2. Reakcja z taniną.....	157
6.8.2.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera.....	157
6.9. Chloropromazyna.....	158
6.9.1. Właściwości i toksyczność.....	158
6.9.2. Reakcje charakterystyczne.....	158
6.9.2.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI).....	158
6.9.2.2. Reakcja z odczynnikiem Marquisa.....	159
6.9.2.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego.....	159
6.9.2.4. Reakcja z kwasem azotowym (V).....	159
6.9.2.5. Reakcja z wodą bromową.....	159

6.10. Weratryna	159
6.10.1. Właściwości i toksyczność.....	159
6.10.2. Reakcje charakterystyczne.....	160
6.10.2.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI).....	160
6.10.2.2. Reakcja z odczynnikiem Meckiego.....	160
6.10.2.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego.....	160
6.10.2.4. Reakcja z kwasem solnym.....	160
6.10.2.5. Reakcja z <i>p</i> -dimetyloaminobenzaldehydem.....	160
6.11. Wykrywanie leków metodą chromatografii cienkowarstwowej	161
6.11.1. Chromatografia cienkowarstwowa – podstawy teoretyczne..	161
6.11.2. Wykrywanie środków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych.....	163
6.11.3. Wykrywanie barbituranów.....	164
7. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIEN METALICZNYCH	165
7.1. Antymon	166
7.1.1. Właściwości i toksyczność.....	166
7.1.2. Reakcje charakterystyczne.....	167
7.1.2.1. Reakcja z siarkowodorem.....	167
7.1.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu.....	167
7.1.2.3. Reakcja z tiosiarczanem.....	167
7.2. Arsen	168
7.2.1. Właściwości i toksyczność.....	168
7.2.2. Reakcje charakterystyczne.....	169
7.2.2.1. Reakcja z siarkowodorem.....	169
7.2.2.2. Reakcja z jodem.....	169
7.2.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra.....	169
7.2.2.4. Reakcja z nadmanganianem (VII) potasu.....	169
7.2.2.5. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu.....	170
7.2.2.6. Reakcja Bettendorffa.....	170
7.2.3. Analiza ilościowa.....	170
7.2.3.1. Oznaczanie zawartości arsenu metodą jodometryczną.....	170
7.3. Bar	172
7.3.1. Właściwości i toksyczność.....	172
7.3.2. Reakcje charakterystyczne.....	172

7.3.2.1. Reakcja z rozpuszczalnymi węglanami.....	172
7.3.2.2. Reakcje z chromianem (VI) lub dichromianem (VI) potasu	172
7.3.2.3. Reakcja z rozpuszczalnymi siarczanami	173
7.4. Bizmut	173
7.4.1. Właściwości i toksyczność	173
7.4.2. Reakcje charakterystyczne	174
7.4.2.1. Reakcja wodorotlenkiem sodu.....	174
7.4.2.2. Reakcja z siarkowodorem.....	174
7.4.2.3. Reakcja z ditizonem	174
7.5. Chrom	175
7.5.1. Właściwości i toksyczność	175
7.5.2. Reakcje charakterystyczne	176
7.5.2.1. Reakcja z siarczkiem sodu	176
7.5.2.2. Reakcja z amoniakiem	176
7.5.2.3. Reakcja z nadtlenkiem wodoru	176
7.5.2.4. Reakcja z difenylokarbazydem (I).....	177
7.5.3. Analiza ilościowa	178
7.5.3.1. Spektrofotometryczne oznaczanie zawartości związków chromu w ściekach.....	178
7.6. Cyna	179
7.6.1. Właściwości i toksyczność	179
7.6.2. Reakcje charakterystyczne	180
7.6.2.1. Reakcja z siarkowodorem.....	180
7.6.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu	180
7.6.2.3. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu	180
7.7. Cynk	181
7.7.1. Właściwości i toksyczność	181
7.7.2. Reakcje charakterystyczne	182
7.7.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu.....	182
7.7.2.2. Reakcja z amoniakiem	182
7.7.2.3. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu.....	182
7.7.3. Analiza ilościowa	182
7.7.3.1. Oznaczanie zawartości cynku w roztworach metodą ditizonową.....	182

7.8. Kadm	184
7.8.1. Właściwości i toksyczność	184
7.8.2. Reakcje charakterystyczne	185
7.8.2.1. Reakcja z amoniakiem.....	185
7.8.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu	186
7.8.2.3. Reakcja z siarczkiem sodu.....	186
7.8.2.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu.....	186
7.9. Miedź	187
7.9.1. Właściwości i toksyczność	187
7.9.2. Reakcje charakterystyczne	188
7.9.2.1. Reakcja z siarkowodorem.....	188
7.9.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu	188
7.9.2.3. Reakcja z amoniakiem	188
7.9.2.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu.....	188
7.9.2.5. Reakcja z ditizonem	189
7.9.3. Analiza ilościowa	189
7.9.3.1. Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biolo- gicznym	189
7.10. Ołów	191
7.10.1. Właściwości i toksyczność	191
7.10.2. Reakcje charakterystyczne	192
7.10.2.1. Reakcja z kwasem solnym	192
7.10.2.2. Reakcja z jodkiem potasu.....	192
7.10.2.3. Reakcja z chromianem (VI) potasu	192
7.10.2.4. Reakcja z siarkowodorem	192
7.10.2.5. Reakcja z siarczanem (IV) sodu	193
7.10.2.6. Reakcja z ditizonem	193
7.10.2.7. Reakcja z wodorotlenkiem sodu	193
7.10.2.8. Wykrywanie obecności ołowiu u roślin.....	193
7.10.3. Analiza ilościowa	194
7.10.3.1. Oznaczanie zawartości ołowiu w roztworach metodą ditizonową.....	194
7.11. Rtęć	196
7.11.1. Właściwości i toksyczność.....	196
7.11.2. Reakcje charakterystyczne.....	197

7.11.2.1. Reakcje z kwasem solnym i rozpuszczalnymi chlorkami.....	197
7.11.2.2. Reakcja z jodkiem potasu.....	197
7.11.2.3. Reakcja z siarkowodorem.....	197
7.11.2.4. Reakcja z chlorkiem cyny (II).....	198
7.11.2.5. Reakcja z nitrobenzenem.....	198
7.11.2.6. Reakcja z difenylokarbazydem (I).....	198
7.11.2.7. Reakcja z difenylokarbazonem (II).....	199
7.11.2.8. Reakcja z ditizonem.....	199
7.12. Żelazo.....	200
7.12.1. Właściwości i toksyczność.....	200
7.12.2. Reakcje charakterystyczne.....	200
7.12.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu.....	200
7.12.2.2. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu.....	201
7.12.2.3. Reakcja z izotiocyanianem potasu.....	201
7.12.3. Analiza ilościowa.....	201
7.12.3.1. Oznaczanie zawartości żelaza ogólnego i rozpuszczonego metodą wersenianową.....	201
7.13. Identyfikacja trucizn metalicznych za pomocą Na-DDTK.....	202
7.14. Wykrywanie trucizn metalicznych metodą chromatografii cienkowarstwowej.....	205
7.15. Oddziaływanie metali na wzrost i parametry biochemiczne roślin.....	209
7.15.1. Założenie hodowli roślin traktowanych metalami ciężkimi.....	210
7.15.2. Oddziaływanie metali na kiełkowanie nasion, wzrost roślin oraz zmiany morfologiczne.....	210
7.15.3. Wpływ metali ciężkich na zawartość barwników fotosyntetycznych w siewkach rzeżuchy.....	211
7.15.4. Wpływ metali ciężkich na zawartość białek w siewkach rzeżuchy.....	212
7.15.5. Wpływ metali ciężkich na peroksydację lipidów w siewkach rzeżuchy.....	214
7.15.6. Oznaczenie zawartości metali ciężkich w siewkach rzeżuchy.....	216

7.16. Oznaczanie zawartości wybranych metali w materiale biologicznym metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej	216
8. WYBRANE SUBSTANCJE TOKSYCZNE POCHODZENIA ROŚLINNEGO	219
8.1. Alkaloidy	219
8.1.1. Wykrywanie koniiny – alkaloidu cykuty	220
8.1.2. Wykrywanie nikotyny – alkaloidu tytoniu	220
8.1.3. Wykrywanie strychniny i brucyny – alkaloidów kulczyby	221
8.1.4. Wykrywanie alkaloidów glistnika jaskółczego ziela	222
8.1.5. Wykrywanie berberyny	224
8.1.6. Wykrywanie morfiny	224
8.1.7. Wykrywanie kolchicyny	225
8.1.8. Wykrywanie kofeiny	226
8.2. Glikozydy	227
8.2.1. Wykrywanie glikozydów kardenolidowych	227
8.2.2. Wykrywanie glikozydów flawonoidowych	228
8.2.3. Wykrywanie glikozydów fenolowych	229
8.2.4. Wykrywanie glikozydów antrachinonowych	229
8.2.5. Wykrywanie glikozydów kumarynowych	229
8.2.6. Wykrywanie glikozydów cyjanogennych	230
8.2.7. Wykrywanie saponin	231
8.3. Olejki eteryczne	232
8.3.1. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja z Sudanem III	233
8.3.2. Wykrywanie olejków eterycznych – reakcja Stahla	233
8.4. Garbniki	234
8.4.1. Wykrywanie garbników w materiale roślinnym	236
8.4.2. Wpływ garbników na denaturację białek	236
8.4.3. Właściwości redukujące garbników	236
9. PESTYCYDY	237
9.1. Podział i bezpieczeństwo stosowania pestycydów	238
9.2. Charakterystyka wybranych grup pestycydów	243
9.2.1. Insektycydy fosforoorganiczne	243
9.2.2. Insektycydy karbaminianowe	245
9.2.3. Insektycydy polichlorowe	246

9.2.4. Insektycydy piretroidowe.....	247
9.2.5. Fungicydy.....	248
9.2.6. Herbicydy.....	249
9.2.7. Rodentycydy.....	251
9.3. Identyfikacja wybranych grup pestycydów.....	252
9.3.1. Wykrywanie insektycydów fosforoorganicznych.....	252
9.3.2. Wykrywanie insektycydów karbaminianowych.....	253
9.3.3. Wykrywanie insektycydów polichlorowych.....	255
9.3.4. Wykrywanie fungicydów.....	257
9.3.5. Wykrywanie herbicydów.....	258
9.3.6. Test jakościowy wykrywania pirydyli w moczu.....	259
10. ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA.....	260
10.1. Źródła zanieczyszczeń środowiska.....	260
10.2. Wskaźniki jakości wody.....	263
10.2.1. Oznaczanie zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie.....	264
10.2.2. Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen.....	267
10.2.3. Chemiczne zapotrzebowanie na tlen.....	269
10.2.4. Oznaczenie zawartości ogólnej węgla organicznego w wodzie.....	273
10.2.5. Oznaczenie zawartości ditlenku węgla w wodzie.....	276
10.2.6. Oznaczanie twardości wody oraz zawartości wapnia i magnezu w wodzie.....	277
10.2.7. Oznaczanie zasadowości ogólnej wody.....	283
10.2.8. Oznaczanie kwasowości ogólnej wody.....	284
10.2.9. Oznaczanie zawartości chlorków w wodzie.....	285
10.2.10. Oznaczanie zawartości tiosiarczanów w wodzie.....	287
10.2.11. Oznaczanie zawartości ortofosforanów (V) w wodzie.....	288
10.2.12. Oznaczanie zawartości azotanów (V) i azotanów (III) w wodzie.....	291
10.2.13. Oznaczanie zawartości detergentów w wodzie.....	294
10.2.13.1. Oznaczanie zawartości detergentów aniono- aktywnych w wodzie.....	296
10.2.13.2. Oznaczanie zawartości detergentów kationo- aktywnych w wodzie.....	298
10.2.14. Oznaczanie zawartości wybranych metali w wodzie.....	300

10.3. Badanie chemicznych zanieczyszczeń gleby	301
10.3.1. Oznaczanie zasolenia w glebie	303
10.3.2. Oznaczanie zawartości chlorków w glebie	305
10.3.3. Oznaczanie kwasowości gleby	306
10.3.4. Oznaczanie zawartości wapnia i magnezu metodą wersenianową w glebie	308
10.3.5. Oznaczanie zawartości wybranych metali metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w glebie	311
10.4. Badanie chemicznych zanieczyszczeń powietrza	313
10.4.1. Oznaczanie zawartości ditlenku siarki w powietrzu	316
10.4.2. Oznaczanie zawartości tlenków azotu w powietrzu	319
10.4.3. Oznaczanie zanieczyszczeń pyłowych i zawartości wybranych metali w pyle	322
11. TESTY TOKSYKOLOGICZNE	325
11.1. Testy toksyczności na kręgowcach	325
11.1.1. Test 420: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmo- wą) – procedura stałej dawki	328
11.1.2. Test 423: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmo- wą) – procedura klas ostrej toksyczności	329
11.1.3. Test 425: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmo- wą) – procedura większej – mniejszej dawki	331
11.1.4. Oznaczenie LD ₅₀ metodą Thompsona	336
11.1.5. Oznaczenie LD ₅₀ metodą Kärbera	336
11.2. Testy toksyczności na organizmach wodnych	338
11.2.1. Test toksyczności na rozwielitkach	339
11.2.2. Test toksyczności na glonach	340
11.2.2.1. Test toksyczności na <i>Chlorella vulgaris</i>	341
11.2.2.2. Oznaczanie stopnia skażenia wody metalami ciężkimi na podstawie zmian gęstości optycznej glonów <i>Chlorella vulgaris</i>	343
12. TOKSYKOLOGIA ŻYWNOŚCI	345
12.1. Naturalne substancje żywności o potencjalnym działaniu toksycznym	354
12.1.1. Szczawiany	354

12.1.1.1. Oznaczanie zawartości szczawianów rozpuszczalnych w wybranych produktach spożywczych.....	356
12.1.2. Goitrogeny.....	358
12.1.2.1. Oznaczanie zawartości izotiocyanianów w wybranych roślinach	360
12.2. Substancje działające szkodliwie po celowym dodaniu do żywności	362
12.2.1. Substancje konserwujące.....	362
12.2.1.1. Właściwości i toksyczność	362
12.2.1.2. Reakcje charakterystyczne	365
12.2.1.2.1. Wykrywanie kwasu benzoowego oraz salicylowego w produktach owocowo-warzywnych	366
12.2.1.2.2. Wykrywanie obecności związków siarkowych w produktach owocowo-warzywnych	366
12.2.1.2.3. Oznaczanie zawartości kwasu benzoowego w sokach owocowych.....	366
12.2.2. Przeciwtleniacze w żywności	368
12.2.2.1. Właściwości i toksyczność.....	368
12.2.2.2. Reakcje charakterystyczne.....	369
12.2.2.2.1. Wstępne wykrywanie obecności środka przeciwutleniającego w tłuszczach.....	369
12.2.2.2.2. Wykrywanie obecności galusanów w tłuszczach.....	369
12.2.2.2.3. Wykrywanie obecności hydrochinonu w tłuszczach.....	370
12.3. Substancje toksyczne zanieczyszczające żywność.....	370
12.3.1. Nawozy sztuczne.....	370
12.3.2. Pestycydy.....	371
12.3.2.1. Zadania.....	372
12.3.3. Pierwiastki śladowe.....	372
12.3.4. Mikotoksyny.....	373
12.3.5. Nitrozaminy.....	375
12.3.6. Leki.....	376
12.3.7. Bezpieczeństwo żywności.....	376
13. PIŚMIENNICTWO.....	379

1

WPROWADZENIE

Rozwój różnorodnych gałęzi przemysłu na świecie w XIX wieku, a następnie jego rozkwit w drugiej połowie wieku XX spowodował zmiany w środowisku naturalnym przez wprowadzanie mniej lub bardziej toksycznych substancji. Wiele tych związków, często ksenobiotycznych, czyli obcych składników dla organizmów (roślin, zwierząt i człowieka) podlega wchłanianiu, pobieraniu oraz akumulacji w tkankach. Stanowią one często zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Same rośliny zdolne są do wytwarzania różnorodnych związków chemicznych, określanych jako wtórne metabolity. Niektóre z nich to groźne trucizny, jednak człowiek poprzez kontakt z tymi roślinami nauczył się je rozpoznawać, unikać albo stosować w celach praktycznych, np. w leczeniu wielu chorób. Bardziej groźne są ksenobiotyki, związki powstałe na drodze syntezy chemicznej, których liczbę trudno jest precyzyjnie oszacować. Wiadomo jednak, które z nich są najgroźniejsze dla życia i zdrowia człowieka oraz innych organizmów żywych. Opracowano wiele metod pozwalających na wykrywanie obecności tych substancji w środowisku. Powstała również odrębna gałąź nauki, **toksykologia środowiska**, która zajmuje się określaniem skutków działania substancji toksycznych zatrauwających środowisko na człowieka i inne organizmy. Szczególnie ważnym jest określenie źródła zatrucia środowiska, transport trucizn w ekosystemie, efekty oraz oddziaływanie tych substancji wewnątrz ekosystemów oraz ich wpływ na dynamikę populacyjną wewnątrz tych systemów. Zajmuje się tym wydzielona dziedzina toksykologii środowiska określana jako **ekotoksykologia**.

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. W VIII wieku n.e. alchemik arabski Jabir Ibn Haiyan, zwany jako Geber (720–813) stwierdził dość rewolucyjnie jak na owe czasy, że „... trucizny rozwijają swoje działanie przez ilość, a nie tylko przez swą naturę...”. Aktualne pozostaje także stwierdzenie Paracelsusa (właściwie Phillippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim; 1493–1541) „Wszystko jest trucizną i nic nią nie jest. Tylko dawka decyduje, czy coś jest (lub nie) trucizną”. Bardzo toksyczna substancja powoduje skutki po podaniu małych ilości (dawek), natomiast substancja mało toksyczna oddziałuje szkodliwie dopiero w odpowiednio dużej ilości. Oznacza to, że obecność w organizmie substancji potencjalnie trującej niekoniecznie musi prowadzić do zatrucia. W organizmie niemal każdego człowieka można stwierdzić obecność, np. pewnej ilości ołowiu czy pestycydów, mimo to jednak substancje te nie wywołują objawów zatrucia, dopóki ich ilość nie przekracza stężenia toksycznego. Substancje stają się truciznami dopiero w stężeniu toksycznym. 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. W przypadku wielu trucizn niskie stężenie przy długim czasie ekspozycji może być równie toksyczne jak ich wysokie stężenie w krótkim okresie. Niezmiernie ważne 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.

Podręcznik *Elementy ekotoksykologii. Wybrane metody analityczne* jest adresowany do studentów biologii, chemii i ochrony środowiska. Jego podstawą są opublikowane w 2005 roku przez Wydawnictwo Uniwersytetu w Białymstoku *Ćwiczenia z toksykologii środowiska*. Wy-

danie poprzednie zostało zmodyfikowane oraz uzupełnione o nowe informacje i analizy toksykologiczne. Podręcznik zawiera podstawowe wiadomości z analizy toksykologicznej, sposobu wyodrębniania, identyfikacji oraz charakterystyki trucizn. Niektóre ćwiczenia dotyczą oznaczeń ilościowych substancji toksycznych. W książce poruszane są również problemy związane z analizą wybranych zanieczyszczeń środowiska. Nowością jest rozdział poświęcony toksykologii żywności oraz bezpieczeństwu chemicznemu.

Autorzy składają serdeczne podziękowania Pani Recenzent dr hab. n. med. Marii Jurczuk z Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za wszelkie sugestie i uwagi, które przyczyniły się do podniesienia wartości niniejszego opracowania.

Za ewentualne uproszczenia czy przeoczenia Autorzy przepraszają Czytelników, licząc na ich wyrozumiałość.

Szczególne podziękowania za wsparcie finansowe w wydaniu książki Autorzy kierują do dr hab. Iwony Ciereszko, prof. UwB – dziekan Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku oraz dr. hab. Adama Tylickiego – dyrektora Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku.

2

BEZPIECZEŃSTWO CHEMICZNE

W trakcie pracy z różnymi substancjami chemicznymi ważne jest zachowanie tzw. **bezpieczeństwa chemicznego**, czyli stosowania substancji chemicznych, które eliminuje lub przynajmniej w dużym stopniu ogranicza ich szkodliwe działanie na człowieka, zarówno w pracy, jak i poza pracą, a także szkodliwe oddziaływanie na środowisko, do poziomu, który można zaakceptować. Podstawowym warunkiem podjęcia działań w dziedzinie bezpieczeństwa chemicznego jest wiedza o zagrożeniach, według zasady: „lepiej zapobiegać, niż naprawiać” oraz posiadanie informacji o zagrożeniach, którą należy uzyskać przed rozpoczęciem stosowania substancji/preparatów chemicznych. Charakterystyka szkodliwego działania substancji lub preparatu chemicznego, powinna być przekazana studentom przez prowadzącego zajęcia laboratoryjne, w przypadku substancji i preparatów niebezpiecznych w postaci odpowiedniego oznakowania na etykiecie oraz karty charakterystyki. Powinna zatem służyć ich odbiorcom do podjęcia odpowiednich działań zapobiegawczych, a w szczególności do unikania zagrożeń.

Przepisy ustawy o substancjach i preparatach chemicznych (Ustawa z dnia 25 lutego 2011 r. o substancjach chemicznych i ich mieszaninach; Dz. Ustaw nr 63, Poz. 322) adaptują w Polsce odpowiednie przepisy Unii Europejskiej. Niniejsza ustawa dokonuje w zakresie swojej regulacji wdrożenia następujących dyrektyw, z których dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE tracą moc z dniem 1 czerwca 2015 r.:

1. Dyrektywa 67/548/EWG z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych od-

- noszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych (Dz. Urz. WE L 196 z 16.08.1967, str. 1, z późn. zm.; Dz. Urz. UE polskie wydanie specjalne, rozdz. 13, t. 1, str. 27);
2. Dyrektywa 92/58/EWG z dnia 24 czerwca 1992 r. w sprawie minimalnych wymagań dotyczących znaków bezpieczeństwa i/lub zdrowia w miejscu pracy (dziewiąta dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy 89/391/EWG) (Dz. Urz. WE L 245 z 26.08.1992, str. 23, z późn. zm.; Dz. Urz. UE polskie wydanie specjalne, rozdz. 5, t. 2, str. 89);
 3. Dyrektywa 1999/45/WE z dnia 31 maja 1999 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania preparatów niebezpiecznych (Dz. Urz. WE L 200 z 30.07.1999, str. 1, z późn. zm.; Dz. Urz. UE polskie wydanie specjalne, rozdz. 13, t. 24, str. 109);
 4. Dyrektywa 2004/9/WE z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie kontroli i weryfikacji dobrej praktyki laboratoryjnej (DPL) (Dz. Urz. UE L 50 z 20.02.2004, str. 28, z późn. zm.; Dz. Urz. UE polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 8, str. 65);
 5. Dyrektywa 2004/10/WE z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie harmonizacji przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do stosowania zasad dobrej praktyki laboratoryjnej i weryfikacji jej stosowania na potrzeby badań substancji chemicznych (Dz. Urz. UE L 50 z 20.02.2004, str. 44, z późn. zm.; Dz. Urz. UE polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. 8, str. 82);
 6. Dyrektywa 2008/112/WE z dnia 16 grudnia 2008 r. zmieniającej dyrektywy Rady 76/768/EWG, 88/378/EWG, 1999/13/WE oraz dyrektywy 2000/53/WE, 2002/96/WE i 2004/42/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w celu dostosowania ich do rozporządzenia (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin (Dz. Urz. UE L 345 z 23.12.2008, str. 68).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pako-

wania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG (dyrektywa DSD) i 1999/45/WE (dyrektywa DPD) oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 (rozporządzenie REACH) przedstawia globalnie zharmonizowany system klasyfikacji i oznakowania chemikaliów, zwany „GHS”, przy czym od 1 grudnia 2010 r. do 1 czerwca 2015 r. substancje są klasyfikowane zarówno z dyrektywą 67/548/EWG, jak i rozporządzeniem nr 1272/2008 (rozporządzenie CLP). Rozporządzenie to weszło w życie w Unii Europejskiej 20 stycznia 2009 r. Rozporządzenie CLP wprowadza pewne nowe aspekty dotyczące oznakowania i pakowania substancji i mieszanin. Etykieta CLP zawiera zasadniczo elementy etykiety przejęte z Globalnego Zharmonizowanego Systemu Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów opracowanego przez Organizację Narodów Zjednoczonych (GHS ONZ), tj. nowe piktogramy, hasło ostrzegawcze oraz zwroty określające zagrożenie i środki ostrożności, w sposób odzwierciedlający przypisaną klasyfikację substancji lub mieszaniny.

Substancjami niebezpiecznymi i mieszaninami niebezpiecznymi są substancje i mieszaniny zaklasyfikowane co najmniej do jednej z poniższych kategorii. Artykuł 2 Dyrektywy 67/548/EWG definiuje grupy substancji i preparatów uznane za niebezpieczne. Niektóre z nich są powiązane z piktogramami ostrzegawczymi i/lub ich kodami. Grupy substancji na podstawie załącznika I Dyrektywy 67/548/EWG zostały pogrupowane w Tabeli 2.1, zaś odpowiednie piktogramy (symbole zagrożeń) przedstawiono na Rycinie 2.1.

Tabela 2.1. Charakterystyka zagrożeń stosowanych substancji chemicznych według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

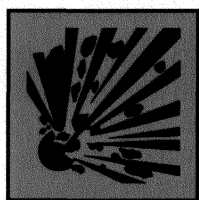
Lp.	Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia
1.	Substancje i mieszaniny o właściwościach wybuchowych	E
	<ul style="list-style-type: none"> • zagrożenie wybuchem powstaje wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu; • skrajne zagrożenie wybuchem powstaje wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu; 	
2.	Substancje i mieszaniny o właściwościach utleniających	O
	<ul style="list-style-type: none"> • kontakt z materiałami zapalnymi może spowodować pożar; • grozi wybuchem po zmieszaniu z materiałem zapalnym; 	
3.	Substancje i mieszaniny skrajnie łatwo palne	F+
	<ul style="list-style-type: none"> • substancje i preparaty ciekłe o temperaturze zapłonu $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz temperaturze wrzenia (lub w przypadku zakresu temperatur wrzenia, temperaturze początku wrzenia) $\leq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$; • substancje i preparaty w postaci gazu, palne w kontakcie z powietrzem przy ciśnieniu atmosferycznym i w temperaturze otoczenia; 	
4.	Substancje i mieszaniny wysoce łatwo palne	F
	<ul style="list-style-type: none"> • 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 $< 21\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $1\text{ dm}^3/\text{kg}/\text{h}$; • substancje i preparaty, które mogą rozgrzać się i w rezultacie zapalić w kontakcie z powietrzem w temperaturze otoczenia, bez jakiegokolwiek dostarczania energii; 	
5.	Substancje i mieszaniny łatwo palne	R10
6.	Substancje i mieszaniny bardzo toksyczne	T+
	<ul style="list-style-type: none"> • działają bardzo toksycznie po połyknięciu: <ul style="list-style-type: none"> – LD_{50} (doustnie, szczury): $< 25\text{ mg}/\text{kg}$; • działają bardzo toksycznie w kontakcie ze skórą: <ul style="list-style-type: none"> – LD_{50} (naskórnice, szczury lub królik): $< 50\text{ mg}/\text{kg}$; • działają bardzo toksycznie przez drogi oddechowe: <ul style="list-style-type: none"> – LC_{50} (inhalacja, szczury): $< 0,25\text{ mg}/\text{dm}^3$ przez 4 godziny; • zagrażają powstaniem bardzo poważnych, nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia; 	

cd. Tabela 2.1

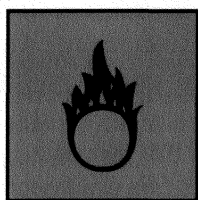
Lp.	Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia
7.	Substancje i mieszaniny toksyczne	T
	<ul style="list-style-type: none"> działają toksycznie po połyknięciu: <ul style="list-style-type: none"> – LD₅₀ (doustnie, szczury): 25-200 mg/kg; działają toksycznie w kontakcie ze skórą: <ul style="list-style-type: none"> – LD₅₀ (naskórnice, szczury lub królik): 50-400 mg/kg; działają toksycznie przez drogi oddechowe: <ul style="list-style-type: none"> – LC₅₀ (inhalacja, szczury): 0,25-1 mg/dm³ przez 4 godziny; zagrożają powstaniem bardzo poważnych, nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia; 	
8.	Substancje i mieszaniny szkodliwe	Xn
	<ul style="list-style-type: none"> działają szkodliwie po połyknięciu: <ul style="list-style-type: none"> – LD₅₀ (doustnie, szczury): 200-2000 mg/kg; działają szkodliwie w kontakcie ze skórą: <ul style="list-style-type: none"> – LD₅₀ (naskórnice, szczury lub królik): 400-2000 mg/kg; działają szkodliwie przez drogi oddechowe: <ul style="list-style-type: none"> – LC₅₀ (inhalacja, szczury): 1-5 mg/dm³ przez 4 godziny; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia; <ul style="list-style-type: none"> – stwarzają poważne zagrożenie zdrowia w następstwie długotrwałego narażenia; mogą wywoływać uczulenia, w kontakcie z wodą lub kwasami mogą powodować uwalnianie gazów; 	
9.	Substancje i mieszaniny żrące	C
	<ul style="list-style-type: none"> powodują oparzenia w wyniku narażenia trwającego do 4 godzin lub do 3 minut (poważne oparzenia) lub, jeżeli ten wynik można przewidzieć; 	
10.	Substancje i mieszaniny drażniące	Xi
	<ul style="list-style-type: none"> powodują zarumienienie skóry, zaczerwienienie oczu lub działają drażniąco na układ oddechowy; 	
11.	Substancje i mieszaniny uczulające	R42 i/lub R43
12.	Substancje i mieszaniny rakotwórcze	Karc.
13.	Substancje i mieszaniny mutagenne	Muta.
14.	Substancje i mieszaniny działające szkodliwie na rozrodczość	Repr.

cd. Tabela 2.1.

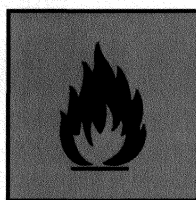
Lp.	Rodzaj i kryterium zagrożenia	Symbol zagrożenia
15.	Substancje i mieszaniny niebezpieczne dla środowiska	N i/lub
	<ul style="list-style-type: none"> działają toksycznie na rośliny, zwierzęta, organizmy glebowe, pszczoły; np. toksyczność ostra wynosi: <ul style="list-style-type: none"> dla 96 godzin LC₅₀ (ryby): < 1 mg/dm³; dla 48 godzin EC₅₀ (rozwiłtiki): < 1 mg/dm³; dla 72 godzin LC₅₀ (glony): < 1 mg/dm³; 	R52, R53, R59



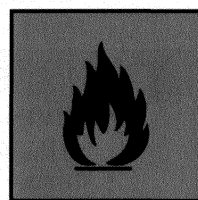
E
substancja
wybuchowa



O
substancja
utleniająca



F
substancja
wysoce
łatwo palna



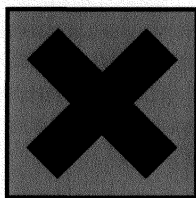
F+
substancja
skrajnie
łatwo palna



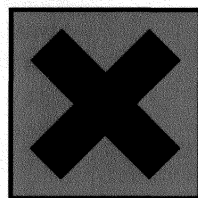
T
substancja
toksyczna



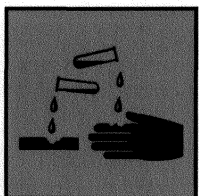
T+
substancja
bardzo
toksyczna



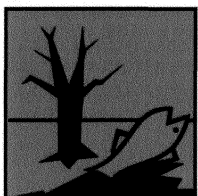
Xn
substancja
szkodliwa



Xi
substancja
drażniająca



C
substancja
żrąca



N
substancja
niebezpieczna
dla środowiska

Rycina 2.1. Symbole zagrożeń według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

Substancje i preparaty zakwalifikowane przynajmniej do jednej z powyższych grup są wymienione w załączniku I Dyrektywy, który jest regularnie aktualizowany. Publiczna baza substancji wymienionych w załączniku I – Europejski System Informacji o Substancjach Chemicznych (ang. *European Chemical Substances Information System* – ESIS) – jest prowadzona przez Instytut Ochrony Zdrowia i Konsumenta (ang. *Institute for Health and Consumer Protection*). Standardowe zwroty informacyjne określone są w załączniku III i IV Dyrektywy. Załącznik III określa zwroty szczególnego ryzyka odnoszącego się do substancji i preparatów niebezpiecznych, często określanych jako zwroty ryzyka (zwroty R, ang. *Risk phrases, R-phrases*) (Tabela 2.2a-b). Zwroty R zostały zastąpione przez zwroty H na skutek wejścia w życie 20 stycznia 2009 Rozporządzenia CLP wdrażającego Globalnie Zharmonizowany System Klasyfikacji i Oznakowania Chemikaliów. Załącznik IV określa oznaczenia będące wskazówkami odnoszącymi się do bezpiecznego stosowania niebezpiecznych substancji i preparatów, często określanych jako zwroty bezpieczeństwa (zwroty S, ang. *Safety phrases, S-phrases*) (Tabela 2.3a-b), które zostały zastąpione Zwrotami P, tzn. zwrotami wskazującymi środki ostrożności (zwroty P, ang. *Precautionary statements*). Rozporządzenie CLP dopuszcza jednak okresy przejściowe do 1 czerwca 2015 r. zwroty R i S mogą być jeszcze w określonych sytuacjach stosowane. Niemniej jednak odpowiednie zwroty muszą być umieszczone na opakowaniu i etykiecie produktu oraz karcie charakterystyki substancji/mieszaniny (MSDS, ang. *Material Safety Data Sheet*).

Tabela 2.2a. Zwroty R wskazujące rodzaj zagrożenia oraz ich numery według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

R1	Substancja/preparat/produkt wybuchowa(y) w stanie suchym
R2	Zagrożenie wybuchem wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu
R3	Skrajne zagrożenie wybuchem wskutek uderzenia, tarcia, kontaktu z ogniem lub innymi źródłami zapłonu
R4	Tworzy łatwo wybuchające związki metaliczne
R5	Ogrzanie grozi wybuchem
R6	Substancja/preparat/produkt wybuchowa(y) z dostępem i bez dostępu powietrza
R7	Może spowodować pożar
R8	Kontakt z materiałami zapalnymi może spowodować pożar
R9	Grozi wybuchem po zmieszaniu z materiałem zapalnym
R10	Substancja/preparat/produkt łatwo palna(y)
R11	Substancja/preparat/produkt wysoce łatwo palna(y)
R12	Substancja/preparat/produkt skrajnie łatwo palna(y)
R14	Reaguje gwałtownie z wodą
R15	W kontakcie z wodą uwalnia skrajnie łatwo palne gazy
R16	Substancja/preparat/produkt wybuchowa(y) po zmieszaniu z substancjami utleniającymi
R17	Samorzutnie zapala się w powietrzu
R18	Podczas stosowania mogą powstawać łatwo palne lub wybuchowe mieszaniny par z powietrzem
R19	Może tworzyć wybuchowe nadtlenki
R20	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe
R21	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą
R22	Działa szkodliwie po połknięciu
R23	Działa toksycznie przez drogi oddechowe
R24	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą
R25	Działa toksycznie po połknięciu
R26	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe
R27	Działa bardzo toksycznie w kontakcie ze skórą
R28	Działa bardzo toksycznie po połknięciu
R29	W kontakcie z wodą uwalnia toksyczne gazy
R30	Podczas stosowania może stać się wysoce łatwo palny
R31	W kontakcie z kwasami uwalnia toksyczne gazy
R32	W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy
R33	Niebezpieczeństwo kumulacji w organizmie
R34	Powoduje oparzenia

cd. Tabela 2.2a.

R35	Powoduje poważne oparzenia
R36	Działa drażniąco na oczy
R37	Działa drażniąco na drogi oddechowe
R38	Działa drażniąco na skórę
R39	Zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40	Możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R41	Ryzyko poważnego uszkodzenia oczu
R42	Może powodować uczulenie w następstwie narażenia drogą oddechową
R43	Może powodować uczulenie w kontakcie ze skórą
R44	Zagrożenie wybuchem po ogrzaniu w zamkniętym pojemniku
R45	Może powodować raka
R46	Może powodować dziedziczne wady genetyczne
R48	Stwarza poważne zagrożenie zdrowia w następstwie długotrwałego narażenia
R49	Może powodować raka w następstwie narażenia drogą oddechową
R50	Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne
R51	Działa toksycznie na organizmy wodne
R52	Działa szkodliwie na organizmy wodne
R53	Może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym
R54	Działa toksycznie na rośliny
R55	Działa toksycznie na zwierzęta
R56	Działa toksycznie na organizmy glebowe
R57	Działa toksycznie na pszczoły
R58	Może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku
R59	Stwarza zagrożenie dla warstwy ozonowej
R60	Może upośledzać płodność
R61	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki
R62	Możliwe ryzyko upośledzenia płodności
R63	Możliwe ryzyko szkodliwego działania na dziecko w łonie matki
R64	Może oddziaływać szkodliwie na dzieci karmione piersią
R65	Działa szkodliwie; może powodować uszkodzenie płuc w przypadku połknięcia
R66	Powtarzające się narażenie może powodować wysuszenie lub pęknięcie skóry
R67	Pary mogą wywoływać uczucie senności i zawroty głowy

Tabela 2.2b. Zwroty R łączone wskazujące rodzaj zagrożenia oraz ich numery według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

R14/15	Reaguje gwałtownie z wodą uwalniając skrajnie łatwo palne gazy
R15/29	W kontakcie z wodą uwalnia skrajnie łatwo palne, toksyczne gazy
R20/21	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą
R20/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i po połknięciu
R20/21/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R21/22	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R23/24	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą
R23/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i po połknięciu
R23/24/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R24/25	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R26/27	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą
R26/28	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe i po połknięciu
R26/27/28	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R27/28	Działa bardzo toksycznie w kontakcie ze skórą i po połknięciu
R36/37	Działa drażniąco na oczy i drogi oddechowe
R36/38	Działa drażniąco na oczy i skórę
R36/37/38	Działa drażniąco na oczy, drogi oddechowe i skórę
R37/38	Działa drażniąco na drogi oddechowe i skórę
R39/23	Działa toksycznie przez drogi oddechowe; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/24	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/25	Działa toksycznie po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/23/24	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/23/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/24/25	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą i po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka

cd. Tabela 2.2b.

R39/23/24/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/26	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/27	Działa bardzo toksycznie w kontakcie ze skórą; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/28	Działa bardzo toksycznie po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/26/27	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/26/28	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe i po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/27/28	Działa bardzo toksycznie w przypadku kontaktu ze skórą i po spożyciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R39/26/27/28	Działa bardzo toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu; zagraża powstaniem bardzo poważnych nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/20	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/21	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/22	Działa szkodliwie po połknięciu; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/20/21	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/20/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i po połknięciu; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/21/22	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą i po połknięciu; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R40/20/21/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu; możliwe ryzyko powstania nieodwracalnych zmian w stanie zdrowia człowieka
R42/43	Może powodować uczulenie w następstwie narażenia drogą oddechową i w kontakcie ze skórą

cd. Tabela 2.2b.

R48/20	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/21	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/22	Działa szkodliwie po połknięciu; poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/20/21	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/20/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/21/22	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/20/21/22	Działa szkodliwie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/23	Działa toksycznie przez drogi oddechowe; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/24	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/25	Działa toksycznie po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/23/24	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i w kontakcie ze skórą; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/23/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/24/25	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R48/23/24/25	Działa toksycznie przez drogi oddechowe, w kontakcie ze skórą i po połknięciu; stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka w następstwie długotrwałego narażenia
R50/53	Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne; może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym
R51/53	Działa toksycznie na organizmy wodne; może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym
R52/53	Działa szkodliwie na organizmy wodne; może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym

Tabela 2.3a. Zwroty S określające warunki bezpiecznego stosowania substancji niebezpiecznej lub preparatu niebezpiecznego oraz ich numery według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

S1	Przechowywać pod zamknięciem
S2	Chronić przed dziećmi
S3	Przechowywać w chłodnym miejscu
S4	Nie przechowywać w pomieszczeniach mieszkalnych
S5	Przechowywać w ... (cieczy wskazanej przez producenta)
S6	Przechowywać w atmosferze ... (obojętnego gazu wskazanego przez producenta)
S7	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty
S8	Przechowywać pojemnik w suchym pomieszczeniu
S9	Przechowywać pojemnik w pomieszczeniu dobrze wentylowanym
S12	Nie przechowywać pojemnika szczelnie zamkniętego
S13	Nie przechowywać razem z żywnością, napojami i paszami dla zwierząt
S14	Nie przechowywać razem z ... (materiałami określonymi przez producenta)
S15	Przechowywać z dala od źródeł ciepła
S16	Nie przechowywać w pobliżu źródeł zapłonu – nie palić tytoniu
S17	Nie przechowywać razem z materiałami zapalnymi
S18	Zachować ostrożność w trakcie otwierania i manipulacji z pojemnikiem
S20	Nie jeść i nie pić podczas stosowania substancji/preparatu/ produktu
S21	Nie palić tytoniu podczas stosowania substancji/preparatu/ produktu
S22	Nie wdychać pyłu
S23	Nie wdychać gazu/dymu/pary/rozpylonej cieczy (rodzaj określi producent)
S24	Unikać zanieczyszczenia skóry
S25	Unikać zanieczyszczenia oczu
S26	Zanieczyszczone oczy przemyć natychmiast dużą ilością wody i zasięgnąć porady lekarza
S27	Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież
S28	Zanieczyszczoną skórę natychmiast przemyć dużą ilością ... (cieczy określonej przez producenta)
S29	Nie wprowadzać do kanalizacji
S30	Nigdy nie dodawać wody do tej substancji/preparatu/ produktu
S33	Zastosować środki ostrożności zapobiegające wyładowaniom elektrostatycznym
S35	Usuwać substancję/preparat/produkt i jego opakowanie w sposób bezpieczny

cd. Tabela 2.3a.

S36	Nosić odpowiednią odzież ochronną
S37	Nosić odpowiednie rękawice ochronne
S38	W przypadku niedostatecznej wentylacji stosować odpowiednie indywidualne środki ochrony dróg oddechowych
S39	Nosić okulary lub ochronę twarzy
S40	Czyścić podłogę i wszystkie inne obiekty zanieczyszczone tą substancją/preparatem/ produktem ... (środkiem wskazanym przez producenta)
S41	Nie wdychać dymów powstających w wyniku pożaru lub wybuchu
S42	Podczas fumigacji/rozpylania/natryskiwania stosować odpowiednie środki ochrony dróg oddechowych (rodzaj określi producent)
S43	W przypadku pożaru używać ... (podać rodzaj sprzętu przeciwpożarowego; jeżeli woda zwiększa zagrożenie, dodać ... nigdy nie używać wody)
S45	W przypadku awarii lub jeżeli źle się poczujesz, niezwłocznie zasięgnij porady lekarza – jeżeli to możliwe, pokaż etykietę
S46	W razie poknięcia niezwłocznie zasięgnij porady lekarza – pokaż opakowanie lub etykietę
S47	Przechowywać w temperaturze nieprzekraczającej ... °C (określi producent)
S48	Przechowywać zwilżony (-ą) (właściwy materiał określi producent)
S49	Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu
S50	Nie mieszać z ... (określi producent)
S51	Stosować wyłącznie w dobrze wentylowanych pomieszczeniach
S52	Nie zaleca się nanoszenia na duże płaszczyzny wewnątrz pomieszczeń
S53	Unikać narażenia – przed użyciem zapoznać się z instrukcją
S56	Zużyta substancję/preparat/produkt oraz opakowanie dostarczyć na składowisko odpadów niebezpiecznych
S57	Używać odpowiednich pojemników zapobiegających skażeniu środowiska
S59	Przestrzegać wskazówek producenta lub dostawcy dotyczących odzysku lub wtórnego wykorzystania
S60	Substancję/preparat/produkt i opakowanie usuwać jako odpad niebezpieczny
S61	Unikać zrzutów do środowiska. Postępować zgodnie z instrukcją lub kartą charakterystyki
S62	W razie poknięcia nie wywoływać wymiotów: niezwłocznie zasięgnąć porady lekarza i pokazać opakowanie lub etykietę
S63	W przypadku zatrucia drogą oddechową wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku
S64	W przypadku poknięcia wypluć usta wodą – nigdy nie stosować u osób nieprzytomnych

Tabela 2.3b. Zwroty S łączone określające warunki bezpiecznego stosowania substancji niebezpiecznej lub preparatu niebezpiecznego oraz ich numery według I Dyrektywy 67/548/EWG (Dyrektywa DSD)

S1/2	Przechowywać pod zamknięciem i chronić przed dziećmi
S3/7	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty w chłodnym miejscu
S3/9/14	Przechowywać w chłodnym, dobrze wentylowanym miejscu, z dala od ... (materiału wskazanego przez producenta)
S3/9/14/49	Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu, w chłodnym, dobrze wentylowanym miejscu; nie przechowywać razem z ... (materiałami wskazanymi przez producenta)
S3/9/49	Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu w chłodnym, dobrze wentylowanym miejscu
S3/14	Przechowywać w chłodnym miejscu; nie przechowywać razem z ... (materiałami wskazanymi przez producenta)
S7/8	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty w suchym pomieszczeniu
S7/9	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty w pomieszczeniu dobrze wentylowanym
S7/47	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty w temperaturze nieprzekraczającej ...°C (określi producent)
S20/21	Nie jeść i nie pić oraz nie palić tytoniu podczas stosowania substancji/preparatu/produktu
S24/25	Unikać zanieczyszczenia skóry i oczu
S27/28	W przypadku zanieczyszczenia skóry natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież i przemyć zanieczyszczoną skórę dużą ilością ... (rodzaj cieczy określi producent)
S29/35	Nie wprowadzać do kanalizacji, a substancję/preparat/produkt i opakowanie usuwać w sposób bezpieczny
S29/56	Nie wprowadzać do kanalizacji, a użytą substancję/preparat/produkt i opakowanie dostarczyć na składowisko odpadów niebezpiecznych
S36/37	Nosić odpowiednią odzież ochronną i odpowiednie rękawice ochronne
S36/37/39	Nosić odpowiednią odzież ochronną, odpowiednie rękawice ochronne i okulary lub ochronę twarzy
S36/39	Nosić odpowiednią odzież ochronną i okulary lub ochronę twarzy
S37/39	Nosić odpowiednie rękawice ochronne i okulary lub ochronę twarzy
S47/49	Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu w temperaturze nieprzekraczającej ... °C (określi producent)

Karta charakterystyki substancji/mieszanin (MSDS) powinna:

- być napisana językiem prostym i zrozumiałym;
- zawierać jednoznaczne i zwięzłe stwierdzenia;
- zawierać 16 obowiązkowych punktów, kolejność punktów winna być zgodna z rozporządzeniem;
- zawierać wszystkie niezbędne dane o zagrożeniach;
- nie powinna zawierać zbędnego tekstu, np. mieszanina nie jest niebezpieczna dla środowiska;
- być przygotowana przez wykwalifikowaną osobę lub zespół osób;
- w karcie charakterystyki winien być wymieniony producent, importer lub dystrybutor oraz data sporządzenia bądź aktualizacji karty.

Karta charakterystyki składa się z 16 następujących tytułów sekcji:**Sekcja 1: Identyfikacja substancji/mieszaniny i identyfikacja przedsiębiorstwa**

1. Identyfikator produktu
2. Istotne zidentyfikowane zastosowania substancji lub mieszaniny oraz zastosowania odradzane
3. Dane dotyczące dostawcy karty charakterystyki
4. Numer telefonu alarmowego

Sekcja 2: Identyfikacja zagrożeń

1. Klasyfikacja substancji lub mieszaniny
2. Elementy oznakowania
3. Inne zagrożenia

Sekcja 3: Skład/informacja o składnikach

1. Substancje
2. Mieszaniny

Sekcja 4: Środki pierwszej pomocy

1. Opis środków pierwszej pomocy
2. Najważniejsze ostre i opóźnione objawy oraz skutki narażenia
3. Wskazania dotyczące wszelkiej natychmiastowej pomocy lekarskiej i szczególnego postępowania z poszkodowanym

Sekcja 5: Postępowanie w przypadku pożaru

1. Środki gaśnicze
2. Szczególne zagrożenia związane z substancją lub mieszaniną
3. Informacje dla straży pożarnej

Sekcja 6: Postępowanie w przypadku niezamierzonego uwolnienia do środowiska

1. Indywidualne środki ostrożności, wyposażenie ochronne i procedury w sytuacjach awaryjnych
2. Środki ostrożności w zakresie ochrony środowiska
3. Metody i materiały zapobiegające rozprzestrzenianiu się skażenia i służące do usuwania skażenia
4. Odniesienia do innych sekcji

Sekcja 7: Postępowanie z substancjami i mieszaninami oraz ich magazynowanie

1. Środki ostrożności dotyczące bezpiecznego postępowania
2. Warunki bezpiecznego magazynowania, łącznie z informacjami dotyczącymi wszelkich wzajemnych niezgodności
3. Szczególne zastosowanie(a) końcowe

Sekcja 8: Kontrola narażenia/środki ochrony indywidualnej

1. Parametry dotyczące kontroli
2. Kontrola narażenia

Sekcja 9: Właściwości fizyczne i chemiczne

1. Informacje na temat podstawowych właściwości fizycznych i chemicznych
2. Inne informacje

Sekcja 10: Stabilność i reaktywność

1. Reaktywność
2. Stabilność chemiczna
3. Możliwość występowania niebezpiecznych reakcji
4. Warunki, których należy unikać
5. Materiały niezgodne
6. Niebezpieczne produkty rozkładu

Sekcja 11: Informacje toksykologiczne

1. Informacje dotyczące skutków toksykologicznych

Sekcja 12: Informacje ekologiczne

1. Toksyczność
2. Trwałość i zdolność do rozkładu
3. Zdolność do bioakumulacji
4. Mobilność w glebie
5. Wyniki oceny właściwości PBT i vPvB
6. Inne szkodliwe skutki działania

Sekcja 13: Postępowanie z odpadami

1. Metody unieszkodliwiania odpadów

Sekcja 14: Informacje dotyczące transportu

1. Numer UN (numer ONZ)
2. Prawidłowa nazwa przewozowa UN
3. Klasa(-y) zagrożenia w transporcie
4. Grupa pakowania
5. Zagrożenia dla środowiska
6. Szczególne środki ostrożności dla użytkowników
7. Transport luzem zgodnie z załącznikiem II do konwencji MARPOL 73/78 i kodeksem IBC

Sekcja 15: Informacje dotyczące przepisów prawnych

1. Przepisy prawne dotyczące bezpieczeństwa, zdrowia i ochrony środowiska specyficzne dla substancji lub mieszaniny
2. Ocena bezpieczeństwa chemicznego

Sekcja 16: Inne informacje

Według rozporządzenia CLP zwroty H i P są zakodowane za pomocą specyficznego kodu alfanumerycznego, który składa się z:

1. litery „H” lub „P”;
2. cyfry określającej rodzaj zagrożenia lub środek ostrożności;
3. dwóch cyfr odpowiadających kolejnemu numerowi zagrożenia lub środka ostrożności, np. H200 lub P100 (Tabela 2.4-2.6).

Natomiast piktogramy wskazujące rodzaj zagrożenia mają kształt kwadratu ustawionego na wierzchołku. Powinny zawierać czarny symbol na białym tle z czerwonym obramowaniem (Tabela 2.7-2.9; Rycina 2.2).

Tabela 2.4. Zakres kodów dla zwrotów określających zagrożenia i środki ostrożności na podstawie rozporządzenia CLP

Zakres	Zwroty określające zagrożenie (zwroty H)	Zwroty określające środki ostrożności (zwroty P)
100 – 199	–	Ogólne
200 – 299	Zagrożenie fizyczne	Zapobieganie
300 – 399	Zagrożenie dla zdrowia	Reagowanie
400 – 499	Zagrożenie dla środowiska	Przechowywanie
500 – 599	–	Usuwanie

Tabela 2.5a. Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia dla zagrożeń fizycznych na podstawie rozporządzenia CLP

H200	Materiały wybuchowe niestabilne
H201	Materiał wybuchowy; zagrożenie wybuchem masowym
H202	Materiał wybuchowy, poważne zagrożenie rozrzutem
H203	Materiał wybuchowy; zagrożenie pożarem, wybuchem lub rozrzutem
H204	Zagrożenie pożarem lub rozrzutem
H205	Może wybuchać masowo w przypadku pożaru
H220	Skrajnie łatwo palny gaz
H221	Gaz łatwo palny
H222	Skrajnie łatwo palny aerozol
H223	Aerozol łatwo palny
H224	Skrajnie łatwo palna ciecz i pary
H225	Wysoce łatwo palna ciecz i pary
H226	Łatwo palna ciecz i pary
H228	Substancja stała łatwo palna
H240	Ogrzanie grozi wybuchem
H241	Ogrzanie może spowodować pożar lub wybuch
H242	Ogrzanie może spowodować pożar
H250	Zapala się samorzutnie w przypadku wystawienia na działanie powietrza
H251	Substancja samonagrzewająca się: może się zapalić
H252	Substancja samonagrzewająca się w dużych ilościach; może się zapalić
H260	W kontakcie z wodą uwalniają łatwo palne gazy, które mogą ulegać samozapaleniu
H261	W kontakcie z wodą uwalnia łatwo palne gazy
H270	Może spowodować lub intensyfikować pożar; utleniacz
H271	Może spowodować pożar lub wybuch; silny utleniacz

cd. Tabela 2.5a.

H272	Może intensyfikować pożar; utleniacz
H280	Zawiera gaz pod ciśnieniem; ogrzanie grozi wybuchem
H281	Zawiera schłodzony gaz; może spowodować oparzenia kriogeniczne lub obrażenia
H290	Może powodować korozję metali

Tabela 2.5b. Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia dla zdrowia na podstawie rozporządzenia CLP

H300	Połknięcie grozi śmiercią
H301	Działa toksycznie po połknięciu
H302	Działa szkodliwie po połknięciu
H304	Połknięcie i dostanie się przez drogi oddechowe może grozić śmiercią
H310	Grozi śmiercią w kontakcie ze skórą
H311	Działa toksycznie w kontakcie ze skórą
H312	Działa szkodliwie w kontakcie ze skórą
H314	Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu
H315	Działa drażniąco na skórę
H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry
H318	Powoduje poważne uszkodzenie oczu
H319	Działa drażniąco na oczy
H330	Wdychanie grozi śmiercią
H331	Działa toksycznie w następstwie wdychania
H332	Działa szkodliwie w następstwie wdychania
H334	Może powodować objawy alergii lub astmy, lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania
H335	Może powodować podrażnienie dróg oddechowych
H336	Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy
H340	Może powodować wady genetyczne <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inna droga narażenia nie powoduje zagrożenia>
H341	Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inna droga narażenia nie powoduje zagrożenia>
H350	Może powodować raka <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inna droga narażenia nie powoduje zagrożenia>
H350i	Wdychanie może spowodować raka

cd. Tabela 2.5b.

H351	Podejrzewa się, że powoduje raka <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inna droga narażenia nie powoduje zagrożenia>
H360	Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki <podać szczególny skutek, jeżeli jest znany>, <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>
H360F	Może działać szkodliwie na płodność
H360FD	Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki
H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki
H360Fd	Może działać szkodliwie na płodność. Podejrzewa się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki
H360Df	Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki. Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność
H361	Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki <podać szczególny skutek, jeżeli jest znany>; <podać drogę narażenia, jeżeli definitywnie udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>
H361f	Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność
H361d	Podejrzewa się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki
H361fd	Podejrzewa się, że działa szkodliwie na płodność. Podejrzewa się, że działa szkodliwie na dziecko w łonie matki
H362	Może działać szkodliwie na dzieci karmione piersią
H370	Powoduje uszkodzenie narządów <podać szczególny skutek, jeśli jest znany>; <podać drogę narażenia, jeżeli udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>
H371	Może powodować uszkodzenie narządów <podać wszystkie znane narządy, których to dotyczy>; <podać drogę narażenia, jeżeli udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>
H372	Powoduje uszkodzenie narządów <podać wszystkie znane narządy, których to dotyczy> poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie <podać drogę narażenia, jeżeli udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>
H373	Może powodować uszkodzenie narządów <podać wszystkie znane narządy, których to dotyczy> poprzez długotrwałe lub narażenie powtarzane <podać drogę narażenia, jeśli udowodniono, że inne drogi narażenia nie stwarzają zagrożenia>

Tabela 2.5c. Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia dla środowiska na podstawie rozporządzenia CLP

H400	Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne
H410	Działa bardzo toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki
H411	Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki
H412	Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki
H413	Może powodować długotrwałe szkodliwe skutki dla organizmów wodnych

Tabela 2.5d. Dodatkowe zwroty informujące o zagrożeniach na podstawie rozporządzenia CLP

Zwroty EUH wskazują nieuwzględnione zwroty R w GHS, określające	
1. Zagrożenia fizyczne	
EUH001	Produkt wybuchowy w stanie suchym
EUH006	Produkt wybuchowy z dostępem lub bez dostępu powietrza
EUH014	Reaguje gwałtownie z wodą
EUH018	Podczas stosowania mogą powstawać łatwo palne lub wybuchowe mieszaniny par z powietrzem
EUH019	Może tworzyć wybuchowe nadtlenki
EUH044	Zagrożenie wybuchem po ogrzaniu w zamkniętym pojemniku
2. Zagrożenia dla zdrowia	
EUH029	W kontakcie z wodą uwalnia toksyczne gazy
EUH031	W kontakcie z kwasami uwalnia toksyczne gazy
EUH032	W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy
EUH066	Powtarzające się narażenie może powodować wysuszenie lub pęknięcie skóry
EUH070	Działa toksycznie w kontakcie z oczami
EUH071	Działa żrąco na drogi oddechowe
3. Zagrożenia dla środowiska	
EUH059	Stwarza zagrożenie dla warstwy ozonowej

Tabela 2.5e. Uzupełniające zwroty informujące o niektórych substancjach lub mieszaninach na podstawie rozporządzenia CLP

EUH201	Zawiera ołów. Nie należy stosować na powierzchniach, które mogą być gryzione lub ssane przez dzieci
EUH201A	Uwaga! Zawiera ołów
EUH202	Cyjanoakrylany. Niebezpieczeństwo. Skleja skórę i powieki w ciągu kilku sekund. Chronić przed dziećmi
EUH203	Zawiera chrom(VI). Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej
EUH204	Zawiera izocyjaniany. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej
EUH205	Zawiera składniki epoksydowe. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej
EUH206	Uwaga! Nie stosować razem z innymi produktami. Może wydzielać niebezpieczne gazy (chlor)
EUH207	Uwaga! Zawiera kadm. Podczas stosowania wydziela niebezpieczne pary. Zapoznaj się z informacją dostarczoną przez producenta. Przestrzegaj instrukcji bezpiecznego stosowania
EUH208	Zawiera <nazwa substancji uczulającej>. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej. EUH209 Podczas stosowania może przekształcić się w substancję wysoce łatwo palną
EUH209A	Podczas stosowania może przekształcić się w substancję łatwo palną
EUH210	Karta charakterystyki dostępna na żądanie
EUH401	W celu uniknięcia zagrożeń dla zdrowia ludzi i środowiska, należy postępować zgodnie z instrukcją użycia

Tabela 2.6a. Zwroty wskazujące środki ostrożności – ogólne na podstawie rozporządzenia CLP

P101	W razie konieczności zasięgnięcia porady lekarza, należy pokazać pojemnik lub etykietę
P102	Chronić przed dziećmi
P103	Przed użyciem przeczytać etykietę

Tabela 2.6b. Zwroty wskazujące środki ostrożności – zapobieganie na podstawie rozporządzenia CLP

P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa
P210	Przechowywać z dala od źródeł ciepła/iskrzenia/otwartego ognia/gorących powierzchni. Palenie wzbronione
P211	Nie rozpylać nad otwartym ogniem lub innym źródłem zapłonu
P220	Trzymać/przechowywać z dala od odzież/.../materiałów zapalnych
P221	Zastosować wszelkie środki ostrożności w celu uniknięcia mieszania z innymi materiałami zapalnymi ...
P222	Nie dopuszczać do kontaktu z powietrzem
P223	Chronić przed wszelkim kontaktem z wodą z powodu gwałtownej reakcji i możliwości wystąpienia błyskawicznego pożaru
P230	Przechowywać produkt zwilżony...
P231	Używać w atmosferze obojętnej gazu
P232	Chronić przed wilgocią
P233	Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty
P234	Przechowywać wyłącznie w oryginalnym pojemniku
P235	Przechowywać w chłodnym miejscu
P240	Uziemić/połączyć pojemnik i sprzęt odbiorczy
P241	Używać elektrycznego/wentylującego/oświetleniowego/.../przeciwwybuchowego sprzętu
P242	Używać wyłącznie nieiskrzących narzędzi
P243	Przedsięwziąć środki ostrożności zapobiegające statycznemu rozładowaniu
P244	Chronić zawory redukcyjne przed tłuszczem i olejem
P250	Nie poddawać szlifowaniu/wstrząsom/.../tarcia
P251	Pojemnik pod ciśnieniem. Nie przekłuwać ani nie spalać, nawet po użyciu
P260	Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy
P261	Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy
P262	Nie wprowadzać do oczu, na skórę lub na odzież
P263	Unikać kontaktu w czasie ciąży/karmienia piersią
P264	Dokładnie umyć po użyciu
P270	Nie jeść, nie pić ani nie palić podczas używania produktu
P271	Stosować wyłącznie na zewnątrz lub w dobrze wentylowanym pomieszczeniu
P272	Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wnosić poza miejsce pracy
P273	Unikać uwolnienia do środowiska

cd. Tabela 2.6b.

P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy
P281	Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej
P282	Nosić rękawice izolujące od zimna/maski na twarz/ochronę oczu
P283	Nosić odzież ognioodporną/płomieniodporną/opóźniającą zapalenie
P284	Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych
P285	W przypadku niedostatecznej wentylacji stosować indywidualne środki ochrony dróg
P231 + P232	Używać w atmosferze obojętnego gazu. Chronić przed wilgocią
P235 + P410	Przechowywać w chłodnym miejscu. Chronić przed światłem słonecznym

Tabela 2.6c. Zwroty wskazujące środki ostrożności – reagowanie na podstawie rozporządzenia CLP

P301	W przypadku połknięcia
P302	W przypadku dostania się na skórę
P303	W przypadku dostania się na skórę (lub na włosy)
P304	W przypadku dostania się do dróg oddechowych
P305	W przypadku dostania się do oczu
P306	W przypadku dostania się na odzież
P307	W przypadku narażenia
P308	W przypadku narażenia lub styczności
P309	W przypadku narażenia lub złego samopoczucia
P310	Natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P311	Skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P312	W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P313	Zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P314	W przypadku złego samopoczucia zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P315	Natychmiast zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P320	Pilnie zastosować określone leczenie (patrz ... na etykiecie)
P321	Zastosować określone leczenie (patrz ... na etykiecie)
P322	Środki szczególne (patrz ... na etykiecie)
P330	Wypłukać usta
P331	Nie wywoływać wymiotów
P332	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry:

cd. Tabela 2.6c.

P332	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry
P333	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki
P334	Zanurzyć w zimnej wodzie/owinąć mokrym bandażem
P335	Niezwiązaną pozostałość strzepnąć ze skóry
P336	Rozmrozić oszronione obszary letnią wodą. Nie trzeć oszronionego obszaru
P337	W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy
P338	Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Kontynuować płukanie
P340	Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie
P341	W przypadku trudności z oddychaniem, wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie
P342	W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego
P350	Delikatnie umyć dużą ilością wody z mydłem
P351	Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut
P352	Umyć dużą ilością wody z mydłem
P353	Splukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem
P360	Natychmiast splukać zanieczyszczoną odzież i skórę dużą ilością wody przed zdjęciem odzieży
P361	Natychmiast usunąć/zdjąć całą zanieczyszczoną odzież
P362	Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem
P363	Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem
P370	W przypadku pożaru
P371	W przypadku poważnego pożaru i dużych ilości
P372	Ryzyko wybuchu w razie pożaru
P373	Nie gasić pożaru, jeżeli ogień dosięgnie materiały wybuchowe
P374	Gasić pożar z rozsądnej odległości z zachowaniem zwykłych środków ostrożności
P375	Z powodu ryzyka wybuchu gasić pożar z odległości
P376	Jeżeli jest to bezpieczne zahamować wyciek
P377	W przypadku płonienia wyciekającego gazu: nie gasić, jeżeli nie można bezpiecznie zahamować wycieku
P378	Użyć ... do gaszenia...
P380	Evakuować teren
P381	Wyliminować wszystkie źródła zapłonu, jeżeli jest to bezpieczne
P390	Usunąć wyciek, aby zapobiec szkodom materialnym
P391	Zebrać wyciek

cd. Tabela 2.6c.

P301 + P310	W przypadku połknięcia: natychmiast skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P301 + P312	W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P301 + P330 + P331	W przypadku połknięcia: wpłukać usta. Nie wywoływać wymiotów
P302 + P334	W przypadku dostania się na skórę: zanurzyć w zimnej wodzie/owiąć mokrym bandażem
P302 + P350	W przypadku dostania się na skórę: delikatnie umyć dużą ilością wody z mydłem
P302 + P352	W przypadku dostania się na skórę: umyć dużą ilością wody z mydłem
P303 + P361 + P353	W przypadku dostania się na skórę: (lub na włosy): natychmiast usunąć/zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem
P304 + P340	W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie
P304 + P341	W przypadku dostania się do dróg oddechowych: w przypadku trudności z oddychaniem, wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie
P305 + P351 + P338	W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć
P306 + P360	W przypadku dostania się na odzież: natychmiast spłukać zanieczyszczoną odzież i skórę dużą ilością wody przed zdjęciem odzieży
P307 + P311	W przypadku narażenia: skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P308 + P313	W przypadku narażenia lub styczości: zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P309 + P311	W przypadku narażenia lub złego samopoczucia: skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem
P332 + P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P333 + P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/ zgłosić się do lekarza
P335 + P334	Niezwiązaną pozostałość strzepnąć. Zanurzyć w zimnej wodzie/owiąć mokrym bandażem
P337 + P313	W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się do lekarza
P342 + P311	W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem

cd. Tabela 2.6c.

P370 + P376	W przypadku pożaru: jeżeli jest to bezpieczne zahamować wyciek
P370 + P378	W przypadku pożaru: użyć ... do gaszenia ...
P370 + P380	W przypadku pożaru: ewakuować teren
P370 + P380 + P375	W przypadku pożaru: ewakuować teren. Z powodu ryzyka wybuchu gasić pożar z odległości
P371 + P380 + P375	W przypadku poważnego pożaru i dużych ilości: ewakuować teren. Z powodu ryzyka wybuchu gasić pożar z odległości

Tabela 2.6d. Zwroty wskazujące środki ostrożności – przechowywanie na podstawie rozporządzenia CLP

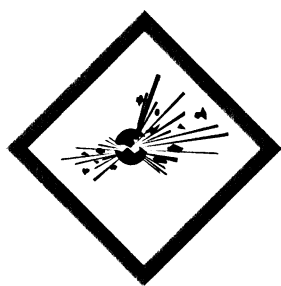
P401	Przechowywać ...
P402	Przechowywać w suchym miejscu
P403	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu
P404	Przechowywać w zamkniętym pojemniku
P405	Przechowywać pod zamknięciem
P406	Przechowywać w pojemniku odpornym na korozję o odpornej powłóce wewnętrznej
P407	Zachować szczelinę powietrzną pomiędzy stosami/ paletami
P410	Chronić przed światłem słonecznym
P411	Przechowywać w temperaturze nieprzekraczającej ... °C/... °F
P412	Nie wystawiać na działanie temperatury przekraczającej 50 °C/122°F
P413	Przechowywać luzem masy przekraczające ... kg/... funtów w temperaturze nieprzekraczającej ... °C/ ...°F
P420	Przechowywać z dala od innych materiałów
P422	Przechowywać zawartość w ...
P402 + P404	Przechowywać w suchym miejscu. Przechowywać w zamkniętym pojemniku
P402 + P233	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty
P403 + P235	Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu
P410 + P403	Chronić przed światłem słonecznym. Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu
P410 + P412	Chronić przed światłem słonecznym. Nie wystawiać na działanie temperatury przekraczającej 50 °C/ 122°F
P411 + P235	Przechowywać w temperaturze nieprzekraczającej ... °C/... °F. Przechowywać w chłodnym miejscu

Tabela 2.6e. Zwroty wskazujące środki ostrożności – usuwanie na podstawie rozporządzenia CLP

P501	Zawartość/pojemnik usuwać do ...
-------------	----------------------------------

Tabela 2.7. Piktogramy zagrożeń fizycznych substancjami chemicznymi według rozporządzenia CLP

Piktogram	Klasa i kategorie zagrożenia
	1. Środki wybuchowe
GHS01	<ul style="list-style-type: none"> niestabilne materiały wybuchowe materiały wybuchowe z podklas 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 substancje i mieszaniny samoreaktywne, typ A nadtlenki organiczne, typ A
GHS01	<ul style="list-style-type: none"> substancje i mieszaniny samoreaktywne, typ B
GHS02	<ul style="list-style-type: none"> nadtlenki organiczne, typ B
	2. Gazy łatwo palne
GHS02	<ul style="list-style-type: none"> gazy łatwo palne, kategoria zagrożenia 1 aerozole łatwo palne, kategorie zagrożeń 1, 2 substancje ciekłe łatwo palne, kategorie zagrożeń 1, 2, 3 substancje stałe łatwo palne, kategorie zagrożeń 1, 2 substancje i mieszaniny samoreaktywne, typy C, D, E, F substancje ciekłe piroforyczne, kategoria zagrożenia 1 substancje stałe piroforyczne, kategoria zagrożenia 1 substancje i mieszaniny samonagrzewające się, kategorie zagrożeń 1, 2 substancje i mieszaniny, które w kontakcie z wodą wydzielają gazy łatwo palne, kategorie zagrożeń 1, 2, 3 nadtlenki organiczne, typy C, D, E, F
	3. Gazy utleniające
GHS03	<ul style="list-style-type: none"> gazy utleniające, kategoria zagrożenia 1 substancje ciekłe utleniające, kategorie zagrożeń 1, 2, 3 substancje stałe utleniające, kategorie zagrożeń 1, 2, 3
	4. Gazy pod ciśnieniem
GHS04	<ul style="list-style-type: none"> gazy sprężone gazy skroplone gazy skroplone schłodzone gazy rozpuszczone
	5. Substancje powodujące korozję metali
GHS05	<ul style="list-style-type: none"> substancje korodujące metale, kategoria zagrożenia 1



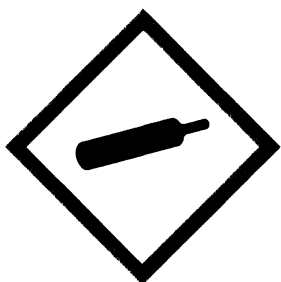
GHS01
(wybuchająca bomba)



GHS02
(płomień)



GHS03
płomień nad okregiem)



GHS04
(butla gazowa)



GHS05
(działanie żrące)



GHS06
(czaszka i skrzyżowane
piszczele)



GHS07
(wykrzyknik)



GHS08
(zagrożenie dla zdrowia)



GHS09
(środowisko)

Rycina 2.2. Piktogramy zagrożeń substancjami chemicznymi według rozporządzenia CLP

Tabela 2.8. Piktogramy zagrożeń dla zdrowia substancjami chemicznymi według rozporządzenia CLP

Piktogram	Klasa i kategorie zagrożenia
GHS06	<ul style="list-style-type: none"> toksyczność ostra (droga pokarmowa, po naniesieniu na skórę, po narażeniu inhalacyjnym), kategorie zagrożeń 1, 2, 3
GHS05	<ul style="list-style-type: none"> działanie żrące / drażniące na skórę, kategorie zagrożeń 1A, 1B, 1C poważne uszkodzenie oczu, kategoria zagrożenia 1
GHS07	<ul style="list-style-type: none"> toksyczność ostra (droga pokarmowa, po naniesieniu na skórę, po narażeniu inhalacyjnym), kategoria zagrożenia 4 działanie drażniące na skórę, kategoria zagrożenia 2 działanie drażniące na oczy, kategoria zagrożenia 2 działanie uczulające na skórę, kategoria zagrożenia 1 działanie toksyczne na narządy docelowe – jednorazowe narażenie, kategoria zagrożenia 3 działanie drażniące na drogi oddechowe skutek narkotyczny
GHS08	<ul style="list-style-type: none"> działanie uczulające na drogi oddechowe, kategoria zagrożenia 1 działanie mutagenne na komórki rozrodcze, kategorie zagrożeń 1A, 1B, 2 rakotwórczość, kategorie zagrożeń 1A, 1B, 2 działanie szkodliwe na rozrodczość, kategorie zagrożeń 1A, 1B, 2 działanie toksyczne na narządy docelowe – jednorazowe narażenie, kategorie zagrożeń 1, 2 działanie toksyczne na narządy docelowe – powtarzane narażenie, kategorie zagrożeń 1, 2 zagrożenie spowodowane aspiracją, kategoria zagrożenia 1
piktogram nie jest wymagany	<ul style="list-style-type: none"> działanie szkodliwe na rozrodczość, wpływ na laktację lub oddziaływanie szkodliwe na dzieci karmione piersią, dodatkowa klasa zagrożeń

Tabela 2.9. Piktogramy zagrożeń dla środowiska substancjami chemicznymi według rozporządzenia CLP

Piktogram	Klasa i kategorie zagrożenia
GHS09	stwarzające zagrożenie dla środowiska wodnego: <ul style="list-style-type: none"> zagrożenie ostre, kategoria 1 zagrożenie przewlekłe, kategorie 1, 2
piktogram nie jest wymagany	stwarzające zagrożenie dla środowiska wodnego: <ul style="list-style-type: none"> zagrożenie przewlekłe, kategorie 3, 4

Wykonując ćwiczenia laboratoryjne z toksykologii student zobowiązany jest przestrzegać regulaminu pracowni oraz przepisów bezpieczeństwa pracy.

1. W pracowni mogą przebywać studenci wyłącznie w obecności prowadzącego.
2. W celu ochrony odzieży przed zanieczyszczeniem każdy pracujący (student lub pracownik) zobowiązany jest zaopatrzyć się w fartuch ochronny.
3. Osoby posiadające długie włosy powinny je spiąć.
4. Obowiązkiem studenta jest utrzymanie ładu i czystości w miejscu pracy. Palenie tytoniu, spożywanie posiłków w laboratorium jest surowo wzbronione.
5. Podczas wykonywania ćwiczeń należy zachować spokój, powagę. Każdy student powinien znajdować się tylko i wyłącznie przy swoim miejscu pracy, należy unikać zbędnego gromadzenia się.
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. Przy wyciągu stoją maksymalnie dwie osoby.
7. Pobrane odczynniki, szkło i przyrządy należy po zakończeniu ćwiczeń odnieść na właściwe miejsce w stanie czystym. Nie wolno wykonywać ćwiczeń w brudnych naczyniach.
8. Każde uszkodzenie sprzętu lub szkła musi być zgłoszone prowadzącemu.
9. Naczynia z chemikaliami należy zaraz po użyciu szczelnie zamknąć właściwym korkiem. Nie można dopuścić do pomieszczenia chemikaliów.
10. Nie należy wrzucać do kosza resztek niebezpiecznych substancji, lecz zbierać je do przeznaczonych na ten cel pojemników.
11. Nie wrzucać do zlewów stłuczonego szkła i substancji stałych, które mogą spowodować zapchanie przewodów kanalizacyjnych.
12. Roztwory (kwasów, zasad) należy wlewać do zlewów kamionkowych, spłukując obficie wodą bieżącą.
13. Żadnych substancji i materiałów z pracowni nie wolno nikomu dawać, ani brać do domu.
14. 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.

15. Pracując z substancjami łatwo palnymi (eter, benzen, aceton) nie można zapalać ognia. Wcześniej należy sprawdzić 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.
16. Nigdy nie wlewać wody do stężonych kwasów, ponieważ grozi to poparzeniem.
17. Nie pipetować ustami szkodliwych substancji (stężonych kwasów, wodorotlenków, amoniaku, roztworów cyjanków i bromu). W tym celu trzeba używać specjalnych, podpisanych pipet zaopatrzonych w gumowe gruszki lub nasadki bądź odpowiednich dozowników.
18. W analizie toksykologicznej należy posługiwać się wyłącznie dokładnie wymyтым szkłem. Po zakończeniu doświadczenia należy dokładnie umyć szkło laboratoryjne ciepłym roztworem detergentu, używając czystej szczotki, starannie spłukać bieżącą wodą, a następnie 3-krotnie wodą destylowaną.
19. Nigdy nie należy wachać żadnych substancji chemicznych, chyba że jest to wyraźnie zalecane w instrukcji ćwiczenia. W żadnej sytuacji nie wolno nachylać się nad naczyniem, ani zbliżać jego otworu do nosa. Zapach substancji bada się, trzymając próbkę z substancją w odległości około 20 cm od nosa, kierując pary wachlującym ruchem dłoni w stronę nosa. Nie należy brać głębokich oddechów.
20. Nie pochylać się nad naczyniem, w którym coś wrze lub do którego wlewa się ciecz (zwłaszcza żrąca). Nie dopuszczać do dużego wzrostu ciśnienia wewnątrz naczynia i możliwości wybuchu.
21. Ogrzewając substancję w próbówce należy pamiętać, aby wylot próbki skierować w przeciwnym kierunku do wykonującego doświadczenie i pozostałych osób. Podczas ogrzewania należy cały czas poruszać próbkę nad płomieniem, aby zawartość była dobrze wymieszana i równomiernie ogrzana.
22. Przy pracach, w czasie których może nastąpić odprysk ciała stałego lub cieczy, należy stosować okulary ochronne.

23. W ćwiczeniach laboratoryjnych nie wolno używać uszkodzonych przyrządów. Odnosi się to szczególnie do nadtłuczonych lub pękniętych naczyń szklanych i porcelanowych.
24. Krany gazowe i wodne po skończonej pracy należy natychmiast zamknąć.
25. Nie można uruchamiać jakiejkolwiek aparatury bez zgody osoby prowadzącej ćwiczenia.
26. Przed przystąpieniem do ważenia student powinien zapoznać się z jej obsługą; po ważeniu należy usunąć pędzelkiem wszelkie zanieczyszczenia.
27. Przed przystąpieniem do pomiarów spektrofotometrycznych student powinien zapoznać się z obsługą aparatu; po zakończeniu pomiaru dokładnie umyć i przepłukać wodą destylowaną kuwety szklane lub kwarcowe, natomiast puste kuwety jednorazowego użytku wyrzucić do kosza.
28. Podczas wirowania prób probówki muszą być idealnie zrównoważone i ustawione naprzeciw siebie, poziom cieczy w próbówce powinien być poniżej 1 cm krawędzi probówki.
29. Podczas sączenia krawędź sączka z bibuły musi znajdować się około 0,5 cm poniżej krawędzi lejka. W celu przesączenia dużej ilości cieczy stosuj sączki pofałdowane.
30. Po zakończeniu ćwiczeń zawsze wymagane jest uporządkowanie miejsca pracy:
 - a) odpady stałe (papier, końcówki do pipet, korki) należy wrzucić do koszy, potłuczone szkło – do specjalnych pojemników;
 - b) stężone kwasy i zasady, zużyte odczynniki, mieszaniny po wykonanych doświadczeniach chemicznych należy wylać do specjalnego zlewu kamionkowego, odkręcić kran i strumieniem wody rozcieńczyć związek, a następnie dokładnie spłukać zlew;
 - c) ustawić na właściwym miejscu szkło laboratoryjne i odczynniki chemiczne;
 - d) sprawdzić czystość stołu laboratoryjnego.
31. Wychodząc z pracowni należy sprawdzić czy są wyłączone wszystkie palniki gazowe i aparaty elektryczne.
32. Po opuszczeniu pracowni student, który wykonywał ćwiczenia laboratoryjne ma obowiązek umyć dokładnie ręce.

3

WYBRANE TERMINY TOKSYKOLOGICZNE

ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*) – maksymalna ilość substancji, która zgodnie z aktualnym stanem wiedzy może być przez człowieka pobierana codziennie z żywnością przez całe życie prawdopodobnie bez negatywnych skutków dla zdrowia.

Bioakumulacja – zdolność organizmów do kumulowania związków toksycznych w tkankach swego ustroju; stężenie tych związków w tkankach może osiągnąć wyższy poziom niż w otaczającym je środowisku.

Biodegradowalność – podatność związku na rozkład chemiczny dokonany przez mikroorganizmy; zdolność do rozpadu związku chemicznego.

Biodostępność – całkowita zawartość zanieczyszczenia w glebie lub osadzie dennym, znajdująca się w stanie wolnym, niebędąca na trwale związana z matrycą, które to zanieczyszczenie jest lub może być pobrane przez organizm.

Biomagnifikacja – procesy zachodzące w ekosystemie, w wyniku których następuje wzrost stężenia substancji toksycznej w organizmie, zajmującym wyższy poziom w łańcuchu zależności troficznych (pokarmowym).

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

Biostężenie – szczególny przypadek bioakumulacji, w której substancja rozpuszczona jest selektywnie pobierana z roztworu wodnego i zatężana w tkance na drodze nieżywniowej.

Biotransformacja – przemiany biochemiczne związków ksenobiotycznych zachodzące w organizmach pod wpływem działania enzymu; występują reakcje fazy I oraz fazy II (reakcje sprzężania).

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 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 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.

Dawka-odpowiedź – zależność pomiędzy dawką a liczbą lub odsetkiem osobników, u których występuje określony skutek.

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

Działanie łączne: niezależne – substancje chemiczne wywołują różne efekty lub wykazują różne mechanizmy działania.

Działanie łączne: sumujące (addytywne) – wielkość efektów lub odpowiedzi powodowanej przez dwie lub więcej substancji chemicznych jest ilościowo równa sumie efektów lub odpowiedzi spowodowanych przez substancje chemiczne podawane pojedynczo.

Działanie łączne: synergistyczne – następuje potęgowanie działania toksycznego jednej substancji chemicznej przez inną substancję, jednocześnie wprowadzoną.

Działanie łączne: antagonistyczne – gdy następuje osłabienie działania substancji toksycznej występującej w obecności innej substancji toksycznej.

Efekt – zmiana biologiczna w organizmie, narządzie lub tkance spowodowana lub związana z narażeniem na substancje chemiczne.

Efekt szkodliwy – nieodwracalna zmiana biologiczna pojawiająca się podczas lub po zakończeniu narażenia. Jest to zaburzenie czynnościowe lub uszkodzenie morfologiczne, które może wpływać na wydolność całego organizmu lub może zmniejszyć jego sprawność w warunkach dodatkowego obciążenia, a także może zwiększyć jego wrażliwość na działanie innych czynników.

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 statystycz-

nie 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.

Narażenie (ekspozycja) – fizyczny kontakt organizmu z czynnikiem chemicznym, fizycznym lub biologicznym, wyrażony stężeniem lub natężeniem i czasem trwania.

Narząd krytyczny – narząd, który jako pierwszy osiąga stężenie krytyczne substancji toksycznej.

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.

Protoksykanty – metaboliczne prekursory substancji toksycznych.

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 krytyczne – stężenie, przy którym zachodzą zmiany czynnościowe komórki odwracalne lub nieodwracalne, niepożądane lub szkodliwe.

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 w ciągu 24 godzin.

Toksyczność ostra (badanie) – polega na ocenie zdolności substancji do wywołania efektu toksycznego po jej podaniu (wchłonięciu) do organizmu w dawce jednorazowej lub po jednorazowym narażeniu. W wyniku badania toksyczności ostrej uzyskuje się informacje o dawce śmiertelnej i wartość medialnej dawki LD_{50} , która jest stosowana do klasyfikacji substancji.

Toksyczność ostra przewlekła/chroniczna (badanie) – polega na podawaniu organizmom testowym substancji badanej codziennie w sposób przerywany lub ciągły w czasie bliskim długości życia danego gatunku i obserwowaniu efektów toksycznych w trakcie narażenia lub po jego zakończeniu. Badanie to ma głównie na celu określenie specjalnych właściwości związku, takich jak działanie rakotwórcze (kancerogenne).

Toksyczność podostra/podprzewlekła/podchroniczna (badanie) – polega na podawaniu organizmom testowym substancji badanej (lub ich eksponowaniu inhalacyjnie) codziennie w sposób przerywany lub ciągły przez 28 dni (toksyczność podostra) lub 90 dni (toksyczność podprzewlekła) i obserwacji efektów toksycznych w trakcie narażenia lub po jego zakończeniu. Celem badania toksyczności podprzewlekłej jest określenie narządów i układów mogących ulegać uszkodzeniu w wyniku działań substancji oraz poziomu narażenia, przy którym nie obserwuje się skutków działania.

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

Toksykokinetyka – ilościowa charakterystyka procesów wchłaniania, rozmieszczania, 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.

Zatrucia ostre – szkodliwe efekty wywołane przez substancję chemiczną wchłoniętą do organizmu w dużej dawce jednorazowej lub stężeniu pojawiają się w stosunkowo krótkim czasie w ciągu 24 godzin.

Zatrucia podostre (podostre) – szkodliwe efekty w organizmie występują w sposób mniej gwałtowny po podaniu jednorazowej lub kilkakrotnej dawki substancji.

Zatrucia przewlekłe – proces chorobowy powstaje w warunkach przewlekłego narażenia na substancję chemiczną.

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 istotne znaczenie w analizie jakościowej i ilościowej. Specyfiką analizy toksykologicznej jest często niepowtarzalność 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:

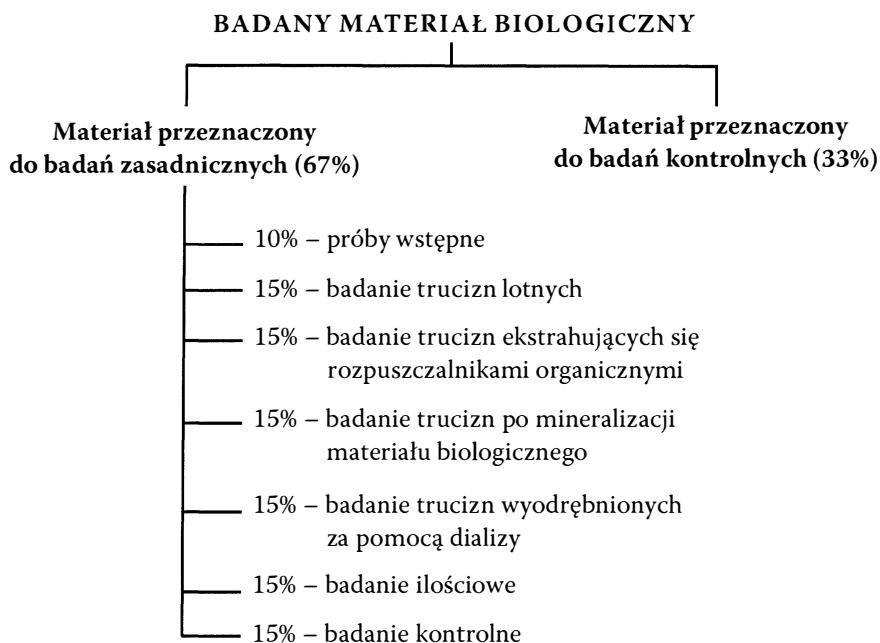
1. trucizny lotne;
2. trucizny rozpuszczalne w wodzie;
3. nielotne trucizny organiczne;
4. trucizny metaliczne.

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.

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 cienkowarstwowa	0,1-20	+++	+	+	-
Chromatografia gazowa	0,01-1	+	+	+++	+
Spektrometria masowa	0,01-1	++++	+++	++++	+
++++, wartość najwyższa					

Materiał biologiczny przeznaczony do analiz toksykologicznych jest zazwyczaj dzielony według schematu przedstawionego na Rycinie 4.1.



Rycina 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 identyfikujących:

- **związki arsenu** – reakcja arsenowodoru z AgNO_3 (zabarwienie żółte) – próba Gutzeita;
- **sole rtęci (I)** – reakcja z 1 M KOH (zabarwienie czarne);
- **sole rtęci (II)** – reakcja z 1 M KOH (zabarwienie żółto-czerwone);
- **morfina** – reakcja z odczynnikiem Marquisa: 1 cm³ stężonego H_2SO_4 i 2-3 krople 40% formaliny (zabarwienie purpurowoczerwone przechodzące w niebiesko-fioletowe);
- **fenol** – reakcja z 2% 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 probówce i ogrzewać aż do wyprażenia. 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, As ₂ S ₃
Szary nalot	Hg, As
Czarny nalot, po potarciu czerwony	HgS
Zapach NH ₃	sole amonowe
Zapach H ₂ S	S
Zapach octu	CH ₃ COO
Białe dymy	SO ₄ ²⁻
Brunatne dymy	NO _x

- pozostałość po wyprażeniu 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
Niebiesko-zielone	Cu
Żółto-zielone	Ba

Zgodnie z przyjętym podziałem trucizn z otrzymanego do badań materiału wyodrębnia się trucizny lotne z parą wodną poprzez desty-

lację 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 wyługować wodą. Z kolejnej porcji materiału izoluje się alkaloidy, leki, pestycydy i inne nietlone, 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: cyjanowódór, 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 (mieszanina 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 dm³. Jeżeli badany materiał ma odczyn obojętny lub alkaliczny zakwasza się 5% roztworem kwasu winowego do odczynu wyraźnie kwaśnego. Postępowanie to ma na celu przeprowadzenie nie-lotnych soli w lotne kwasy. Natomiast, jeżeli odczyn jest kwaśny dodaje się 5% wodny roztwór Na₂CO₃ 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 badanym roztworem do aparatu w celu uniknięcia strat i zapobiegnięcia ewentualnym zmianom zachodzącym 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 cm³ destylatu (**frakcja I**). Dzięki temu obecny cyjanowódór zostanie całkowicie związany w roztworze pochłaniającym.

Następnie zmieniając odbieralniki zebrać kolejne frakcje destylatu o podanych objętościach:

- **frakcja II** – od 20 do 25 cm³;
- **frakcja III** – od 20 do 30 cm³;
- **frakcja IV** – około 30 cm³.

- 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

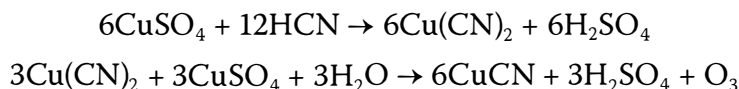
żółtą. Anilina, fenol i krezole powodują zmętnienie destylatu. Większość lotnych trucizn ma charakterystyczny zapach, co pozwala na ich szybką identyfikację.

4.2.1.1. Próba Schönbeina na cyjanki

1/10 badanego materiału o kwaśnym odczynie umieścić w kolbce o pojemności 50 cm³, 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 etanolowym roztworem żywicy gwajakolowej (1:10), wysuszyć. Przed użyciem zwilżyć rozcieńczonym (1:2000) 10% roztworem CuSO₄.

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: HNO₃, HCl, pary chloru i amoniak.

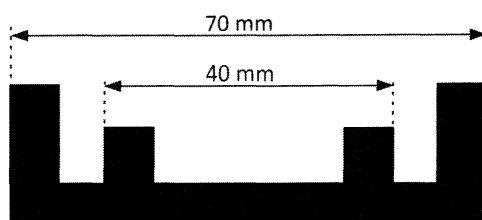
4.2.2. Destylacja z parą wodną z roztworu alkalicznego

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 NaOH lub stałym MgO do pH=10. Destylat zbiera się do odbieralnika, do którego należy wcześniej dodać 5 cm³ 0,1 M roztworu 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 Conway'a (Rycina 4.2) lub kolbach Widmarka, które umożliwiają przenikanie lotnych substancji do roztworu rozpuszczalnika. Metoda ta polega na umieszczeniu w zewnętrznym przedziale naczynka Conway'a 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.



Rycina 4.2. Przekrój poprzeczny przez naczynko Conway'a

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 dodawać substancje, które mają właściwości uwalniania związków toksycznych z nielotnych połączeń. Na przykład cyjanki z postaci nielotnej po zakwaszeniu przechodzą w cyjanowodór, który w tej postaci swo-

badnie dyfunduje do drugiego przedziału naczynka Conway'a, gdzie zostaje związany przez roztwór NaOH.

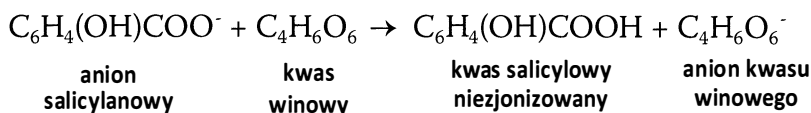
Przebieg procesu mikrodyfuzji może zależeć od następujących czynników:

- 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 węglanu 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: pienie 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 wymienionych 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 probówkowe 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 H_2SO_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 cm³ 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 (kokaina, 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 H₂SO₄ 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 sącdek zwilżony etanolem, przelać do pa-

rownicy 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 cm³, aby wytrącić resztki tłuszczy i żywic, które po odstaniu przesącza się. W miarę potrzeby czynność powtarzać, aż do uzyskania klarownego roztworu wodnego, który po zagęszczeniu do 20 cm³ 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 żółdkowa 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 Na₂CO₃ 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 prowadzi 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 tłuszczów 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 tłuszczów płynnych należy dodać nieco stałej parafiny. Po zakończeniu ekstrakcji ciepły wyciąg alkoholowy przelać do parownicy i oziębic. 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 nietlotnych 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 rozmaitych 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 należy prowadzić przez około 10 minut, zwracając uwagę, aby nie powstała emulsja. Po oddzieleniu wody warstwę rozpuszczalnika suszyć, wytrząsając z odrobiną Na_2SO_4 , przesączyć i odparować do sucha w łaźni wodnej. Suszenie warstwy rozpuszczalnika z Na_2SO_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, meprobramat, kofeina, piramidon, antypiryna, weronal, ewipan, dial, luminal, kolchicyna, 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 NaHCO_3 i wytrząsa kilkakrotnie eterem. Połączone wyciągi eterowe należy osuszyć bezwodnym Na_2SO_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 przez 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

je się kilkakrotnie eterem. W ekstrakcie poza apomorfiną może się znajdować cefalina;

- 6) wiele trucizn w wyniku procesów detoksykacji zachodzących w organizmie ulega wydaleniu z moczem w postaci połączeń z H_2SO_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 $80\text{ }^\circ\text{C}$ przez 15 minut. Następnie oziębic i doprowadzić 1 M NaOH do $\text{pH}=8-9$ i ekstrahować 3-krotnie 30 cm^3 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 cienkowsarstwową), 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 DRAGENDORFFA: 8 g zasadowego azotanu (V) bizmutu (III) rozpuścić w 20 g 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 cm³. **Można zakupić gotowy odczynnik Dragendorffa;**

- 4) **odczynnik Bouchardta** z alkaloidami oraz syntetycznymi związkami miejscowo znieczulającymi tworzy osady żółte lub żółto-brunatne strącające się w kwaśnych roztworach;

ODCZYNNIK BOUCHARDTA: 1 g jodu i 2 g KI rozpuścić w 250 cm³ wody destylowanej.

- 5) **odczynnik Sonnenscheina** tworzy z alkaloidami osady o barwie od biało-żółtej do jasnobrunatnej;

ODCZYNNIK SONNENSCHHEINA: do 10% roztworu Na₂HPO₄ dodać 10% roztwór molibdenianu (VI) amonu w HNO₃. Powstały osad po zdekantowaniu rozpuścić w możliwie jak najmniejszej ilości roztworu Na₂CO₃. Otrzymany roztwór odparować do sucha i wyprażyć do całkowitego pozbycia się amoniaku. Pozostałość rozpuścić w 10-krotnej ilości wody i następnie dodać taką objętość HNO₃ aby tworzący się początkowo osad uległ całkowitemu rozpuszczeniu.

- 6) **5% wodny roztwór kwasu krzemowowolframowego** (H₄SiO₄·12WO₃·2H₂O) 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 postać 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 naświetlanie 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 spalaniu 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 °C. Temperatury poniżej 450 °C mogą nie wystarczyć do pełnego spalania wielu substancji, z kolei temperatura przekraczająca 650 °C może doprowadzić do ulotnienia się i strat wielu związków. Przy prowadzaniu 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 osuszanie i stopniowe ogrzewanie próbki), straty wywołane rozpyleniem próbki (eliminacja przez przykrywanie tygielka przed wyjęciem z pieca mufłowego), 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 KHSO_4) czy straty pierwiastka w wyniku lotności jego związków. Podczas oznaczania cynku często głównym powodem strat tego pierwiastka jest tworzenie ZnCl_2 lotnego już w temperaturze 400 °C. Na lotność tego pierwiastka mają wpływ także inne substancje zawarte w próbce. Znaczne straty $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 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 KNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, K_2SO_4 , które powodują 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 Li_2CO_3 stosuje się 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 grzejnej w temperaturze wrzenia kwasu. Jako substancje utleniające używane są również mieszaniny kwasów lub kwasu z dodatkiem utleniacza: H_2O_2 lub KMnO_4 . Dobór środka utleniającego zależy od rodzaju próbki. W mineralizacji mokrej najczęściej stosuje się mieszaniny kwasów: HClO_4 z HNO_3 , HClO_4 z H_2SO_4 , HNO_3 z H_2SO_4 . Możliwa jest także mineralizacja przy użyciu tylko jednego z tych kwasów. Proces rozkładu z użyciem H_2SO_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 niedogodnień stosuje się go przy mineralizacji organicznych związków krzemu. Stosując HNO_3 należy się liczyć z koniecznością powtórzenia całego procesu mineralizacji z uwagi na niepełne rozłożenie próbki w czasie ogrzewania. Dwustopniowe ogrzewanie próbek z 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 próbek z 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 HNO_3 z HClO_4 . Substancje utleniające mogą być dodawane do próbki jednocześnie lub stopniowo. Najpierw próbka ogrzewana jest z HNO_3 , a następnie z HClO_4 . Pierwszy ze sposobów znalazł zastosowanie przy oznaczaniu rtęci w materiale biologicznym oraz przy mineralizacji włosów. Włosy mineralizowane są mieszaniną spektralnie czystych wymienionych 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 jednostopniową mieszaniną wymienionych kwasów. W pierwszym etapie próbkę ogrzewa się z 2 cm³ HNO_3 , a następnie z 1 cm³ HClO_4 . Dzięki temu w pierwszym etapie są utleniane bardziej reaktywne związki matrycy, zaś pozostałość zawierająca bardzo odporne związki jest rozkładana przez 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, mocz). 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 °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 °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. Próbkę umieszczoną 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 °C, substancja utleniająca: pary HNO₃).

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 mikrofałe – 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 zderzaniu cząstek. Stosując mikrofałe ogrzewanie odbywa się równocześnie w całej objętości próbki. Mikrofałe 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 przez 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 ($\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{HF}$). 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 mikrofal. 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

5.1.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Aceton ($\text{H}_3\text{C-CO-CH}_3$) – 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 drażniącym 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 wydalana jest 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.

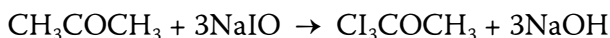
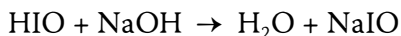
Wartości toksyczne

NDS: 600 mg/m^3 ; NDSCh: 1800 mg/m^3 .
 LD_{50} (doustnie, szczury): 5800 mg/kg ;
 LD_{100} (doustnie, człowiek): 5,34 g/kg .

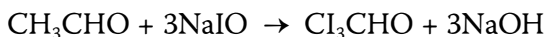
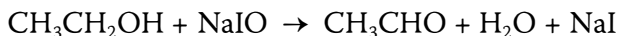
5.1.2. Reakcje charakterystyczne

5.1.2.1. Reakcja jodoformowa Liebena

Do 0,5 cm³ 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.



5.1.2.2. Reakcja Legala

Do 2 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,5 cm³ 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

5.2.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

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.

Działanie szkodliwe

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.

Wartości toksyczne

NDS: 0,5 mg/m³; NDSCh: 1 mg/m³.
 LD₅₀ (doustnie, szczury): 100 mg/kg; LC₅₀ (inhalacja, szczury): 203 mg/m³;
 LD₅₀ (naskórnio, królik): 270 mg/kg; LC₅₀ (96 godzin, naskórnio, pstrąg tęczy): 440 mg/dm³; LC₅₀ (inhalacja, myszy): 0,48 mg/dm³ przez 4 godziny.

5.2.2. Reakcje charakterystyczne

5.2.2.1. Reakcja z kwasem chromotropowym

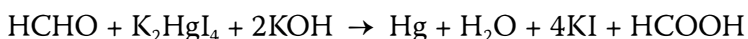
Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,2 cm³ 1% roztworu kwasu chromotropowego (kwas 4,5-dihydroksy-naftaleno-2,7-disulfonowy). Wstrząsnąć i dodać 5 cm³ stężonego H₂SO₄. Po wymieszaniu w obecności aldehydu mrówkowego tworzy się czerwono-fioletowe zabarwienie mieszaniny.

5.2.2.2. Reakcja z tiokolem

Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) wlać delikatnie po ściance próbówki roztwór tiokolu w stężonym H₂SO₄. Na granicy zetknięcia się płynów pojawia się fioletowo-czerwony pierścień świadczący o obecności aldehydu mrówkowego.

5.2.2.3. 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_4^{2-} do HgO , a następnie do metalicznej Hg zgodnie z reakcją:



ODCZYNNIK NESSLERA: 6 g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm³ ciepłej wody i dodać 50 cm³ 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm³, dodać 60 cm³ 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslera.**

5.2.2.4. Reakcja z odczynnikiem Schiffa

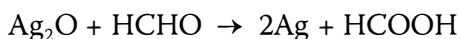
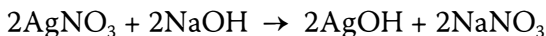
Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm³ 25% roztworu HCl i 2-3 cm³ odczynnika Schiffa. Wymieszać. W przypadku występowania aldehydu mrówkowego w destylacie pojawia się zabarwienie od różowego do czerwono-fioletowego.

ODCZYNNIK SCHIFFA: 1 g krystalicznej fuksyny rozpuścić w 300 cm³ gorącej wody, a po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodać 12,5 g NaHSO_3 rozpuszczonego w 300 cm³ wody, a następnie 10 cm³ 1 M HCl. Całość rozcieńczyć wodą do 1000 cm³. Po kilku godzinach całkowicie bezbarwny odczynnik gotowy jest do użycia. **Można zakupić gotowy odczynnik Schiffa.**

5.2.2.5. Reakcja z azotanem (V) srebra i wodorotlenkiem sodu

Do kilku kropli 10% AgNO_3 dodać kilka kropli 10% NaOH. Powstały osad rozpuścić w 25% roztworze amoniaku. Następnie dodać 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) i podgrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności aldehydu mrówkowego na ściankach próbówki 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.



5.2.2.6. Reakcja Shryvera

1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać do uprzednio przygotowanej mieszaniny składającej się z 2 cm³ 0,5% roztworu chlorowodoru fenylhydrazyny, 1 cm³ 5% heksacyjanożelazianu (III) potasu i 5 cm³ stężonego HCl. Powstałe różowe zabarwienie świadczy o obecności aldehydu mrówkowego w destylacie.

5.2.2.7. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i morfiną

Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać ostrożnie 4 cm³ stężonego H₂SO₄. Delikatnie wymieszać przy jednoczesnym starannym chłodzeniu. Po ostudzeniu po ściance probówki wlewać 0,2 cm³ roztworu morfiny w stężonym H₂SO₄ (0,2 g morfiny w 10 cm³ stężonego H₂SO₄). 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 tego interpretować jako wynik dodatni reakcji.

5.2.3. Analiza ilościowa

5.2.3.1. Oznaczenie ilościowe zawartości aldehydu mrówkowego w badanej próbie

Spośród wielu metod analitycznych użytecznych do oznaczania aldehydu mrówkowego najczęściej jest stosowana metoda kolorymetryczna z kwasem chromotropowym w środowisku kwasu siarkowego i pomiarze absorbancji powstałego kompleksu o zabarwieniu fioletowym przy długości fali 565 nm.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. formalina cz.d.a.;
2. 0,1 M roztwór jodu w jodku potasu;
3. 0,5 M roztwór KOH;
4. 0,5 M roztwór HCl;
5. 0,1 M roztwór tiosiarczanu sodu;
6. 0,5% roztwór skrobi;
7. sól sodowa kwasu chromotropowego (0,25 g soli rozpuścić w 37,6 cm³ wody destylowanej i dodawać powoli, chłodząc mieszaninę, 62,4 cm³ stężonego kwasu siarkowego);
8. wagi analityczne, kolby miarowe ze szlifem, biurety, pipety, pipety Pasteura, łaźnia wodna, spektrofotometr.

WYKRES WZORCOWY: Najpierw należy oznaczyć zawartość aldehydu mrówkowego w formalinie w sposób opisany poniżej. Formalina zawiera od 35 do 40% aldehydu mrówkowego. Odważyć około 1 g formaliny (z dokładnością do 0,001 g) do kolby miarowej o pojemności 100 cm³, uzupełnić wodą i wymieszać. Pobrać 5 cm³ otrzymanego roztworu do kolby stożkowej ze szlifem, dodać 25 cm³ 0,1 M roztworu jodu i 10 cm³ roztworu KOH. Kolbę zamknąć, dokładnie wymieszać i pozostawić na 15 minut. Następnie dodać 10,5 cm³ 0,5 M roztworu HCl i nadmiar jodu miareczkować 0,1 M roztworem tiosiarczanu sodu do chwili odbarwienia mieszaniny, dodając pod koniec miareczkowania roztwór skrobi.

0,5 g formaliny zawierającej 35% aldehydu mrówkowego zużywa 11,7 cm³ roztworu jodu. Zawartość aldehydu mrówkowego (X_f) w formalinie oblicza się ze wzoru:

$$X_f = [(25 - V) \cdot 1,5] / 5 ,$$

gdzie:

- V – objętość zużytego roztworu tiosiarczanu sodu podczas miareczkowania;
- 25 – objętość dodanego roztworu jodu;
- 1,5 – ilość formaldehydu odpowiadająca 1 cm³ roztworu jodu (mg/cm³);
- 5 – rozcieńczenie.

Aby sporządzić krzywą wzorcową, należy do kolby miarowej odmierzyć taką ilość formaliny, która zawiera 1 g aldehydu mrówkowego i uzupełnić wodą do 100 cm³. Następnie 10 cm³ tego roztworu przenieść do kolby miarowej na 100 cm³ i uzupełnić wodą do kreski (roztwór roboczy aldehydu mrówkowego zawiera 0,1 mg aldehydu mrówkowego w 1 cm³). Dokładnie wymieszać. W dniu oznaczenia pobrać 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 5,0 i 10 cm³ roztworu roboczego i przenieść do kolb miarowych na 100 cm³ i uzupełnić wodą. Z każdego roztworu pobrać do próbki po 1 cm³ roztworu. Natomiast do próby ślepej – wodę destylowaną. Dodać 5 cm³ roztworu soli sodowej kwasu chromotropowego w kwasie siarkowym. Dokładnie wymieszać i wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 60 °C na 20 minut. Następnie pozostawić próby w temperaturze pokojowej przez godzinę. Zmierzyć absorbancję prób przy długości fali $\lambda=565$ nm w spektrofotometrze wobec wody. Sporządzić wykres zależności absorbancji od stężenia aldehydu mrówkowego w roztworze.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do próbek chemicznych dodać po 1 cm³ prób badanych, dodać 5 cm³ roztworu soli sodowej kwasu chromotropowego w kwasie siarkowym. Dokładnie wymieszać i wstawić do łaźni wodnej o temperaturze 60 °C na 20 minut. Następnie pozostawić próby w temperaturze pokojowej przez godzinę. Zmierzyć absorbancję prób przy długości fali $\lambda=565$ nm w spektrofotometrze wobec wody. Zawartość aldehydu mrówkowego w próbie badanej odczytać z krzywej wzorcowej.

5.3. Aldehyd trichlorooctowy

5.3.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne	Aldehyd trichlorooctowy [synonim: chloral bezwodny] (CCl_3CHO) – 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.
Działanie szkodliwe	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.
Wartości toksyczne	NDS: nieustalone. Dawka śmiertelna dla człowieka wynosi 8-15 g.

5.3.2. Reakcje charakterystyczne

5.3.2.1. Reakcja izonitrylowa

Do 1 cm³ 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.

5.3.2.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ 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 tetrachlorku węgla lub aldehydu mrówkowego.

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

Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać w nadmiarze 10% roztwór NaOH, a następnie po kropli 5% roztwór CuSO₄, do momentu pojawienia się zmętnienia. W przypadku obecności aldehydu trichlorooctowego nadmiar wodorotlenku miedzi (II) ulega odwodnieniu i tworzy się czerwony osad tlenku miedzi (I).

5.3.2.4. Reakcja z odczynnikiem Nesslera

Do 1 cm³ frakcji IV destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ 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 cm³ ciepłej wody i dodać 50 cm³ 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm³, dodać 60 cm³ 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

5.4.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Alkohol etylowy [synonim: etanol] (C_2H_5OH) – 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_2 i wody.

Stężenie fizjologiczne etanolu we krwi wynosi poniżej 0,01% (0,1 g/dm³ lub 0,1‰), a po spożyciu lub ekspozycji na parę wzrasta. W wyniku spożycia ponad 5 g/dm³ etanolu następuje śpiączka, a nawet – śmierć.

Wartości toksyczne

NDS: 1900 mg/m³.

LD₅₀ (doustnie, szczury): 7060 mg/kg.

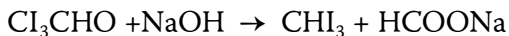
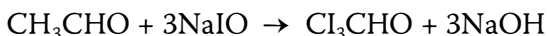
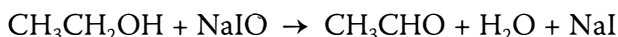
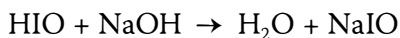
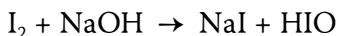
5.4.2. Reakcje charakterystyczne

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.

5.4.2.1. Reakcja jodoformowa Liebena

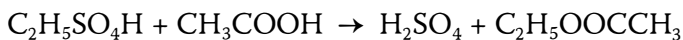
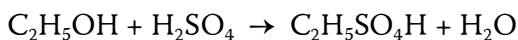
Do części frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli roztworu jodu lub odrobinę sproszkowanego jodu. Następnie dodać

kroplami 10% roztwór NaOH do odbarwienia roztworu lub przynajmniej jasnożółtego zabarwienia. Płyn ogrzewać w łaźni wodnej o temperaturze ≤ 60 °C. W przypadku małych ilości etanolu wydzieli 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.



5.4.2.2. Reakcja estryfikacji

Do 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ stężonego H₂SO₄, 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.



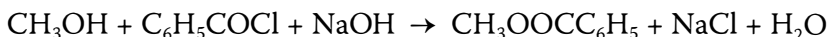
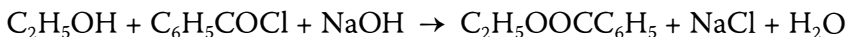
5.4.2.3. Reakcja z dichromianem (VI) potasu

1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ogrzewać z 1 cm³ 10% roztworu H₂SO₄. Następnie dodać 1-2 krople 0,05 M K₂Cr₂O₇. W wyniku obecności etanolu początkowe żółte zabarwienie roztworu zmienia się na zielone. Pojawia się zapach aldehydu octowego. Związki chromu Cr⁶⁺ utleniają etanol do aldehydu octowego, a następnie do kwasu octowego, jednocześnie same redukują się do Cr³⁺. Reakcja ta nie jest specyficzna dla etanolu, wywołuje ją wiele substancji organicznych, które same łatwo utleniają się i jednocześnie redukują kwas chromowy (VI).



5.4.2.4. Reakcja z chlorkiem benzoilu

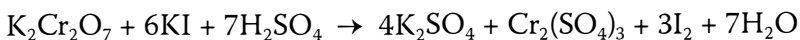
Do 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli wodnego roztworu chlorku benzoilu (C₆H₅COCl). Wymieszać. Następnie kroplami dodawać 10% roztwór NaOH i wstrząsać do momentu zniknięcia duszącego zapachu chlorku benzoilu. W obecności etanolu w destylacie powstaje charakterystyczny zapach estru etylowego kwasu benzooesowego. Zbliżony zapach wykazuje także ester utworzony przez metanol z chlorkiem benzoilu.



5.4.3. Analiza ilościowa

5.4.3.1. Oznaczanie etanolu we krwi metodą Widmarka

W wyniku reakcji dichromianu (VI) potasu z parami etanolu zachodzi utlenianie alkoholu do kwasu octowego i redukcja chromu Cr⁶⁺ do Cr³⁺. Nadmiar dichromianu należy oznaczyć jodometrycznie.



ODCZYNNIKI:

1. roztwór dichromianu (VI) potasu: 0,25 g K₂Cr₂O₇ rozpuścić w 1 cm³ wody i dopełnić w kolbie miarowej do pojemności 100 cm³ stężonym H₂SO₄. Roztwór przygotować wcześniej, co najmniej dwa dni przed użyciem;
2. 0,1 g K₂Cr₂O₇ rozpuścić w 1 cm³ wody i dopełnić w kolbie miarowej do pojemności 100 cm³ stężonym H₂SO₄ (używa się przy mniejszej zawartości alkoholu etylowego we krwi);

3. roztwór tiosiarczanu sodu: 0,25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w kolbie miarowej na 1 dm³, dodać 0,2 g Na_2CO_3 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 cm³ roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, a na łyżeczkę naczynka odmierzyć 0,1-0,15 cm³ krwi i zważyć. W celu uszczelnienia naczynka szlif zwilżyć stężonym H_2SO_4 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 cm³. Następnie dodać 0,5 cm³ roztworu KI i natychmiast miareczkować 0,01 M roztworem tiosiarczanu sodu wobec roztworu skrobi jako wskaźnika. Podobnie, ale bez krwi wykonać 3-krotnie próbę kontrolną dla ustalenia ilości zużytego tiosiarczanu.

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

$$x = \frac{0,113 \cdot (b - a) \cdot 1000}{m},$$

gdzie:

- a – średnia ilość (cm³) zużytego tiosiarczanu sodu potrzebna do miareczkowania próby badanej;
- b – średnia ilość (cm³) zużytego tiosiarczanu sodu potrzebna do miareczkowania próby kontrolnej;
- m – naważka krwi (mg).

Uwagi:

1. Zużycie podczas miareczkowania 1 cm³ 0,01 M tiosiarczanu 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 zafałszowuje wynik analizy.

5.5. Alkohol metylowy

5.5.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Alkohol metylowy [synonim: metanol] (CH_3OH) – 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 szkodliwe

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.

Wartości toksyczne

NDS: 100 mg/m³; NDSCh: 300 mg/m³.
LD₅₀ (doustnie, szczury): 5628 mg/kg;
LC₅₀ (inhalacja, szczury): 64000 ppm/4 godz.;
LD₁₀₀ (doustnie, człowiek): 100 cm³.

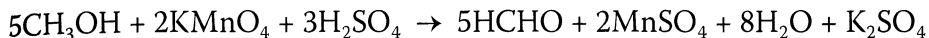
5.5.2. Reakcje charakterystyczne

5.5.2.1. Reakcja estryfikacji

Do 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 4 cm³ stężonego H₂SO₄ i odrobinę sproszkowanego kwasu salicylowego. Następnie ostrożnie podgrzewać 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.

5.5.2.2. Reakcja utleniania metanolu do aldehydu mrówkowego

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



Do 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,2 cm³ H₂SO₄ rozcieńczonego wodą w stosunku 11:1 oraz 2 krople 5% roztworu KMnO₄. Wymieszać. Po 5 minutach nadmiar KMnO₄ 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 cm³ 1% roztworu kwasu chromotropowego (kwas 4,5-dihydroksy-naftaleno-2,7-disulfonowy). Wstrząsnąć i dodać 5 cm³ stężonego H₂SO₄. Po wymieszaniu w obecności metanolu tworzy się czerwono-fioletowe zabarwienie mieszaniny.

b) z tiokolem:

do części utlenionego roztworu dodać delikatnie po ściance próbówki roztwór tiokolu w stężonym H₂SO₄. Na granicy zetknięcia się płynów pojawia się fioletowo-czerwony pierścień świadczący o obecności aldehydu mrówkowego.

5.5.2.3. Reakcja Denigesa

Do 2 cm³ zagęszczonej frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 krople 5% roztworu KMnO₄ i 0,2 cm³ stężonego H₂SO₄. Po dokładnym wymieszaniu próbę odstawić na 3 minuty. Następnie dodawać kroplami nasycony roztwór kwasu szczawiowego w 60% H₂SO₄ do chwili zabarwienia się na kolor jasnożółty. Wówczas dodać 1 cm³ stężonego H₂SO₄, wymieszać i dodać 5 cm³ odczynnika Schiffa. W obecności metanolu powstaje fioletowe zabarwienie.

ODCZYNNIK SCHIFFA: 1 g krystalicznej fuksyny rozpuścić w 300 cm³ gorącej wody, a po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodać 12,5 g NaHSO₃ rozpuszczonego w 300 cm³ wody, a następnie 10 cm³ 1 M HCl. Całość rozcieńczyć wodą do 1000 cm³. Po kilku godzinach całkowicie bezbarwny odczynnik gotowy jest do użycia. **Można zakupić gotowy odczynnik Schiffa.**

5.6. Anilina

5.6.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Anilina ($C_6H_5NH_2$) – oleista, bezbarwna ciecz o nieprzyjemnym, słabym zapachu. Słabo rozpuszcza się w wodzie, natomiast dobrze w etanolu, acetonie, disiarczku węgla i olejach. Barwa brązowa technicznej aniliny wskazuje na obecność zanieczyszczeń w produkcji.

Działanie szkodliwe

Działanie toksyczne aniliny polega na powstaniu małej wartościowej methemoglobiny 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.

Wartości toksyczne

NDS: 5 mg/m³; NDSCh: 20 mg/m³.
LD₅₀ (doustnie, szczury): 250 mg/kg.

5.6.2. Reakcje charakterystyczne

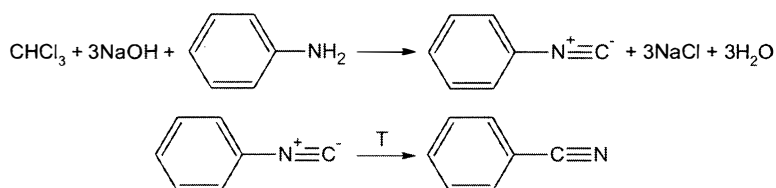
Metody identyfikacji aniliny w badanym materiale opierają się na reakcji utleniania jej do *p*-aminofenolu lub dwuazowania i sprzęgnięcia z odpowiednimi komponentami.

5.6.2.1. Reakcja dwuazowania i sprzęgnięcia z solą R

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm³ roztworu do dwuazowania (jest to 2 M roztwór HCl i 3,5% roztwór NaNO₂ zmieszany bezpośrednio przed użyciem w stosunku 1:2). Próbę dokładnie wymieszać i oziębnić w lodzie do temperatury 0 °C. Następnie należy zobojętnić nasyconym roztworem NaHCO₃ 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.

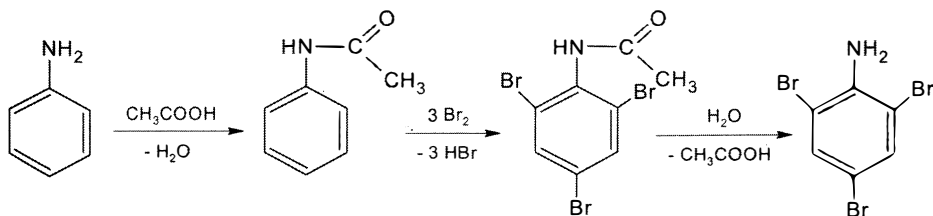
5.6.2.2. Reakcja izonitrylowa

Do 0,5 cm³ 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.



5.6.2.3. Reakcja bromowania

Do 0,5 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli CH₃COOH i 0,5 cm³ wody bromowej i wymieszać. W przypadku obecności aniliny pojawia się osad tribromoaniliny o barwie cielistej. Reakcja ta może być wykorzystana do oznaczeń ilościowych.



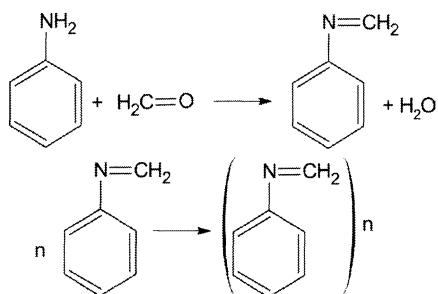
5.6.2.4. Reakcja z kwasem siarkowym (VI) i dichromianem (VI) potasu

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ 10% roztworu H₂SO₄ i parę kropli 0,05 M roztworu K₂Cr₂O₇. Powstaje zielony osad, który następnie przybiera barwę niebieską, a ostatecznie czarną. W ten sposób tworzy się nierozpuszczalny barwnik, zwany czernią anilinową.

5.6.2.5. Reakcja z aldehydem mrówkowym

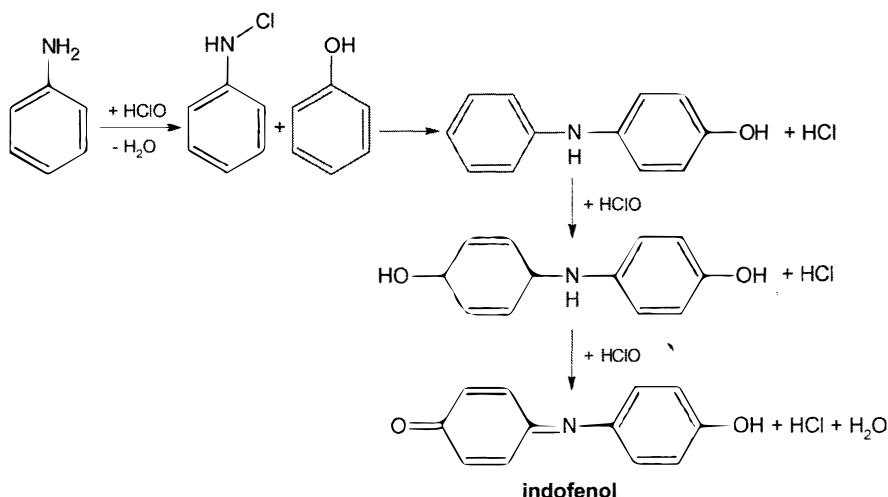
Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ aldehydu mrówkowego. W przypadku obecności aniliny w badanym materiale tworzy się zmętnienie lub biały osad. Jest to produkt kondensacji

aniliny z aldehydem mrówkowym przebiegający zgodnie z reakcją chemiczną:



5.6.2.6. Próba indofenolowa

Do 1 cm^3 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.



5.6.3. Analiza ilościowa

5.6.3.1. 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 feny-

lohidroksylamina oraz *p*-iminochinon, który tworzy z *p*-aminofenolem układ redoks, 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 sprzężaniu z H₂SO₄ 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 cm³ stężonego HCl, po czym uzupełnić w kolbie miarowej wodą destylowaną do 100 cm³);
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 cm³ moczu. Dodać 5 cm³ stężonego HCl i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 1,5 godziny. Po ostudzeniu roztwór przesączyć do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Po wymieszaniu pobrać objętość roztworu (*V*) określoną według wzoru:

$$V = 2 \cdot \frac{24}{n},$$

gdzie: *n* – oznacza tysięczne części ciężaru właściwego badanego moczu.

Następnie roztwór uzupełnić wodą w probówce do 7 cm³. Dodać 1 cm³ 5% roztworu fenolu i 2 cm³ stężonego amoniaku. Dokładnie wymieszać i odstawić próbę na 30 minut do wytworzenia i utrwalenia się barwy. Po tym okresie odczytać absorbancję przy długości fali λ=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 ³)							
wzorzec	0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1,0	1,5
mocz	10	10	10	10	10	10	10	10
stężony HCl	5	5	5	5	5	5	5	5
1 cm ³ hydrolizatu zawiera	0	1	2	3	5	7	10	15
<i>p</i> -aminofenol (μg)								

Zawartość *p*-aminofenolu w próbce badanej odczytać z wykresu wzorcowego, po czym obliczyć stężenie *p*-aminofenolu w badanym moczu uwzględniając, że 1 cm³ rozcieńczonego hydrolizatu pobranego z kolbki miarowej odpowiada 0,1 cm³ 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 wyrażona w μg;

V – objętość hydrolizatu pobranego do oznaczenia (cm³).

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

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

gdzie:

a – stężenie *p*-aminofenolu w moczu μg/cm³;

b – objętość próbki w moczu.

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 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ moczu). Niskie ilości nie przeszkadzają w interpretacji wyniku, ponieważ czułość metody wynosi 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 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

5.7.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Benzen (C_6H_6) – 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 sfingomielinową 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 wiązaniami 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, martwicy lub zwyrodnienia tłuszczowego mięśnia sercowego, wątroby i nadnerczy.

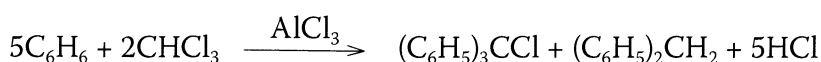
Wartości toksyczne

NDS: 1,6 mg/m^3 .
 LD₅₀ (doustnie, szczury): 930 mg/kg ;
 LC₅₀ (inhalacja, szczury): 10000 ppm/7 godz.

5.7.2. Reakcje charakterystyczne

5.7.2.1. Reakcja Friedela–Craftsa

W probówce umieścić 2 cm³ chloroformu i dodać 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1). Dokładnie wymieszać i wysypać kilka kryształków AlCl₃ jako katalizatora. Zabarwienie roztworu od żółtego do brunatnego wskazuje na obecność benzenu w badanym materiale.



5.7.2.2. Reakcja nitrowania

2-3 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ekstrahować z 2 cm³ chloroformu. Następnie do warstwy chloroformowej dodać 2 cm³ mieszaniny nitrującej (10% roztwór NH₄NO₃ w stężonym H₂SO₄). Silnie wstrząsać przez 2 minuty. Podczas reakcji nitrowania można wyczuć zapach gorzkich migdałów. Mieszaninę ochłodzić i przelać do drugiej probówki zawierającej 2 cm³ wody destylowanej. Zbojętnić stężonym amoniakiem i po wytrząśnięciu oddzielić warstwę chloroformową. Suchą pozostałość uzyskaną po odparowaniu chloroformu rozpuścić w metyloetyloketonie i następnie dodać 1 cm³ 70% roztworu KOH. Powstanie fioletowego zabarwienia w warstwie metyloetyloketonu świadczy o obecności benzenu.

5.7.2.3. Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Do 1 cm³ frakcji II destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 0,5 cm³ 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 cm³ 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm³ stężonego H₂SO₄.

5.7.3. Analiza ilościowa

5.7.3.1. 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_2SO_4 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_2SO_4 cz.d.a.;
2. roztwór buforowy o $\text{pH}=10,15$ (10,5 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ i 2,8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ rozpuścić w 500 cm^3 wody destylowanej);
3. alkoholowy roztwór 2,6-dibromochinonochlorimidu (15 mg związku rozpuścić w 10 cm^3 etanolu).

Do 10 cm^3 badanego moczu dodać 1 cm^3 stężonego H_2SO_4 i destylować z parą wodną z szybkością $10 \text{ cm}^3/\text{min}$. Zebrać 50 cm^3 destylatu. Następnie pobrać 10 cm^3 destylatu do kolbki miarowej o pojemności 25 cm^3 , dodać $2,5 \text{ cm}^3$ roztworu buforowego o $\text{pH}=10,15$ oraz $0,25 \text{ cm}^3$ alkoholowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości 25 cm^3 . Po godzinie zmierzyć absorbancję barwnego roztworu przy długości fali wynoszącej $\lambda=610 \text{ nm}$.

WYKRES WZORCOWY: Do 10 cm^3 próbek moczu fizjologicznego dodać wzrastające ilości roztworu wzorcowego fenolu od 0 do 5 cm^3 . 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 $7 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Stężenie fenolu powyżej $15 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 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 ($\mu\text{g}/\text{godz.}$) zebrany między 6 a 8 godziną od rozpoczęcia ekspozycji:	$x = 27,4 \cdot y$
3. Poziom fenolu w dobowej porcji moczu (μg):	$x = 2,27 \cdot y$

x – wchłonięta dawka benzenu (μg),
y – zawartość fenolu w moczu ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$).

5.8. Chloroform

5.8.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Chloroform (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 bezsenności. 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 niezmienionej, a tylko nieznaczna jego część ulega przemianie, polegającej na odszczepieniu chloru.

Wartości toksyczne

NDS: $8 \text{ mg}/\text{m}^3$.

LD_{50} (doustnie, szczury): $908 \text{ mg}/\text{kg}$;

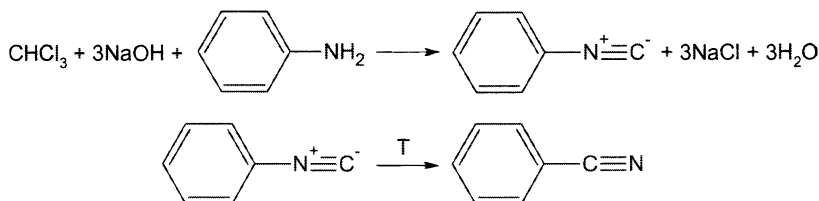
LD_{50} (inhalacja, szczury): $75 \text{ mg}/\text{kg}$.

Doustna dawka śmiertelna dla osoby dorosłej wynosi około 10 cm^3 .

5.8.2. Reakcje charakterystyczne

5.8.2.1. Reakcja izonitrylowa

Do 1 cm³ 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 nityle. Reakcja ta nie jest specyficzna dla chloroformu, bowiem w tych samych warunkach wywołują ją również bromoform, jodoform lub tetrachlorek węgla.



5.8.2.2. Reakcja z rezorcyną i wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ 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.

5.8.2.3. Reakcja Fujiwary

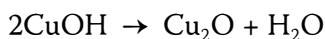
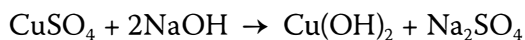
Do 0,5 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 krople pirydyny i kroplę 0,02 M roztworu NaOH. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez kilka minut. Pojawienie się czerwono-fioletowego zabarwienia świadczy o obecności chloroformu. Dłuższe ogrzewanie zawartości próbki powoduje osłabienie barwy lub jej przejście w brązową lub żółtą. Metoda ta pozwala wykryć 1 µg chloroformu w badanym materiale.

5.8.2.4. Reakcja z α -naftolem

1 cm³ α -naftolu rozpuszczonego w stężonym roztworze KOH należy ogrzewać przez 1-2 minuty w łaźni wodnej w temperaturze 50 °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.

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

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać w nadmiarze roztwór NaOH, a następnie po kropli 1% roztwór CuSO₄ 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

5.9.1. Właściwości i toksyczność

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 przemianom 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 ośrodkowego i czynności serca. Prawdopodobnie cyjanki posiadają działanie mutagenne i teratogenne.

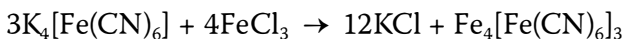
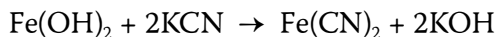
Wartości toksyczne

NDSP: 5 mg/m³ (dla HCN).
LD₅₀ (doustnie, szczury) dla KCN: 5 mg/kg. **Śmiertelna dawka HCN dla człowieka wynosi około 1 mg/kg, KCN: 150-250 mg/70 kg.**

5.9.2. Reakcje charakterystyczne

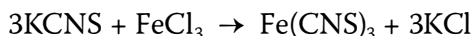
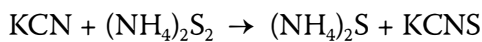
5.9.2.1. Reakcja z siarczanem (VI) żelaza (II) i chlorkiem żelaza (III)

Do 1 cm³ frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę świeżo przygotowanego 0,5% roztworu FeSO₄, dokładnie wymieszać i następnie dodać kroplę 0,5% roztworu FeCl₃. Po wymieszaniu lekko podgrzać i ostrożnie zakwasić 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 próbce. Małe stężenia HCN dają zabarwienie zielone lub niebiesko-zielone, natomiast przy większych jego stężeniach tworzy się niebieski osad błękitu pruskiego. Przy śladowych ilościach HCN zabarwienie powstaje dopiero po upływie 24 godzin.



5.9.2.2. Reakcja z polisiarczkiem amonu

Do 1 cm³ frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1), umieszczonego na szkiełku zegarkowym lub w parownicze, dodać 1 cm³ 5% roztworu polisiarczku amonu i odparować do sucha w łaźni wodnej. Następnie zakwasić 10% roztworem HCl i dodać kroplę 5% roztworu FeCl₃. W przypadku obecności cyjanków powstaje krwistoczerwone zabarwienie. Metoda ta pozwala wykryć 0,1 μg HCN w badanej próbce. W wyniku reakcji cyjanowodoru z polisiarczkiem amonu powstaje tiocyjanian, który z FeCl₃ w środowisku kwaśnym daje krwistoczerwone zabarwienie.



5.9.2.3. Reakcja z kwasem pikrynowym

Do 1 cm³ frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ 5% roztworu Na₂CO₃ oraz 2 cm³ 5% roztworu kwasu pikrynowego. Dobrze wymieszać i ogrzewać w łaźni wodnej przez 5 minut. Po oziębieniu próby powstaje zabarwienie pomarańczowe świadczące o obecności cyjanków w badanym materiale. Próbę należy wykonać jednocześnie z próbą kontrolną (zamiast destylatu do wykonania reakcji użyć wodę destylowaną). Cyjanowodor w reakcji z kwasem pikrynowym w środowisku kwaśnym tworzy kwas pikrocjyaminowy o barwie pomarańczowej.

5.9.2.4. Reakcja z azotanem (V) srebra

1 cm³ frakcji I destylatu (patrz rozdział 4.2.1) zakwasić rozcieńczonym HNO₃ i dodać AgNO₃ w nadmiarze. W obecności cyjanków

w destylacie powstaje biały osad AgCN, który jest łatwo rozpuszczalny w amoniaku.

5.10. Fenol

5.10.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Fenol (C_6H_5OH) 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 $65,7\text{ }^\circ\text{C}$ 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.

Działanie szkodliwe

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 mięsży nerek i serca. Porażenie ośrodka oddechowego przez fenol prowadzi do śmierci.

Wartości toksyczne

NDS: $7,8\text{ mg/m}^3$.
LD₅₀ (doustnie, szczury): 317 mg/kg ; LC₅₀ (inhalacja, szczury): 316 mg/m^3 ; LD₅₀ (naskórnice, szczury): 669 mg/kg .

5.10.2. Reakcje charakterystyczne

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

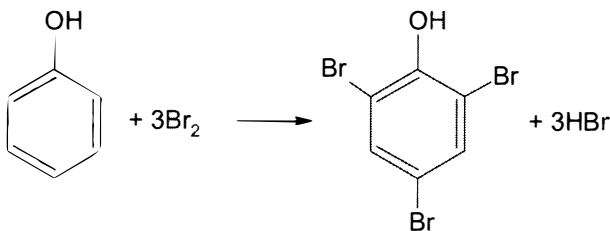
się w roztworze NaOH. W przypadku obecności kwasu salicylowego destylat należy zalkalizować Na_2CO_3 , z którym kwas salicylowy reaguje tworząc sól sodową. Natomiast fenol nie daje tej reakcji z węglanem. Następnie roztwór należy wytrząsać z eterem i odparować w temperaturze pokojowej. Pozostałe w ten sposób tłuste krople o silnym zapachu fenolu rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór służy do wykonania reakcji identyfikacji.

5.10.2.1. Reakcja z 4-aminoatrypiną

Do $0,5 \text{ cm}^3$ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 3 cm^3 wody destylowanej oraz 2-3 krople $0,75 \text{ M}$ 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 $2 \mu\text{g}$ fenolu w badanej próbce.

5.10.2.2. Reakcja z wodą bromową

Do 1 cm^3 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 tribromofenolu o temperaturze topnienia $94 \text{ }^\circ\text{C}$. Tribromopochodne mogą również tworzyć inne związki, takie jak: alkohol etylowy, aldehyd i kwas salicylowy.



5.10.2.3. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ świeżo przygotowanego 2% roztworu FeCl₃. W obecności fenolu występuje zabarwienie niebieskie do niebiesko-fioletowego, które znika po dodaniu etanolu. W przypadku kwasu salicylowego, w odróżnieniu od fenolu, zabarwienie utrzymuje się po dodaniu alkoholu etylowego.

5.10.2.4. Reakcja z 5-nitrozo-8-hydroksychinoliną

1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) zalkalizować 10% roztworem NaOH i odparować do sucha. Oziębić i do otrzymanej w ten sposób pozostałości dodać 3 krople 1% roztworu 5-nitrozo-8-hydroksychinoliny w stężonym H₂SO₄. Lekko ogrzewać w łaźni wodnej. 5-nitrozo-8-hydroksychinolina w postaci oksymu w środowisku stężonego H₂SO₄ 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	czerwono-fioletowa
7 µg pirogallolu	czarna
4 µg pirokatechiny	ciemnozielona
5 µg nitrofenolu	zielono-żółta
5 µg o-krezolu	ciemnobrązowa
5 µg ksylenu	fioletowa
10 µg α-naftolu	ciemnobrązowa

5.10.2.5. Reakcja z odczynnikiem Millona

Do 1 cm³ 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 cm³ stężonego HNO₃ i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

5.10.2.6. Próba Melzera

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 2 cm³ stężonego H₂SO₄ oraz 1-2 krople aldehydu benzoesowego. Następnie próbę zagotować do jednorazowego wrzenia. Roztwór pierwotnie żółtawo-brunatny pod wpływem ogrzewania przyjmuje barwę ciemnoczerwoną. Po oziębieniu dodać 10 cm³ wody destylowanej i zalkalizować 10% roztworem KOH. W obecności fenolu mieszanina barwi się na kolor niebiesko-fioletowy.

5.10.2.7. Reakcja z dwuazowaną *p*-nitroaniliną

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 cm³ odczynnika do sprzęgania (20 cm³ 0,3% roztworu *p*-nitroaniliny zmieszane z 0,75 cm³ 10% roztworu NaNO₂). Po upływie 1 minuty dodać 2 cm³ 20% roztworu Na₂CO₃. Wymieszać. Pojawienie się czerwonego zabarwienia po rozcieńczeniu próby wodą wskazuje na obecność fenolu w destylacie.

5.10.2.8. Reakcja z metawanadanem (IV) amonu

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli świeżo przygotowanego 5% roztworu metawanadanu (IV) amonu w stężonym H₂SO₄. 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:

- a) **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;
- b) **pirokatechina** – barwa intensywnie zielona;

- c) **rezorcyna** – barwa niebieska, a po dodaniu NaOH i KOH – żółta;
- d) **hydrochinon** – barwa brunatnożółta, ponadto tworzy się brunatny osad.

5.11. Ksylen

5.11.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

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*.

Działanie szkodliwe

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.

Wartości toksyczne

NDS (dla mieszanin izomerów ksylenu): 100 mg/m³. **p-ksylen** – LD₅₀ (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; LC₅₀ (inhalacja, szczury): 4550 ppm/4 godz.; **o-ksylen** – LD₅₀ (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; **m-ksylen** – LD₅₀ (doustnie, szczury): 5000 mg/kg; LD₅₀ (naskórnice, królik): 14100 mg/kg.

5.11.2. Analiza ilościowa

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

U ludzi ksylen ulega przemianie głównie przez utlenienie jednej z grup metylowych do kwasów toluilowych (metylobenzoowych), które po połączeniu się z glicyną, H₂SO₄ 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 wyeluować etanolem. Pomiar absorbancji barwnego eluatu wykonuje się przy długości fali $\lambda=470$ nm.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,1 M wodny roztwór HCl;
2. eter etylowy cz.d.a.;
3. 96% etanol;
4. bezwodnik kwasu octowego cz.d.a.;
5. 25% roztwór NH_4OH ;
6. wywoływacz (4 g aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego rozpuścić w 100 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 cm^3 96% alkoholu etylowego);
9. bibuła chromatograficzna Whatman nr 4, komora chromatograficzna.

15 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 cm^3 etanolu. Za pomocą pipety pobrać 0,01 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 NH_4OH

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 Rf: 0,31 dla **kwasy hipurowego** i 0,40 dla **kwasy m-metylohipurowego**. Plamy kwasu m-metylohipurowego po wycięciu wyeluować za pomocą 5 cm³ 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 cm³ moczu fizjologicznego dodawać kolejno: 0,75, 1,5, 2,25, 3,0 i 3,75 cm³ 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 m-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 m-metylohipurowego w moczu zebrany między 6 a 8 godziną ekspozycji:	$x = 2,4 \cdot y$
x – wchłonięta dawka ksyleny (mg),	
y – zawartość kwasu m-metylohipurowego (mg/cm ³).	

5.12. Kwas mrówkowy

5.12.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne	Kwas mrówkowy (HCOOH) – bezbarwna, przezroczysta ciecz o ostrym, drażniącym zapachu. Miesza się z wodą w każdym stunku.
Działanie szkodliwe	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).
Wartości toksyczne	NDS: 5 mg/m ³ ; NDSCh: 15 mg/m ³ . LD ₅₀ (doustnie, szczury): 1100 mg/kg.

5.12.2. Reakcje charakterystyczne

5.12.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5 cm³ wody destylowanej i dodać 1 cm³ 10% roztworu FeCl₃. W razie obecności kwasu mrówkowego roztwór zabarwi się na czerwono.

5.12.2.2. Reakcja z chlorkiem rtęci (II)

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5 cm³ wody destylowanej i dodać 1 cm³ 1% roztworu HgCl₂, wymieszać i ogrzewać do wrzenia w łaźni wodnej. Obecność kwasu mrówkowego spowoduje redukcję chlorku rtęci (II) do chlorku rtęci (I).

5.12.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra

Część osadu powstałego po odparowaniu (patrz rozdział 5.13) rozpuścić w 0,5 cm³ wody destylowanej i dodać 2 cm³ 2% roztworu AgNO₃, który ulega redukcji z wydzieleniem metalicznego srebra, co wskazuje na obecność kwasu mrówkowego.

5.13. Kwas octowy

5.13.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne	Kwas octowy (CH₃COOH) – 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 głośni 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 ³ ; NDSCh: 30 mg/m ³ . LD ₅₀ (doustnie, szczury): 3310 mg/kg; LD ₅₀ (naskórnice, królik): 1060 mg/kg.

5.13.2. Reakcje charakterystyczne

Podczas wykonywania reakcji na identyfikację kwasu octowego w badanym materiale, należy część destylatu, który posiada silnie kwaśny odczyn zobojętnić 5% roztworem Na₂CO₃ 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).

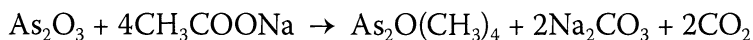
5.13.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu rozpuścić w 0,5 cm³ wody destylowanej i dodać 1 cm³ 10% roztworu FeCl₃. W obecności kwasu octowego roztwór zabarwi się na czerwono.

5.13.2.2. Reakcja z tritlenkiem arsenu (III)

Część osadu powstałego po odparowaniu zmieszać w próbówce 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.



5.13.2.3. Reakcja estryfikacji

Część osadu powstałego po odparowaniu rozpuścić w 0,5 cm³ wody destylowanej i dodać 1 cm³ stężonego H₂SO₄ 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

5.14.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Nitrobenzen (C₆H₅NO₂) – 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/m³; NDSCh: 10 mg/m³. LD₅₀ (doustnie, szczury): 489 mg/kg; LD₅₀ (naskórnice, szczury): 2100 mg/kg.

5.14.2. Reakcje charakterystyczne

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.

5.14.2.1. Redukcja do aniliny

2-3 cm³ 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 cm³ 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).

5.14.2.2. Reakcja z rezorcyną

Część suchej pozostałości przenieść do parowniczk. Zalać stężonym H₂SO₄ i następnie dodać kilka kryształków rezorcyny. Powstanie fioletowego zabarwienia świadczy o obecności nitrobenzenu w badanej próbce.

5.15. Pirydyna

5.15.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Pirydyna (C₅H₅N) – 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, zapaść, narkozę. Działanie przewlekłe objawia się uszkodzeniem wątroby oraz nerek.

Wartości toksyczne

NDS: 5 mg/m³; NDSCh: 30 mg/m³.
LD₅₀ (doustnie, szczury): 891 mg/kg;
LC₅₀ (inhalacja, szczury): 4000 ppm/4 godz.

5.15.2. Reakcje charakterystyczne

5.15.2.1. Reakcja z aniliną i bromocyjanem

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kilka kropli świeżo przedestylowanej aniliny i 0,5 cm³ 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.

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

5.15.2.2. Reakcja z benzydyną

Do 2 cm³ obojętnego lub słabo kwaśnego roztworu frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać 1 g octanu sodu, 0,5 cm³ roztworu bromocyjanu oraz 1 cm³ nasyconego roztworu benzydyny. Dokładnie wymieszać. Następnie odstawić na kilka minut. Pojawienie się czerwonej barwy wskazuje na obecność pirydyny.

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

Do 1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) dodać kroplę 10% roztworu CuSO₄. Kilka razy wstrząsnąć. Następnie dodać kroplę 20% roztworu tiocyjanianu potasu. W przypadku występowania pirydyny w destylacie powstaje zielony osad Cu(C₅H₅N)₂, który bardzo trudno rozpuszcza się w wodzie.

5.15.2.4. Reakcja z 2,4-dinitrochlorobenzenem

1 cm³ frakcji III destylatu (patrz rozdział 4.2.1) ogrzewać w łaźni wodnej z 1 cm³ alkoholowego roztworu 2,4-dinitrochlorobenzenu. Po ostygnięciu i dodaniu do próby 0,5 cm³ 10% roztworu KOH tworzy się barwa czerwono-fioletowa, świadcząca o obecności pirydyny w badanym materiale.

5.16. Toluen

5.16.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Toluen – 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 benzoesowego, 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/m³; NDSC: 350 mg/m³.
LD₅₀ (doustnie, szczury): 636 mg/kg;
LC₅₀ (inhalacja, szczury): 49 g/m³/4 godz.

5.16.2. Analiza ilościowa

5.16.2.1. Oznaczenie zawartości kwasu hipurowego (metabolit toluenu) w moczu

W ustroju toluen jest metabolizowany do kwasu benzoesowego, 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 benzoesowego 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 benzoesowego 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*-aminobenzoesowym i bezwodnikiem octowym.

ODCZYNNIKI:

1. 6 M roztwór wodny HCl;
2. octan etylu cz.d.a.;
3. aldehyd *p*-aminobenzoesowy (roztwór 1,5% w bezwodniku kwasu octowego);
4. chlorek żelaza (III) FeCl₃ (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 cm³ wody zakwaszonej HCl do pH=2).

5 cm³ moczu zakwasić HCl do pH=2 i rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 100 cm³. Pobrać 1 cm³ i poddać ekstrakcji 5 cm³ octanu etylu, wytrząsając próbę w rozdzielaczu przez 1 minutę. Następnie pobrać 1 cm³ ekstraktu i odparować w łaźni wodnej do sucha. Do suchej pozostałości dodać 0,5 cm³ 1,5% roztworu aldehydu *p*-aminobenzoesowego w bezwodniku octowym oraz 0,5 cm³ 0,16% roztworu FeCl₃. Próbę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Oziębic i dodać 4 cm³ 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 cm³. Następnie do każdej probówki dodać 5 cm³ 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:

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

gdzie:

V – szybkość wydalania (mg/cm³).

5.17. Trichloroetylen

5.17.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Trichloroetylen (TRI) – przezroczysta ciecz o zapachu zbliżonym do chloroformu. Dobrze rozpuszcza tłuszcze, farby, emalie, kauczuk.

Działanie szkodliwe

TRI działa depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy, uszkadza mięsień sercowy, wątrobę i nerki. Jest związkami lipofilnym o wysokim powinowactwie do lipidów, który łatwo przenika barierę krew-mózg i kumuluje 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 żółtaczk, osłabienia, upośledzenia wzroku, wystąpienia bólów nerwowych, mięśni i stawów. Bezpośrednie działanie na skórę jest przyczyną stanów zapalnych skóry.

Wartości toksyczne

NDS: 50 mg/m³; NDSch: 400 mg/m³.
 LC₅₀ (inhalacja, szczury): 8000 ppm/4 godz.;
 LD₅₀ (naskórnice, królik): > 29000 mg/kg;
 LD₅₀ (doustnie, szczury): 4920 mg/kg;
 LD₅₀ (doustnie, człowiek): 7000 mg/kg.

5.17.2. Analiza ilościowa

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 wymienionych 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%). W organizmie TRI ulega sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym w postaci, której jest wydalany z moczem. 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 oznaczeniu kwasu trichlorooctowego lub trichloroetanolu w moczu.

5.17.2.1. 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^3 ;
5. roztwór wzorcowy kwasu trichlorooctowego o stężeniu $10 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$.

Do 2 cm^3 moczu dodać 5 cm^3 20% roztworu NaOH. Dobrze wymieszać. Następnie dodać 8 cm^3 pirydyny, ponownie wymieszać i umieścić w łaźni wodnej o temperaturze $70 \text{ }^\circ\text{C}$ na 15 minut. Po tym czasie próbę ochłodzić. Do $7,5 \text{ cm}^3$ pobranej warstwy pirydynowej dodać 3 cm^3 wody destylowanej, wymieszać i zmierzyć absorbancję powstałego czerwono-fioletowego roztworu przy długości fali $\lambda=530 \text{ nm}$.

WYKRES WZORCOWY: Do probówek odmierzyć od 0 do 2 cm^3 roztworu wzorcowego kwasu trichlorooctowego ($0-20 \text{ } \mu\text{g}$) i uzupełnić wodą destylowaną do objętości 2 cm^3 . Dalsze postępowanie jak przy oznaczeniu kwasu trichlorooctowego w moczu. Zawartość kwasu trichlorooctowego w badanej próbce odczytać z wykresu wzorcowego.

5.17.2.2. Oznaczanie zawartości trichloroetanolu

Trichloroetanol wydalany jest z moczem w połączeniu z kwasem glukuronowym w postaci kwasu uruchlorowego. Mocz po hydrolizie z H_2SO_4 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_2SO_4 cz.d.a.;
4. 5 M wodny roztwór NaOH;
5. roztwór podstawowy trichloroetanolu o stężeniu 5 mg/cm^3 ;
6. roztwór wzorcowy trichloroetanolu o stężeniu $250 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$.

Do 100 cm^3 moczu dodać 10 cm^3 stężonego H_2SO_4 i ogrzewać przez godzinę pod chłodnicą zwrotną. Uwolniony po hydrolizie trichloroetanol destylować z parą wodną zbierając 100 cm^3 destylatu (1 cm^3 destylatu odpowiada 1 cm^3 moczu). Następnie pobrać 2 cm^3 destylatu i dodać do niego 5 cm^3 5 M NaOH i 10 cm^3 pirydyny. Dobrze wymieszać. Po wymieszaniu badaną próbkę wstawić do łaźni wodnej o temperaturze $70 \text{ }^\circ\text{C}$ na 15 minut. Po tym czasie próbkę ochłodzić, pobrać z niej 5 cm^3 warstwy pirydynowej i przenieść do probówki z 2 cm^3 wody destylowanej. Po wymieszaniu odczytać absorbancję barwnego roztworu przy długości fali $\lambda=420 \text{ nm}$ 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 $250 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ dla zakresu stężeń 35 i $350 \text{ }\mu\text{g}$ trichloroetanolu w objętości 2 cm^3 . Jednocześnie przygotować próbkę ślepą, zawierającą 2 cm^3 wody destylowanej, zamiast destylatu moczu. Następnie do wszystkich prób dodać 5 cm^3 5 M NaOH i 10 cm^3 pirydyny. Dalej postępować tak jak przy oznaczaniu moczu.

5.17.2.3. 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^3 ;

3. roztwór wodny roboczy kwasu trichlorooctowego o stężeniu $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$;
4. roztwór wodny podstawowy trichloroetanolu o stężeniu $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$;
5. roztwór wodny roboczy trichloroetanolu o stężeniu $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$;
6. roztwór wzorcowy mieszaniny kwasu trichlorooctowego ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i trichloroetanolu ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ zmieszanych w stosunku 1:1);
7. pirydyna cz.d.a.;
8. 10 M wodny roztwór KOH;
9. odczynnik utleniający ($8,9 \text{ g CrO}_3 + 15 \text{ cm}^3 61\% \text{ HNO}_3 + 5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$).

Do $0,5 \text{ cm}^3$ moczu dodać $0,5 \text{ cm}^3$ odczynnika utleniającego i dobrze wymieszać. Probówkę szczelnie zamknąć i próbę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Zawartość próbówki ochłodzić w lodzie i zobojętnić roztworem 10 M KOH, dodać 2 cm^3 KOH i 5 cm^3 pirydyny, wymieszać. Mieszaninę ponownie ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 3 minuty w celu wywołania barwy. Po schłodzeniu (przez 5 minut) pobrać do nowej czystej próbówki 3 cm^3 warstwy pirydynowej, dodać $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu chlorowodoru *p*-toluidyny w kwasie mrówkowym. Pomiar absorbancji wykonać po 30 minutach przy długości fali $\lambda=500 \text{ nm}$ wobec wody destylowanej.

WYKRES WZORCOWY: Do 5 próbek odmierzyć kolejno: 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 i $0,20 \text{ cm}^3$ roztworu wzorcowego (mieszaniny kwasu trichlorooctowego i trichloroetanolu w stosunku 1:1) i uzupełnić moczem fizjologicznym do objętości $0,5 \text{ cm}^3$. 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 próbie.

Do $0,5 \text{ cm}^3$ badanego moczu dodać $0,5 \text{ cm}^3$ odczynnika utleniającego i natychmiast zobojętnić roztworem KOH. Probę ochłodzić w lodzie. Następnie dodać 2 cm^3 10 M KOH i 5 cm^3 pirydyny. Dalsze postępowanie – analogicznie jak przy oznaczaniu całkowitej zawartości związków trichlorowych. Zawartość kwasu trichlorooctowego w badanej próbie odczytać z uprzednio sporządzonego wykresu wzorcowego.

Dysponując wynikami dotyczącymi całkowitej zawartości związków trichloropochodnych oraz zawartości kwasu trichlorooctowego można obliczyć ilość trichloroetanolu w badanej próbie 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. Stwierdzono istnienie prostopadłościowej zależności między stężeniem trichloroetyleny w powietrzu a stężeniem kwasu trichlorooctowego w moczu, np. stężenie trichloroetyleny w powietrzu wynoszące 400 mg/m^3 odpowiada stężeniu kwasu trichlorooctowego w moczu około 160 mg/dm^3 , natomiast przy wartości 50 mg/m^3 trichloroetyleny w powietrzu, stężenie kwasu trichlorooctowego wynosi około 20 mg/dm^3 . 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^3 moczu;
- **narażenie lekkie:** $50\text{-}200 \text{ mg/dm}^3$ moczu;
- **narażenie umiarkowane:** $200\text{-}500 \text{ mg/dm}^3$ moczu;
- **narażenie ciężkie:** powyżej 500 mg/dm^3 moczu.

6

TOKSYKOLOGIA LEKÓW

Lekiem jest każda substancja lub produkt stosowany u ludzi zgodnie ze wskazaniami lekarskimi w celach leczniczych, zapobiegawczych lub diagnostycznych, względnie dla zmodyfikowania czynności fizjologicznych. Dział **toksykologii leków** obejmuje:

- 1) ocenę nowych potencjalnych leków pod względem ich toksyczności i tolerancji, zawierającą testy kliniczne lub przeprowadzane na zwierzętach;
- 2) działania niepożądane (działania uboczne) leków, kombinacji leków i – w szerokim sensie – kosmetyków stosowanych w określonych warunkach;
- 3) ostre i przewlekłe zatrucia lekami przy przedawkowaniu.

Zatrucie lekami stanowi 50-60% ogólnej liczby zatruc. Każdy lek wykazuje **działania niepożądane**, które są dodatkowymi skutkami poza zasadniczym działaniem leczniczym. Natomiast **działanie toksyczne** objawia się po przedawkowaniu leku. Rozróżniamy 3 rodzaje przedawkowania:

- jednorazowe przekroczenie dawki;
- długotrwałe podawanie leku;
- duża częstotliwość podawania leku.

Zatrucie lekiem może nastąpić na skutek bezwzględnego lub względnego przedawkowania. **Bezwzględne przedawkowanie** występuje w wyniku stosowania większych dawek niż dawki lecznicze lub kumulacji leku w organizmie podczas jego długotrwałego podawania.

Względne przedawkowanie występuje wtedy, kiedy dawka leku zostaje zachowana, lecz jest zbyt duża dla danego organizmu. Przyczyn tego stanu może być wiele np. uszkodzona wątroba, niewydolność nerek, osobnicza wrażliwość na lek.

Pozostałe przyczyny zatruc lekami są następujące:

- 1) spożycie leku przeterminowanego zawierającego toksyczne produkty rozpadu;
- 2) leki niewłaściwie wykonane;
- 3) błędne wydanie leku w aptecę;
- 4) pomyłki w szpitalach;
- 5) próby samobójcze.

Czynniki powodujące toksyczność leków:

1. Reakcje alergiczne na lek

Cząsteczki leków lub ich metabolitów mają właściwości haptenu. Po połączeniu z endogennym białkiem powstają antygeny. Dochodzi do uwrażliwienia układu immunologicznego, co prowadzi do objawów skórnych (swędzący rumień, wyprysk, pokrzywka), uszkodzenia układu krwiotwórczego i elementów morfotycznych krwi (niedokrwistość, granulocytopenia, trombocytopenia, agranulocytoza), wstrząsu anafilaktycznego, obrzęku naczyniowego oraz dychawicy oskrzelowej.

2. Odczyny fototoksyczne

Jest to nadwrażliwość na światło objawiająca się oparzeniami słonecznymi.

3. Działanie rakotwórcze

Do potencjalnych czynników rakotwórczych należą środki przeciwnowotworowe, immunosupresyjne, steroidowe, sulfonamidy, pochodne fenylbutazonu i kwasu izonikotynowego, preparaty stosowane w leczeniu nadczynności tarczycy.

4. Działanie teratogenne i embriotoksyczne

Działanie teratogenne to toksyczne działanie leku na zarodek i płód ludzki w okresie organogenezy (3 pierwsze miesiące ciąży), który może powodować wady wrodzone. W drugim okresie ciąży, w okresie rozwoju płodu (pozostałe 6 miesięcy) leki mogą powodować obumarcie płodu, poronienie lub różnego rodzaju uszkodzenia. Jest to działanie embriotoksyczne.

5. Leki przenikające do mleka

W gruczole mlecznym przepływ krwi podczas laktacji jest zwiększony, a duża ilość tkanki tłuszczowej (która sprzyja gromadzeniu się leków) powoduje, że leki mogą z łatwością przenikać do organizmu dziecka wraz z mlekiem matki. Może to doprowadzić do działań niepożądanych i toksycznych.

6. Działanie leków na organizm dziecka

Wiele leków działa silniej na organizm dziecka, ponieważ u noworodków i niemowląt proces biotransformacji ksenobiotyków nie jest w pełni rozwinięty. Zdolność metabolizowania leków zwiększa się z wiekiem dziecka i osiąga pełną sprawność dopiero w okresie dojrzewania.

7. Działanie leków na organizm w wieku podeszłym

Wraz z wiekiem zmniejsza się aktywność enzymów metabolizujących leki w wątrobie. Sprawia to, że leki podane w dawkach typowych dla wieku dojrzałego mogą być dla osób starszych zbyt duże i działać toksycznie.

8. Wpływ płci na działanie leków

Działanie niepożądane i toksyczne leków występuje częściej u kobiet niż u mężczyzn. Kobiety reagują silniej na niektóre leki, np. leki pobudzające o.u.n., leki uspakajające i nasenne.

9. Działanie leków a wysiłek fizyczny

W zależności od przemieszczenia krwi do mięśni może ulec zmianie wchłanianie i dystrybucja leku.

10. Uwarunkowania genetyczne

Czynniki genetyczne mają wpływ na metabolizm leku i sposób odpowiedzi konkretnej osoby. Różnice genetyczne objawiają się często na skutek mutacji genu kodującego enzym odpowiedzialny za metabolizm leku. Jeżeli brakuje enzymów uczestniczących w detoksykacji leku lub nie funkcjonują one poprawnie, to osoba z taką dysfunkcją może zostać otruta normalną dawką leku lub wykazywać odmienną reakcję na lek.

11. Stan patologiczny narządów i układów

Choroby wątroby i nerek znacznie utrudniają proces detoksykacji i wydalanie leków. Przedłuża to biologiczny okres półtrwania leku, zwiększa działanie oraz ryzyko wystąpienia objawów toksycznych.

12. Interakcja leków

Zatrucia lekami są często spowodowane stosowaniem kilku leków naraz. Wzajemne oddziaływanie związków chemicznych wewnątrz układu biologicznego może doprowadzić do zwiększenia siły działania leku, aż do wystąpienia działań niepożądanych oraz toksycznych. W wyniku interakcji leków może dojść do powstania chorób polekowych, np. wstrząs hipoglikemiczny, zapaść, przełomy nadciśnieniowe, choroba wrzodowa, skazy krwotoczne, uszkodzenia wątroby i szpiku kostnego.

13. Uzależnienia lekowe

Jest to taki sposób używania leków, który cechuje: niepoahamowana chęć ciągłego ich przyjmowania, konieczność zabezpieczenia dostępu do nich i duże ryzyko nawrotu przyjmowania po ich odstawieniu.

W niniejszym rozdziale zostały zaprezentowane metody identyfikacji związków chemicznych (naturalnych i syntetycznych) stosowanych powszechnie jako leki o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym, przeciwzapalnym oraz psychotropowym. Związki te pod względem właściwości fizykochemicznych należą do nielotnych trucizn organicznych. Sposób izolacji i oczyszczania tych związków został szerzej omówiony w rozdziale 4.4.

Należy pamiętać, że każdy środek leczniczy stosowany niezgodnie z zaleceniami lekarza może stać się trucizną.

6.1. Kwas salicylowy

6.1.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Kwas salicylowy (Rycina 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 naj słabiej w chloroformie.

Działanie farmakologiczne

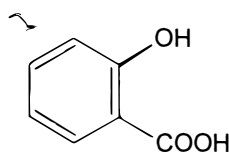
Niesteroidowy lek przeciwbólowy, przeciwzkrzepowy, przeciwzapalny, przeciwgorączkowy.

Działanie szkodliwe

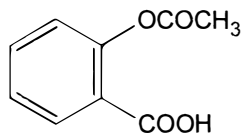
Wywołuje pobudzenie czynności układu oddechowego, zaburza czynności nerek, powoduje sinicę, wymioty, zawroty głowy, senność, zaburzenia koordynacji, czasem zgon.

Dawka śmiertelna dla człowieka

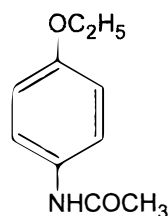
Salicylany (doustnie): 25-35 g.



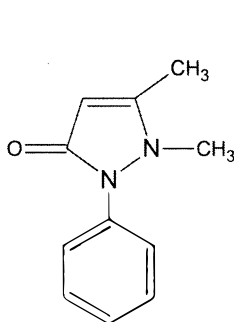
kwas salicylowy



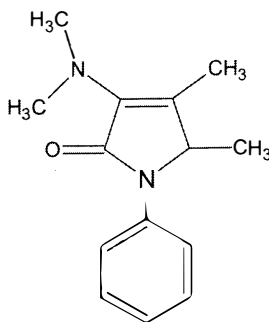
kwas acetylosalicylowy
(Aspiryna, Polopiryna)



fenacetyna



fenazon
(Antypiryna)



aminofenazon
(Piramidon)

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

6.1.2. Reakcje charakterystyczne

6.1.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

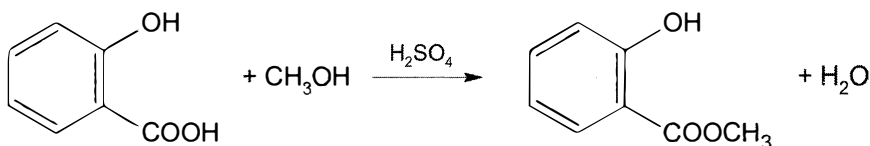
Do 0,5 cm³ badanego roztworu dodać 0,5 cm³ 10% roztworu FeCl₃. Wymieszać. Pojawienie się fioletowego zabarwienia świadczy o obecności kwasu salicylowego. W odróżnieniu od fenolu fioletowa barwa nie znika po dodaniu etanolu.

6.1.2.2. Reakcja z wodą bromową

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ nasyconego roztworu wody bromowej. Pojawienie się białego osadu tribromofenolu z równoczesnym wydzieleniem ditlenku węgla wskazuje na obecność kwasu salicylowego.

6.1.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym

0,5 cm³ badanej próby odparować. Do suchego osadu dodać 1 cm³ metanolu oraz 4 cm³ stężonego H₂SO₄. Ogrzewać do temperatury 60 °C. W przypadku obecności kwasu salicylowego można wyczuć charakterystyczny zapach metylowego estru kwasu salicylowego.



6.1.2.4. Reakcja z kwasem azotowym (V)

0,5 cm³ badanego roztworu ogrzewać z 1 cm³ 10% roztworu HNO₃. Roztwór barwi się na żółto wskutek powstania kwasu nitrosalicylowego.

6.1.2.5. Reakcja Salfa

Sporządzić 1 cm³ mieszaniny składającej się z równych części stężonego H₂SO₄ i 40% aldehydu mrówkowego. Do mieszaniny dodać 0,5 cm³ badanego roztworu, a następnie kilka mg metawanadanu (IV) amonu. W obecności kwasu salicylowego powstaje błękitne zabarwienie przechodzące w niebiesko-zielone, a później w zielone. Reakcja ta jest swoista i pozwala na wykrycie kwasu salicylowego w mieszaninie fenoli, krezoli i saligeniny.

6.1.2.6. Wykrywanie salicylanów w moczu

Pochodne kwasu salicylowego (salicylany) wchłaniają się dobrze z przewodu pokarmowego, a po 10 minutach od pobrania doustnego we krwi znajduje się około 50% podanej dawki. Przenikają łatwo do tkanek i płynów ustrojowych. Są metabolizowane w wątrobie. Wydalają się głównie przez nerki. W ciągu 24 godzin wydalą się około 40-50% dawki, natomiast pozostała ilość w ciągu następnych 4-5 dni. Celem ćwiczenia jest wykrycie obecności salicylanów w moczu.

Z bibuły wyciąć 2 krążki o średnicy 3-4 cm. Zanurzyć je w 96% alkoholu etylowym na 1 godzinę. Następnie przenieść krążki na suchą szalkę i wysuszyć w cieplarni w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Przenieść krążki do 5% roztworu FeCl₃ na 30 minut. Po tym czasie ponownie wysuszyć krążki w cieplarni. Tak przygotowane krążki można od razu wykorzystać do oznaczenia lub przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu z ciemnego szkła.

Na uprzednio przygotowany krążek bibuły nanieść 1 kroplę badanego moczu. Narysuj w zeszycie uzyskany wynik. Na podstawie uzyskanej barwy wyciągnij wnioski na temat obecności salicylanów w badanym moczu.

6.2. Kwas acetylosalicylowy

6.2.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Kwas acetylosalicylowy (Aspiryna, Polopiryna) (Rycina 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.

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.

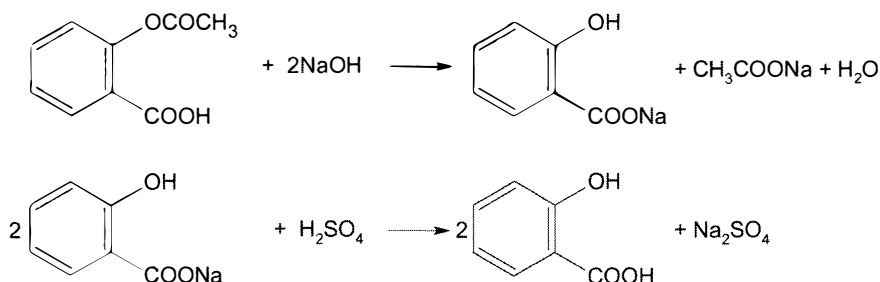
Dawka śmiertelna dla człowieka

Salicylany (doustnie): 25-35 g.

6.2.2. Reakcje charakterystyczne

6.2.2.1. 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 H₂SO₄. 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).



6.2.2.2. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Do 0,5 cm³ badanego roztworu dodać 0,5 cm³ 10% roztworu FeCl₃. Wymieszać. Pojawienie się fioletowego zabarwienia świadczy o obecności kwasu acetylosalicylowego.

6.2.2.3. Reakcja z alkoholem metylowym

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ nasyconego roztworu wody bromowej. Pojawienie się białego osadu tribromofenolu z równoczesnym wydzieleniem ditlenku węgla wskazuje na obecność kwasu acetylosalicylowego.

6.2.2.4. 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 niebiesko-zielony.

6.3. Fenacetyna

6.3.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Fenacetyna (Rycina 6.1) to 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.

Działanie farmakologiczne

Lek przeciwbólowy, przeciwgorączkowy, przeciwzapalny.

Działanie szkodliwe

Zastosowanie dużej dawki Fenacetyny powoduje niedotlenienie organizmu spowodowane zwiększonym tworzeniem methemoglobiny. Konsekwencją wpływu Fenacetyny na procesy oksydo-redukcyjne krwinek jest sinica i hemoliza krwinek.

Dawka śmiertelna dla człowieka

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

6.3.2. Reakcje charakterystyczne

6.3.2.1. Reakcja z kwasem chromowym (VI)

0,5 cm³ badanego roztworu ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut z 3 cm³ stężonego HCl. Dodać 5-10 cm³ 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.

6.3.2.2. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Do 1 cm³ badanej próby dodać 2 cm³ 10% roztworu HNO₃. 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.

6.3.2.3. Reakcja estryfikacji

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 2 cm³ stężonego H₂SO₄ i 1 cm³ etanolu. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku występowania fenacetyny w badanym materiale wydziela się charakterystyczny zapach estru etylooctowego.

6.3.2.4. Reakcja indofenolowa

Badaną substancję ogrzewać z 1 cm³ 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. Wytrząsać. 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 przez reakcję z fenolem w środowisku amoniakalnym tworzy się indofenol.

6.3.2.5. Reakcja dwuazowania i sprzęgania z β -naftolem

Część eterowego ekstraktu odparować do sucha. Pozostały osad przenieść do próbki i dodać 10% roztwór HCl. Ogrzewać do wrzenia. Następnie oziębic w lodzie do temperatury 0 °C i dodać kroplami 1% roztwór NaNO₂ do momentu, gdy zwilżony nim papierek jodoskrobiowy zabarwi się na niebiesko wskutek wydzielania jodu w nadmiarze HNO₃. Wówczas do roztworu dodać 1 cm³ zasadowego roztworu β -naftolu (0,5 g β -naftolu w 1 cm³ 15% roztworze NaOH + 9 cm³ wody). W przypadku obecności fenacetyny powstaje czerwone zabarwienie lub czerwony osad.

6.3.2.6. Reakcja z wodorotlenkiem potasu

Do 1 cm³ badanej próby dodać 5 cm³ 1 M roztworu KOH. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności fenacetyny wydzielają się zapach aniliny. Jeżeli otrzymaną mieszaninę ogrzewa się z kilkoma kroplami chloroformu – wydzielą się nieprzyjemny zapach izonitrylu. W celu usunięcia zapachu izonitrylu można dodać do próby rozcieńczony H₂SO₄ i ogrzewać do wrzenia.

6.4. Fenazon

6.4.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Fenazon (Antypiryna) (Rycina 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.

Wartości szkodliwe

Zwiększone dawkowanie tego leku może prowadzić do chemicznej karcenogenezy.

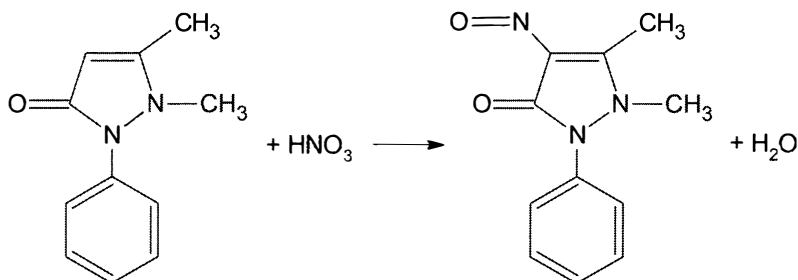
6.4.2. Reakcje charakterystyczne

6.4.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Odrobinę badanego osadu rozpuścić w 0,2 cm³ wody i dodać 0,5 cm³ 1% roztworu FeCl₃. Wymieszać. Pojawienie się krwistoczerwonego zabarwienia przechodzącego po dodaniu kilku kropli 10% roztworu H₂SO₄ w jasnożółte świadczy o obecności fenazonu.

6.4.2.2. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Niedużą ilość badanego osadu przenieść do próbki i dodać kilka kropli 10% roztworu H₂SO₄. Następnie dodać 3-4 krople 3,5% roztworu NaNO₂ i wymieszać. Próba zabarwia się na kolor zielony (nitrozoantypiryna) w przypadku występowania fenazonu.



6.4.2.3. Reakcja z taniną

Do badanego osadu dodać 1 cm³ roztworu taniny i wymieszać. Obfity biały osad wskazuje na obecność fenazonu.

6.4.2.4. Reakcja z odczynnikiem Millona

Odrobinę badanego osadu rozpuścić w 0,4 cm³ 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 cm³ stężonego HNO₃ i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

6.4.2.5. 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

6.5.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Aminofenazon (Piramidon) (Rycina 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.

Działanie farmakologiczne

Lek przeciwgorączkowy, przeciwbólowy.

Wartości szkodliwe

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.

6.5.2. Reakcje charakterystyczne

6.5.2.1. Reakcja z chlorkiem żelaza (III)

Odrobinę osadu rozpuścić w 0,5 cm³ wody i do otrzymanego roztworu dodać niewielką ilość 1% roztworu FeCl₃. W przypadku obecności aminofenazonu pojawia się czerwone zabarwienie (przy większej ilości odczynnik – fioletowe), znikające pod wpływem nadmiaru odczynnika.

6.5.2.2. Reakcja z azotanem (V) srebra

Odrobinę osadu rozpuścić w niewielkiej ilości wody i dodać rozcieńczonego roztworu AgNO_3 . Zaobserwować tworzenie się zabarwienia fioletowego i po pewnym czasie wydzielenie się czarnego metalicznego osadu.

6.5.2.3. Odróżnienie fenazonu od aminofenazonu

Do badanego roztworu dodać roztwór NaNO_2 i zakwasić rozcieńczonym H_2SO_4 . 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

6.6.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Barbiturany (Rycina 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: cyklobarbitał (fanodorm), fenobarbitał (luminal), metylofenylobarbitał (prominal), allobarbitał (dial), heksobarbitał (evipan), barbitał (veronal).

Działanie farmakologiczne

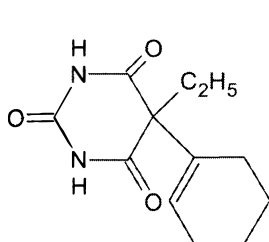
Barbiturany szybko wchłaniają się przez błony śluzowe przewodu pokarmowego. W krwiobiegu występują w krwinkach czerwonych, w postaci wolnej lub związanej z białkami. Posiadają działanie nasenne, uspokajające i znieczulające. Są składnikami wielu środków przeciwbólowych.

Działanie szkodliwe

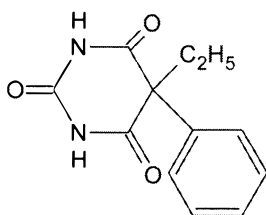
Długotrwałe stosowanie barbituranów prowadzi do silnego uzależnienia (działanie narkotyczne), zaburzeń psychicznych, zaburzeń czynności układu autonomicznego, śpiączki, podrażnień skórnych, uszkodzeń narządów mięszzowych, porażenia ośrodka oddechowego i naczyniowo-ruchowego, a nawet wstrząsu.

Dawka śmiertelna dla człowieka

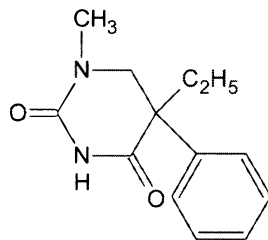
Cyklobarbitał (doustnie): 2-20 g; fenobarbitał (doustnie): 1,5-5 g; metylofenylobarbitał (doustnie): 2 g; allobarbitał (doustnie): 2 g; heksobarbitał (doustnie): 2 g; barbitał (doustnie): 2-4 g.



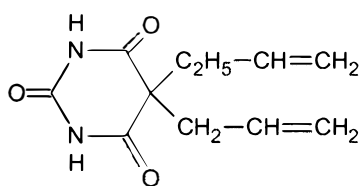
cyklobarbitol
(fanodorm)



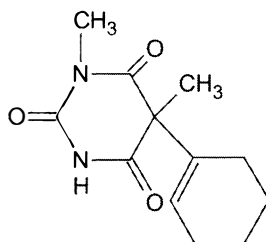
fenobarbital
(luminal)



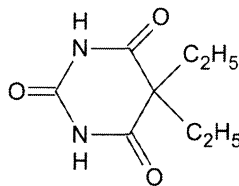
metylofenobarbital
(prominal)



allobarbitol
(dial)



heksobarbital
(evipan)



barbital
(veronal)

Rycina 6.2. Wzory strukturalne wybranych barbituranów

6.6.2. Reakcje charakterystyczne

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
Allobarbitol	pomarańczowy	pomarańczowy	pomarańczowo-czerwony	jasnobrunatny	–	wiśniowo-brunatny
Cyklobarbitol	brunatnoczerwony	fioletowobrunatny	czerwony	brunatnoczerwony	–	brązowobrunatny
Fenobarbital	zielonobrunatny	ciemnozielony	–	–	–	–
Heksobarbital	–	jasnobrunatny	ciemnoczerwony	ciemnobrunatny	–	brązowobrunatny
Metylofenobarbital	oliwkowozielony	ciemnozielony	–	–	–	–

Odczynnik Marquisa: 0,2 cm³ 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm³ stężonego H₂SO₄.

Odczynnik Meckiego: 50 mg kwasu selenowego (IV) rozpuścić w 10 cm³ stężonego H₂SO₄.

6.6.2.1. Reakcja hydrolizy do amoniaku

Barbiturany z podstawionymi atomami wodoru przy grupie $-\text{CH}_3$, ulegają hydrolizie do mocznika pod wpływem KOH. Do niewielkiej ilości badanego osadu dodać $0,3 \text{ cm}^3$ 5% roztworu KOH i podgrzać. Zapach amoniaku lub zabarwienie się na niebiesko zwilżonego papierka lakmusowego świadczy o obecności barbituranów.

6.6.2.2. Reakcja tiocyjanianowa

Barbiturany stapiane z siarką dają jon tiocyjanianowy, który w środowisku kwaśnym przechodzi w kwas tiocyjanianowy. 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_3 . Podczas ogrzewania bibuła barwi się na krwistoczerwono, wskazując na obecność barbituranów.

6.6.2.3. Reakcja Zwickera

Niewielką ilość substancji rozpuścić w mieszaninie chloroformu i piperydyny (9:1) i dodać 1 cm^3 1% roztworu $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. Pod wpływem obecnych barbituranów warstwa chloroformowa barwi się na fioletowo.

6.6.2.4. Reakcja z odczynnikiem Millona

Do $0,5 \text{ cm}^3$ 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^3 stężonego HNO_3 i rozcieńczyć 2-krotną objętością wody destylowanej.

6.6.2.5. Reakcja z chlorkiem sodu

Niewielką ilość substancji rozpuścić w małej objętości wody destylowanej. Przełąć do parowniczkii i dodać 30 cm^3 1% roztworu NaCl w 3% roztworze H_2O_2 . Odparować. Powstanie purpurowego zabarwienia wskazuje na występowanie barbituranów.

6.7. Meprobamat

6.7.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

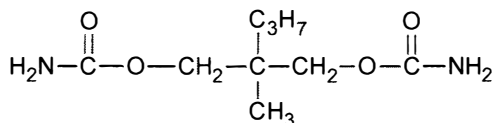
Meprobamat (Rycina 6.3) – biały, drobnokrystaliczny proszek o gorzkim smaku. Dobrze rozpuszcza się w etanolu, chloroformie, natomiast trudno w eterze i wodzie.

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.

Wartości szkodliwe

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



Rycina 6.3. Wzór strukturalny meprobamatu

6.7.2. Reakcje charakterystyczne

6.7.2.1. Reakcja z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem

Niewielką ilość substancji ogrzewać przez 15 minut we wrzącej łaźni wodnej z 3 cm³ stężonego H₂SO₄ zawierającego 2,5% roztwór *p*-dimetyloaminobenzaldehydu. Oziębicić. W przypadku obecności meprobamatu powstaje czerwono-fioletowe zabarwienie, które po rozcieńczeniu wodą zmienia się na niebiesko-fioletowe.

6.8. Kofeina

6.8.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Kofeina (Rycina 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

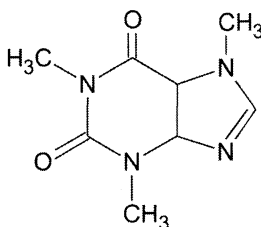
Kofeina posiada działanie stymulujące ośrodkowy układ nerwowy oraz działa spazmolityczne na mięśnie gładkie, szczególnie oskrzeli, powoduje zwiększoną kurczliwość włókien mięśniowych mięśnia sercowego, nasila diurezę oraz wykazuje aktywność pobudzającą pracę umysłową i czynności psychiczne. Lecnicze dawki kofeiny pobudzają ośrodek oddechowy, naczyniowo-ruchowy, ośrodek przemiany materii (nasilenie glikolizy i lipolizy) oraz ośrodek termoregulacji (podwyższenie temperatury ciała), znosząc 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, częstomoc, wzmożoną potliwość, wymioty, owrzodzenie żołądka (zatrucia przewlekłe). Powoduje uzależnienie

Dawka śmiertelna dla człowieka

10-12 g kofeiny (doustnie).



Rycina 6.4. Wzór strukturalny kofeiny

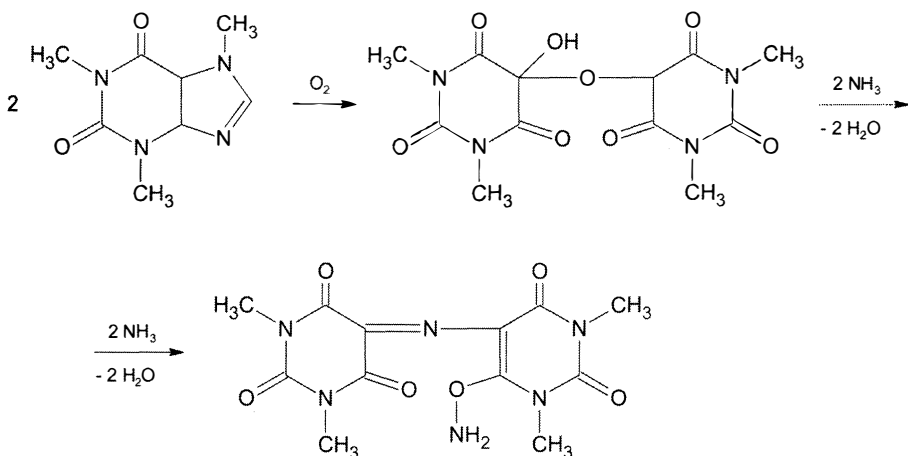
6.8.2. Reakcje charakterystyczne

6.8.2.1. 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.

6.8.2.2. Reakcja z taniną

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



6.8.2.3. Reakcja z odczynnikiem Nesslera

Do niedużej ilości badanego osadu dodać 2 cm^3 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^3 ciepłej wody i dodać 50 cm^3 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm^3 , dodać 60 cm^3 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

6.9.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Chloropromazyna (Rycina 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

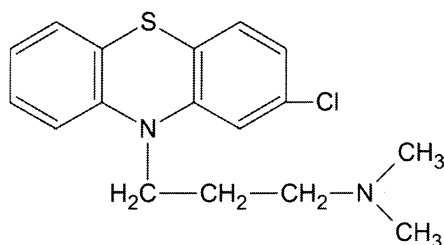
Lek psychotropowy o działaniu uspokajającym oraz wpływającym na nastrój, stosowany w leczeniu poważnych schorzeń psychiatrycznych głównie schizofrenii i psychoz maniakalno-dypresyjnych, przebiegających z objawami silnego pobudzenia i agresji. Wykazuje również właściwości przeciwwymiotne i przeciwhistaminowe,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

Działanie szkodliwe

Wywołuje uzależnienie i poważne schorzenia neurologiczne.

Dawka śmiertelna dla człowieka

1-10 g chloropromazyny (doustnie).



Rycina 6.5. Wzór strukturalny chloropromazyny

6.9.2. Reakcje charakterystyczne

6.9.2.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI)

Chloropromazyna ze stężonym H_2SO_4 daje ciemniejsze karminowe zabarwienie.

6.9.2.2. Reakcja z odczynnikiem Marquisa

Odczynnik Marquisa z chloropromazyną barwi się na karminowo.

ODCZYNNIK MARQUISA: 0,2 cm³ 37% roztworu aldehydu mrówkowego rozpuścić w 10 cm³ stężonego H₂SO₄.

6.9.2.3. Reakcja z odczynnikiem Fröhdego

Odczynnik Fröhdego z chloropromazyną barwi się na kolor karminowy.

ODCZYNNIK FRÖHDEGO: 50 mg kwasu molibdenowego (II) lub molibdenianu (VI) amonu rozpuścić na gorąco w 10 cm³ stężonego H₂SO₄.

6.9.2.4. Reakcja z kwasem azotowym (V)

Chloropromazyna w reakcji ze stężonym HNO₃ daje zabarwienie czerwone, przechodzące w żółte.

6.9.2.5. Reakcja z wodą bromową

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

6.10. Weratryna

6.10.1. Właściwości i toksyczność

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).

6.10.2. Reakcje charakterystyczne

6.10.2.1. Reakcja z kwasem siarkowym (VI)

Stężony H_2SO_4 barwi weratrynę na żółto. Po ogrzaniu barwa pogłębia się w pomarańczowoczerwoną z zieloną fluorescencją.

6.10.2.2. 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^3 stężonego H_2SO_4 .

6.10.2.3. 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^3 stężonego H_2SO_4 .

6.10.2.4. Reakcja z kwasem solnym

Weratryna ogrzewana ze stężonym HCl daje czerwonościowe, trwałe zabarwienie.

6.10.2.5. Reakcja z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem

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

6.11. Wykrywanie leków 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 rozdzielenie 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 umożliwi 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:

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

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 $0,02 \text{ cm}^3$ 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 stronie płytki. Po dokładnym wysuszeniu, płytki wkłada się do komory chromatograficznej.

3. 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. Komory nie należy pozostawiać w miejscach nasłonecznionych i przewiewnych, aby zapobiec wyparowaniu lotnych rozpuszczalników i wydłużeniu rozwijania chromatogramu.

4. 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 kolodiu 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 cm³ moczu zalkalizować 10% NaOH do pH=10 i 2-krotnie wyekstrahować za pomocą 30 cm³ 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:

1. układ rozpuszczalników: aceton – cykloheksan (w stosunku 15:12);
2. wywoływacz: 2 g FeCl₃ i 100 g K₃Fe(CN)₆ rozpuścić na gorąco w 20 cm³ wody destylowanej; 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 cm³ moczu zakwaszyć 1 M HCl do pH=3-4 i 2-krotnie ekstrahować za pomocą 30 cm³ 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 NH₄OH (45:45:10);
- wywoływacz:
 - roztwór I: 5 g HgO zawiesić w 100 cm³ wody destylowanej i dodać stężonego H₂SO₄. Uzupełnić wodą do 250 cm³;
 - roztwór II: 25 g difenylkarbazonu (II) rozpuścić w 250 cm³ 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

IDENTYFIKACJA WYBRANYCH TRUCIZN METALICZNYCH

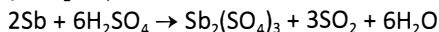
Najczęściej spotykane zatrucia spowodowane są związkami metali takich jak: ołów, kadm, rtęć, arsen, bar, tal, antymon, miedź czy bizmut. W analizie toksykologicznej oznaczanie trucizn metalicznych możemy sprowadzić do następujących etapów: 1) mineralizacji materiału biologicznego; 2) identyfikacji i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

7.1. Antymon

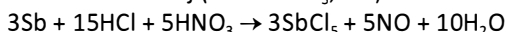
7.1.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

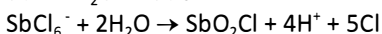
Antymon (Sb) jest błyszczącym srebrzystobiałym metalem. Na powietrzu powoli utlenia się. Na gorąco antymon rozpuszcza się w stężonym H_2SO_4 :



oraz w wodzie królewskiej ($\text{HCl} - \text{HNO}_3$, 3:1):



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



Efekty toksyczne u człowieka

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, uszkadza mięsień sercowy i wątrobę.

Efekty toksyczne u roślin

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

Wartości toksyczne

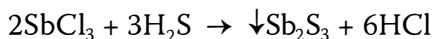
NDS: 0,5 mg/m³ NDSch: 1,5 mg/m³ (antymon i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na Sb).

LD₅₀ (doustnie, szczury): 525 mg/kg dla SbCl_3 ; LD (i.p., szczury): 100 mgSb/100g dla Sb_2S_3 ; LD₅₀ (doustnie, szczury): >20g/kg dla Sb_2O_3

7.1.2. Reakcje charakterystyczne

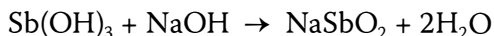
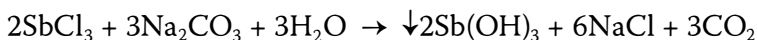
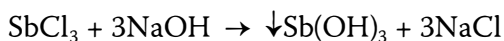
7.1.2.1. Reakcja z siarkowodorem

Do 1 cm³ badanego roztworu zakwaszonego HCl dodać 0,5 cm³ wody siarkowodorowej. Wytrącający się bezpostaciowy, jasnopomarańczowy osad świadczy o obecności antymonu.



7.1.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ 10% roztworu NaOH lub 10% Na₂CO₃. 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.



7.1.2.3. Reakcja z tiosiarczanem

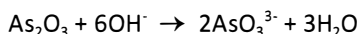
1 cm³ badanego roztworu zobojętnić roztworem NaHCO₃ wobec papierka lakmusowego. Następnie kroplami dodawać roztwór tiosiarczanu sodu (Na₂S₂O₃), ogrzewać do wrzenia. Wytrącający się czerwony osad składa się z Sb₂S₃ i Sb₂O₃.

7.2. Arsen

7.2.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

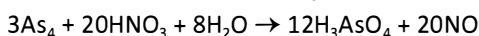
Arsen (As) i jego związki należą do jednych z najbardziej trujących substancji. Na powietrzu spala się niebieskim płomieniem tworząc tritlenek arsenu (As_2O_3). Tlenki arsenu (III) i (V) posiadają amfoteryczny charakter. As_2O_3 (arszenik) jest trudno rozpuszczalny w wodzie, natomiast dobrze rozpuszcza się w zasadach tworząc arseniany (III) (*meta*- i *orto*-), które wykazują właściwości silnych reduktorów.



As_2O_5 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_2S_3 , As_2S_5 , Ag_3AsO_3 , Ag_3AsO_4 , CuHAsO_3 , $\text{HgNH}_4\text{AsO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{As}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$. Arsen nie rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach: HCl i H_2SO_4 , natomiast dobrze rozpuszcza się w stężonym HNO_3 , wydzielając tlenek azotu:



Efekty toksyczne u człowieka

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 (żółtaczką) 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_2O_3 (arszenik) prowadzi do zaburzeń układu nerwowego, niedokrwistości, uszkodzeń błon śluzowych układu oddechowego, naczyń krwionośnych oraz oczu. Skutkiem zażycia arseniku jest najczęściej śmierć.

Efekty toksyczne u roślin

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.

Wartości toksyczne

NDS: 0,01 mg/m³ (arsen i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na As).

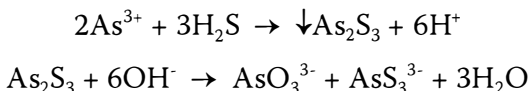
LD₅₀ (doustnie, szczury): 14,6 mg/kg dla As_2O_3 ; LD₇₅ (i.p., szczury): 14-18 mg As/kg dla $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Działa rakotwórczo (kategoria I).

Doustna dawka śmiertelna arseniku dla człowieka wynosi 70-300 mg.

7.2.2. Reakcje charakterystyczne

7.2.2.1. Reakcja z siarkowodorem

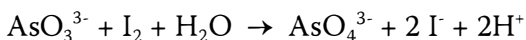
Do 2 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ wody siarkowodorowej, ogrzewając wytrącić osad żółtego siarczku arsenu (III). Powstały siarczek arsenu (III) rozpuścić w gorącym roztworze KOH lub NaOH:



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

7.2.2.2. Reakcja z jodem

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 1-3 krople roztworu jodu. Następuje zmiana barwy z brunatnej na lekko słomkową, co wskazuje na obecności jonów arsenu w roztworze.



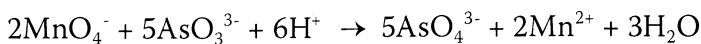
7.2.2.3. Reakcja z azotanem (V) srebra

Do 1 cm³ zakwaszonego HNO₃ badanego roztworu dodać 3 krople 1% roztworu AgNO₃. Po wymieszaniu ostrożnie wlewać po ściance probówki amoniak. Na granicy płynów tworzy się żółty pierścień arsenianu (III) srebra, który łatwo rozpuszcza się w HNO₃ i amoniaku.



7.2.2.4. Reakcja z nadmanganianem (VII) potasu

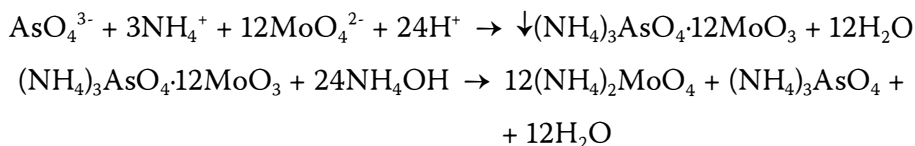
Do 1 cm³ zakwaszonego HNO₃ badanego roztworu dodać kroplę 5% roztworu KMnO₄. Odbarwienie roztworu wskazuje na obecność arsenianu.



Arseniany w środowisku kwaśnym redukują jon Mn⁷⁺ do Mn²⁺, który tworzy bezbarwne sole.

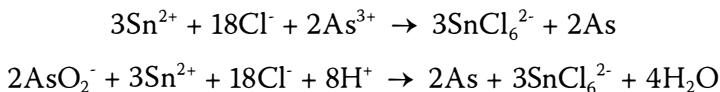
7.2.2.5. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu

Do 1 cm³ badanego roztworu zakwaszonego HNO₃ dodać 1-3 krople nasyconego roztworu molibdenianu (VI) amonu. Powstający żółty krystaliczny osad rozpuszczalny w amoniaku świadczy o obecności arsenianu w analizowanym materiale.



7.2.2.6. Reakcja Bettendorffa

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać SnCl₂ w stężonym HCl. Początkowo roztwór zabarwia się na brązowo, z którego po kilku minutach wytrąca się czarny osad metalicznego arsenu.



7.2.3. Analiza ilościowa

7.2.3.1. Oznaczanie zawartości arsenu metodą jodometryczną

Pięciwartościowy jon arsenu (As⁵⁺) wydziela z jodku potasu jod, który oznacza się przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór H₂SO₄ (1:50);
2. jodek potasu (w substancji);
3. 0,01 M roztwór tiosiarczanu sodu (Na₂O₂S₃);
4. 0,5% roztwór skrobi;
5. zlewki, kolby ze szlifem zamykane na korek, biurety, pipety.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej ze szlifem (o pojemności 200 cm³ z doszlifowanym korkiem) pobrać 50 cm³ badanej próby. Dodać 10 cm³ roztworu kwasu siarkowego (roztwór rozcieńczony 1:50) oraz 1 g jodku potasu (odważyć na wadze analitycznej). Kolbę zamknąć korkiem, zamieszać i wstawić w ciemne miejsce na 5 minut.

Wydzielony po tym czasie jod miareczkować 0,01 M roztworem tiosiarczanu sodu (Na₂S₂O₃). Pod koniec miareczkowania, gdy próbka przybierze słomkowe zabarwienie, należy dodać 1 cm³ 0,5% roztworu skrobi. Dalej miareczkować do zaniku zabarwienia (czyli, zaniku fioletowo-niebieskiej barwy).

Zawartość arsenu w próbce obliczyć według wzoru:

$$X_{AS} = \frac{f \cdot a \cdot 1000}{V} \text{ (mg As/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- X_{AS} – stężenie arsenu w próbce badanej;
- a – objętość roztworu tiosiarczanu sodu zużyta do miareczkowania badanej próby (cm³);
- f – współczynnik przeliczeniowy dla 0,01 M roztworu tiosiarczanu sody wynoszący 0,3745;
- V – objętość badanej próbki (50 cm³).

7.3. Bar

7.3.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Bar (Ba) 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.

Efekty toksyczne u człowieka

Silnymi trucznymi są sole baru łatwo rozpuszczalne w wodzie (np. $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, BaCl_2), natomiast trudno rozpuszczalne (np. BaSO_4) nie są szkodliwe. Bar w organizmie człowieka powoduje niedowład mięśni (zwłaszcza kończyn górnych i szyi), trudności w oddychaniu oraz działa hamująco na mineralizację kości.

Efekty toksyczne u roślin

Prawdopodobnie powoduje zaburzenia we wzroście i metabolizmie roślin.

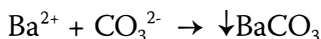
Wartości toksyczne

NDS: $0,5 \text{ mg/m}^3$; NDSch: $1,5 \text{ mg/m}^3$ (bar i jego związki nieorganiczne w przeliczeniu na Ba).
 LD_{50} (doustnie, szczury): 355 mg/kg dla $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$; LD_{50} (doustnie, szczury): 118 mg/kg dla BaCl_2 .

7.3.2. Reakcje charakterystyczne

7.3.2.1. Reakcja z rozpuszczalnymi węglanami

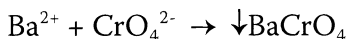
Do 1 cm^3 roztworu dodać 5 kropli 10% roztworu NH_4CO_3 . Jony węglanowe wytrącają z obojętnego lub zasadowego roztworu, zawierającego jony baru biały osad węglanu barowego, który dobrze rozpuszcza się w rozcieńczonych kwasach mineralnych oraz kwasie octowym.



7.3.2.2. Reakcje z chromianem (VI) lub dichromianem (VI) potasu

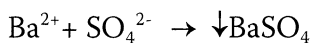
Do 1 cm^3 obojętnego lub zakwaszonego kwasem octowym badanego roztworu dodawać po kropli $0,05 \text{ M}$ roztwór $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Wytrącenie się żółtego osadu chromianu (VI) baru rozpuszczalnego w kilku kroplach

stężonego HCl świadczy o obecności baru. Osad nie rozpuszcza się w kwasie octowym.



7.3.2.3. Reakcja z rozpuszczalnymi siarczanami

Do 3 cm³ badanego roztworu dodawać po kropli rozcieńczony H₂SO₄. Wytrącający się natychmiast biały drobnokrystaliczny osad siarczanu (VI) baru wskazuje na występowanie baru w analizowanym materiale.



7.4. Bizmut

7.4.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Bizmut (Bi) jest kruchym metalem, o różowosrebrzystym połysku. Nie ulega zmianie na powietrzu. Dobrze rozpuszcza się w HNO₃ i gorącym stężonym H₂SO₄.

Efekty toksyczne u człowieka

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.

Efekty toksyczne u roślin

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.

Wartości toksyczne

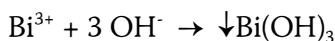
NDS: *brak danych*.

LD₅₀ (doustnie, szczury): 5000 mg/kg dla Bi₂O₃.

7.4.2. Reakcje charakterystyczne

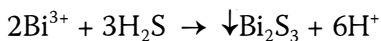
7.4.2.1. Reakcja wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 2-3 krople 10% roztworu NaOH. Powstaje galaretowaty, biały osad, który po ogrzaniu przechodzi w żółty osad wodorotlenku bizmutu (III).



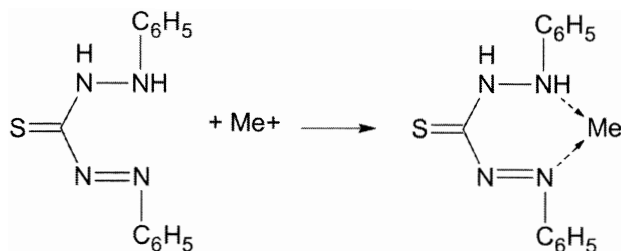
7.4.2.2. Reakcja z siarkowodorem

Do 3 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ wody siarkowodorowej. Wytrąca się ciemnobrunatny osad siarczku bizmutu, który dobrze rozpuszcza się w gorących stężonych kwasach mineralnych.



7.4.2.3. 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, 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 cm³ chloroformowego roztworu ditizonu dodać zakwaszony roztwór soli bizmutu i wytrząsać. Zielone zabarwienie ditizonu przechodzi w żółto-pomarańczowe.

7.5. Chrom

7.5.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Chrom (Cr) jest metalem szarym, trwałym na powietrzu i w wodzie. Dobrze rozpuszcza się w następujących kwasach: solnym, 70% kwasie chlorowym (VII) i rozcieńczonym H₂SO₄. Tworzy tlenki: CrO, Cr₂O₃ i nadtlenek CrO₅. Sole chromu ze względu na łatwość tworzenia uwodnionych kompleksów, posiadają charakterystyczne barwy, np. chlorek chromu i siarczan chromu są zielone, Cr(H₂O)₆⁶⁺ – jest fioletowy. Związki chromu łatwo ulegają hydrolizie i utlenieniu do chromianów w środowisku alkalicznym (CrO₄²⁻), które z kolei ulegają redukcji do związków chromowych pod wpływem H₂S, HI, SO₂, HBr. Wodorotlenek chromu (II) ma charakter zasadowy, zaś wodorotlenek chromu (III) – amfoteryczny.

Efekty toksyczne u człowieka

Związki chromu uszkodzają 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.

Efekty toksyczne u roślin

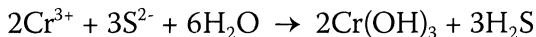
Objawy toksyczności u roślin to: zaburzenia gospodarki wodnej (wiednięcie roślin), chloroza młodych liści, uszkodzenia stożków wzrostu oraz systemu korzeniowego.

Wartości toksyczne

NDS: 0,5 mg/m³ (chrom i jego związki (III) w przeliczeniu na Cr).
 NDS: 0,1 mg/m³; NDSCh: 0,3 mg/m³ (chromiany).
 LD₅₀ (doustnie, królik): 3250 mg/kg dla Cr(NO₃)₃·9H₂O; LD₅₀ (doustnie, szczury): 1790 mg/kg dla CrCl₃·6H₂O; LD₅₀ (doustnie, szczury): 10000 mg/kg dla Cr₂O₃; LD₅₀ (doustnie, królik): 80 mg/kg dla CrO₃.

7.5.2. Reakcje charakterystyczne**7.5.2.1. Reakcja z siarczkiem sodu**

Do 1 cm³ 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.

**7.5.2.2. Reakcja z amoniakiem**

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 3 krople NH₄Cl 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:

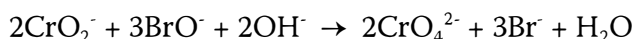
**7.5.2.3. Reakcja z nadtlakiem wodoru**

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać kilka kropli 3% roztworu H₂O₂, następnie zakwasić rozcieńczonym H₂SO₄ i ostrożnie dolać 1-2 cm³

eteru. Powstający CrO_5 przechodzi do warstwy eterowej barwiąc ją na niebiesko.

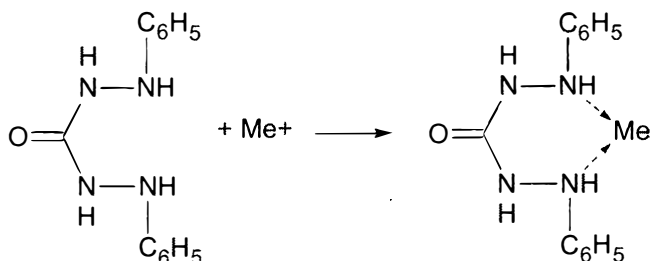
7.5.2.4. Reakcja z difenylokarbazydem (I)

Związki chromu w środowisku kwaśnym reagują z difenylokarbazydem (I), dając fioletowy kompleks. Aby ta reakcja zaszła, należy najpierw utlenić Cr^{3+} do Cr^{6+} 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_3 . 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_2SO_4 , 1-2 krople 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego, a następnie kroplę nasyconego roztworu difenylokarbazydu (I). Pojawienie się fioletowej barwy świadczy o obecności chromu.



7.5.3. Analiza ilościowa

7.5.3.1. 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^3 , 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 niebiesko-fioletową, 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:

1. 0,04% etanolowy roztwór difenylokarbazydu (I);
2. 0,5 M roztwór H_2SO_4 cz.d.a.;
3. peroksydiarczan (VI) sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), stały;
4. podstawowy roztwór $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o stężeniu $0,10 \text{ mg Cr}^{6+}/\text{cm}^3$;
5. roboczy roztwór $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o stężeniu $0,001 \text{ mg Cr}^{6+}/\text{cm}^3$ (roztwór przygotować na świeżo przed oznaczeniem);
6. bufony o $\text{pH}=4,01$ i $\text{pH}=6,98$;
7. spektrofotometr UV-VIS, pH-metr, pipety, zlewki, kolby miarowe, łaźnia wodna.

Do zlewki o pojemności 100 cm^3 odmierzyć 50 cm^3 próbki ścieków bytowych pobranych znad osadu. Dodać taką ilość $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, aby otrzymać pH roztworu wynoszące 1,5. Następnie dodać $0,2 \text{ g}$ peroksydiarczanu (VI) sodu w celu utlenienia chromu do Cr^{6+} . Tak przygotowany roztwór ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze $80 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 20 minut. Po ochłodzeniu przygotowany roztwór przenieść do kolby miarowej o objętości 50 cm^3 i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie dodać $2,5 \text{ cm}^3$ roztworu difenylokarbazydu (I) i wymieszać.

Analogicznie wykonać próbę ślełą, używając zamiast ścieku wodę destylowaną. Próby (badaną i ślełą) odstawić na 10 minut. Po tym czasie odczytać wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=540$ nm wobec próby ślepej.

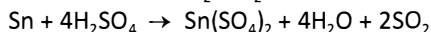
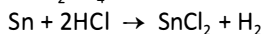
Wykres wzorcowy: do szeregu kolb miarowych o pojemności 50 cm^3 odmierzyć następujące objętości roboczego wzorcowego roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: 0; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 cm^3 i dopełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie dodać po $2,5\text{ cm}^3$ roztworu difenylokarbazydu (I), wymieszać i zmierzyć wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=540$ nm. Wykreślić krzywą wzorcową. Na podstawie krzywej wzorcowej odczytać zawartość chromu w próbce badanej.

7.6. Cyna

7.6.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Cyna (Sn) 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_2SO_4 :



Efekty toksyczne u człowieka

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, grasnicę, wątrobę i drogi żółciowe. Ostre zatrucia cyną objawiają się zaburzeniami widzenia, utratą świadomości, bólami głowy, zmianami skórными, podrażnieniami spojówek oraz zaburzeniami czucia.

Efekty toksyczne u roślin

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

Wartości toksyczne

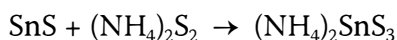
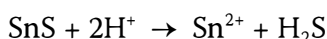
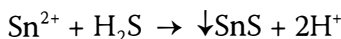
NDS: 2 mg/m^3 (cyna i jej związki nieorganiczne w przeliczeniu na Sn, dymy i pyły).

LD_{50} (doustnie, szczury): 700 mg/kg dla SnCl_2 ; LD_{50} (doustnie, szczury): 377 mg/kg dla SnF_2 .

7.6.2. Reakcje charakterystyczne

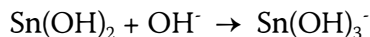
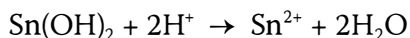
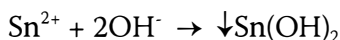
7.6.2.1. Reakcja z siarkowodorem

Do 1 cm³ badanego roztworu zakwaszonego HCl dodać 0,5 cm³ wody siarkowodorowej. O obecności cyny świadczy powstanie brązowego osadu dobrze rozpuszczalnego na gorąco w stężonym HCl i polisiarczku amonowym.



7.6.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ badanego roztworu dodać 1 cm³ roztworu NaOH lub KOH. Powstający biały osad Sn(OH)₂ 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.



7.6.2.3. Reakcja z molibdenianem (VI) amonu

Do kilku kropli roztworu Na₂HPO₄, zakwaszonego stężonym HNO₃ dodać w nadmiarze roztwór molibdenianu (VI) amonu – (NH₄)₂MoO₄. Wytrąca się żółty osad (NH₄)₃P(Mo₃O₁₀)₄, do którego należy dodać 0,5 cm³ badanego roztworu. W przypadku obecności soli cynawej w roztworze pojawia się niebieskie zabarwienie.

7.7. Cynk

7.7.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Cynk (Zn) należy do II grupy układu okresowego. Jest srebrzystym metalem o niebieskawym odcieniu. Ma charakter amfoteryczny. Rozpuszcza się w kwasach i mocnych zasadach, występuje na +2 stopniu utlenienia. W przyrodzie występuje w postaci minerałów.

Efekty toksyczne u człowieka

Cynk w organizmach zwierzęcych współdziała w procesach metabolicznych z innymi niezbędnymi metalami (Cu, Fe i Ca), powoduje różne zaburzenia w układzie krążenia, a także może powodować zaburzenia psychiczne. Prawdopodobnie zaburzenia metabolizmu metali niezbędnych dla organizmu człowieka pod wpływem cynku mogą być jedną z najważniejszych przyczyn jego toksyczności u człowieka i zwierząt. Związki cynku podawane doustnie uważa się za mało toksyczne. Wdychanie świeżo wytworzonych dymów, zawierających tlenek cynku w stężeniach powyżej 15 mg/m³ powoduje wystąpienie choroby przypominającej gripę, znanej jako „gorączka odlewników”. Choroba zaczyna się objawami podrażnienia górnych dróg oddechowych, bólami głowy, mięśni i stawów, uczuciem rozbicia i osłabienia. Następnie pojawia się wysoka gorączka i leukocytoza, bóle w klatce piersiowej, dreszcze, poty. Objawy ustępują samoistnie w ciągu 24-48 godzin. U ludzi narażenie na długotrwałe działanie pyłu cynkowego i tlenku cynku powoduje podrażnienie dróg oddechowych, zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego oraz niedokrwiłość. Ponadto stwierdza się bezsenność, upośledzenie pamięci, zaburzenia słuchu i nadmierną potliwość. Cynk uważany jest również za czynnik rakotwórczy.

Efekty toksyczne u roślin

Cynk hamuje kiełkowanie nasion oraz wzrost korzeni i nadziemnych części roślin. Ogranicza również wchłanianie żelaza i magnezu przez rośliny, co prowadzi do zaburzeń w gospodarce mineralnej.

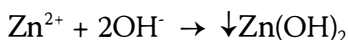
Wartości toksyczne

NDS dla dymów cynku: 5 mg/m³ (w przeliczeniu na Zn);
NDSCh: 10 mg/m³ (w przeliczeniu na Zn);
LD₅₀ (doustnie, szczury): 2000 mg/kg;
LD₅₀ (inhalacyjnie, szczury): 5,4 mg/dm³/4 godz.

7.7.2. Reakcje charakterystyczne

7.7.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

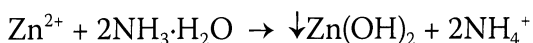
Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony cynku dodawać kroplami 10% roztwór NaOH do wytrącenia białego osadu.



Powstały wodorotlenek cynku (II) jest amfoteryczny; rozpuszcza się w nadmiarze odczynnika i w kwasach. W tym celu nadal dodawać 10% roztwór NaOH w celu rozpuszczenia osadu.

7.7.2.2. Reakcja z amoniakiem

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony cynku dodawać kroplami wodny roztwór amoniaku (NH₃·H₂O). Wytrąca się biały osad wodorotlenku cynku (II) rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika. W tym celu nadal dodawać kroplami roztwór amoniaku w celu rozpuszczenia osadu.



7.7.2.3. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony cynku dodawać kroplami 10% roztwór K₄[Fe(CN)₆]. Zaobserwować pojawienie się białego osadu heksacyjanożelazianu (II) cynku Zn₂[Fe(CN)₆].

7.7.3. Analiza ilościowa

7.7.3.1. Oznaczanie zawartości cynku w roztworach metodą ditizonową

Metoda ditizonowa (patrz rozdział 7.4.3) do oznaczania cynku może być stosowana po wyeliminowaniu czynników przeszkadzających, takich jak: jony metali podobnie reagujące z ditizonem jak cynk (Cd²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺) przez dodanie tiosiarczanu sodu oraz chlor i inne halogenki – przez gotowanie roztworu.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór ditizonu – rozpuścić 0,1 g ditizonu w 500 cm³ chloroformu;
2. chloroform;
3. 10% roztwór tiosiarczuanu sodu (Na₂S₂O₃);
4. bufor octanowy o pH=5. Przygotować 0,2 M roztwór kwasu octowego (11,55 cm³ CH₃COOH uzupełnić wodą do 1000 cm³) oraz 0,2 M roztwór octanu sodowego (rozpuścić 16,4 g CH₃COONa i uzupełnić wodą do 1000 cm³). W celu uzyskania buforu o pH=5 pobrać 14,8 cm³ 0,2 M roztworu kwasu octowego i 35,2 cm³ 0,2 M roztworu octanu sodu. Roztwory wymieszać i uzupełnić wodą do 100 cm³;
5. roztwór wzorcowy cynku. Rozpuścić 0,1 g cynku w 2 cm³ roztworu HCl (1:1), uzupełnić wodą do kreski (1000 cm³) i wymieszać. Do ćwiczeń odmierzyć 10 cm³ podstawowego roztworu cynku do kolbki miarowej o pojemności 1000 cm³, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Tak przygotowany **roztwór wzorcowy cynku zawiera 0,001 mg Zn w 1 cm³**;
6. spektrofotometr, próbówki, wagi analityczne, pipety, zlewki.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do 3 kolejnych próbek (próbówki nr 1, 2, 3) dokładnie odmierzyć po 1 cm³ badanej próby (próby badane). Do próbówki nr 4 pobrać 1 cm³ próby wzorcowej cynku (próba wzorcowa). Natomiast do próbówki nr 5 pobrać 1 cm³ wody destylowanej (próba ślepa).

Do wszystkich prób dodać po 1 cm³ 10% roztworu Na₂S₂O₃ oraz 3 cm³ roztworu buforowego o pH=5. Dokładnie wymieszać. Po wymieszaniu dodać 2 cm³ roztworu ditizonu oraz 1 cm³ chloroformu. Wytrząsać przez 3 minuty. Odstawić na 5-10 minut w celu rozdzielenia się warstw.

Za pomocą suchej pipety Pasteura pobrać warstwę chloroformową do kuwety i zmierzyć absorbancję 3 prób badanych oraz wzorcowej wobec próby ślepej w spektrofotometrze przy długości fali λ=620 nm. Zawartość cynku w próbce obliczyć według wzoru:

$$C_p = (A_p \cdot C_w) / A_w,$$

gdzie:

- C_p – stężenie cynku w próbce badanej;
- C_w – stężenie wzorca cynku (0,001 mg Zn/cm³);
- A_p – średnia absorbancja próby badanej;
- A_w – absorbancja próby wzorcowej.

7.8. Kadm

7.8.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Kadm (Cd) jest białym metalem o niebieskawym odcieniu. Należy do grupy IIb układu okresowego pierwiastków, razem z cynkiem i rtęcią. Tworzy szereg związków, występując w nich wyłącznie na +2 stopniu utlenienia. Jest zaliczany do grupy metali ciężkich (gęstość przekracza 5 g/cm³). Lotny kadm w postaci pary szybko się utlenia do tlenku kadmu. Kadm i jego związki nieorganiczne tworzą w powietrzu środowiska pracy aerozole (dymy, pyły), które łatwo dostają się do pęcherzyków płucnych.

Efekty toksyczne u człowieka

Toksyczność ostra: przy narażeniu inhalacyjnym na kadm obserwuje się gorączkę, bóle głowy, gardła i w klatce piersiowej, zaburzenia oddychania, kaszel, zapalenie spojówek, obrzęk płuc, śródmiąższowe zwłóknienie płuc. Przy zatruciach drogą pokarmową stwierdza się wymioty, biegunkę i silne bóle brzucha.

Toksyczność przewlekła: uszkodzenie nerek (białka mikroglobuliny w moczu), uszkodzenie wątroby, uszkodzenie jelit, niedokrwistość, chorobę nadciśnieniową, zmiany w układzie krążenia, odwapnienia kości, powikłania ciąży, zaburzenie funkcji rozrodczych.

Charakterystyczną chorobą powodowaną przez kadm jest „itai-itai”. Choroba ta pojawiła się w dolinie Jintsu w Japonii w latach 1940–1960, gdzie spożywano duże ilości ryżu z poletek skażonych kadmem i cynkiem. Poletki te były nawadniane wodą, która spływała z gór wraz z odpadami kopalnianymi. Jej objawy to: silne bóle stawów i kości podczas chodzenia, głównie kręgosłupa i kończyn dolnych (tzw. kaczy chód), wielokrotne złamania i zniekształcenia kości. Jest to spowodowane zaburzeniami metabolizmu witaminy D i hormonu tarczycy, co prowadzi do zmian w kościach (osteomalacja, osteoporoza). U chorych na „itai-itai” wykryto wysoki poziom kadmu w moczu i we krwi oraz wysokie wydalanie z moczem wielu małocząsteczkowych związków (jony wapniowe i fosforanowe, aminokwasy, metalotioneina, białko wiążące retinol, glukoza). Efektem charakterystycznym narażenia na kadm jest uszkodzenie nerek typu kanalikowego. Kadm jest również przyczyną choroby nadciśnieniowej, anemii, rozedmy płuc, utraty węchu.

cd. Tabeli

Efekty toksyczne u człowieka

Efekty odległe: kadm wykazuje działanie mutagenne (pęknięcia chromatyd, translokacje chromosomów), teratogenne (brak kości czaszki, wodogłowie, rozszczep warg i podniebienia u płodu, uszkodzenie łożyska, śmierć płodu), rakotwórcze (nowotwory płuc, nerek, jąder). Obniża również rozrodczość (zahamowanie spermatogenezy).

Efekty toksyczne u roślin

Kadm obniża ilość chlorofilu, a zatem ogranicza efektywność fotosyntezy. Rośliny wrażliwe na kadm (szpinak, soja, sałata) wykazują objawy zatrucia i znaczną obniżkę plonu już przy stężeniu 4-13 ppm kadmu w glebie, podczas gdy pomidory i kapusta nie podlegają wyraźnemu uszkodzeniu jeszcze przy zawartości 170 ppm kadmu, a ryż przy 640 ppm kadmu. Kadm osłabia rozwój roślin, hamuje kiełkowanie nasion oraz rozwój korzeni i pędów. Liście ulegają deformacji. Powoduje ograniczenie transpiracji oraz powstawanie charakterystycznych czerwonych żyłek na liściach. Negatywnie wpływa na gospodarkę wodną i mineralną roślin

Wartości toksyczne

NDS dla dymów i pyłów kadmu: 0,01 mg/m³ w przeliczeniu na kadm. Za stężenie progowe wystąpienia ostrych objawów zatrucia drogą inhalacyjną przyjmuje się 0,5 mg Cd/m³ dla dymów tlenku kadmu i 3 mg Cd/m³ dla respirabilnej frakcji pyłu.

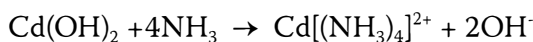
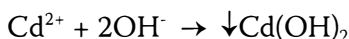
LD₅₀ (doustnie, szczury): 225 mg/kg; LD₅₀ (doustnie, szczury): 88 mg/kg dla CdCl₂; LD₅₀ (doustnie, szczury): 280 mg/kg dla CdSO₄.

LC₅₀ (toksyczność dla ryb): 0,003 mg/dm³ – 96 godz. dla CdCl₂;

EC₅₀ (toksyczność dla dafnii i innych bezkręgowców): 0,016 mg/dm³ – 48 godz. dla CdCl₂.

7.8.2. Reakcje charakterystyczne**7.8.2.1. Reakcja z amoniakiem**

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony kadmu dodawać kroplami roztwór amoniaku. Zaobserwować pojawienie się białego osadu rozpuszczalnego w nadmiarze odczynnika.

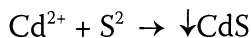


7.8.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony kadmu dodawać kroplami 10% roztwór wodorotlenku sodu. Zaobserwować pojawienie się białego osadu nierozpuszczalnego w nadmiarze odczynnika.

7.8.2.3. Reakcja z siarczkiem sodu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony kadmu dodawać kroplami 10% roztwór siarczku sodu (Na₂S). Zaobserwować pojawienie się żółtego osadu siarczku kadmu nierozpuszczalnego w nadmiarze odczynnika.



7.8.2.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony kadmu dodawać kroplami 10% roztwór K₄[Fe(CN)₆]. Zaobserwować pojawienie się białego osadu Cd₂[Fe(CN)₆].

7.9. Miedź

7.9.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Miedź (Cu) jest metalem o żółto-czerwonym zabarwieniu. Po srebrze jest najlepszym przewodnikiem prądu elektrycznego i ciepła. Pod wpływem wilgoci i CO_2 pokrywa się warstwą zasadowych węglanów o zabarwieniu zielonym (patyna). Jony Cu^+ są nietrwałe. W roztworach wodnych mogą występować jedynie w kompleksach: CuCl_4^{3-} , $\text{Cu}(\text{CN})_4^{3-}$, $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^+$. Jony Cu^{2+} wykazują w roztworze wodnym charakterystyczne błękitne zabarwienie, którego intensywność wzrasta ze stężeniem. Zjawisko to wynika z hydratacji Cu^{2+} i powstania $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$. 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).

Efekty toksyczne u człowieka

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.

Efekty toksyczne u roślin

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

Wartości toksyczne

NDS: 0,1-1 mg/m^3 ; NDSC: 0,3-2 mg/m^3 (miedź i jej związki w przeliczeniu na Cu).

LD_{50} (doustnie, szczury): 140 mg/kg dla CuCl ; LD_{50} (doustnie, szczury): 470 mg/kg dla Cu_2O ;

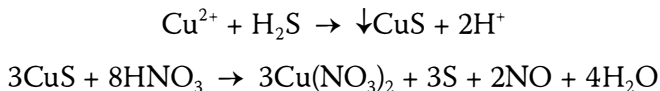
LD_{50} (doustnie, szczury): 584 mg/kg dla CuCl_2 ; LD_{50} (doustnie, szczury): 300 mg/kg dla CuSO_4 ;

LD_0 (doustnie, człowiek): 50 mg/kg dla CuSO_4 .

7.9.2. Reakcje charakterystyczne

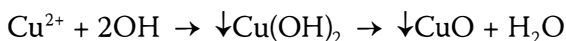
7.9.2.1. Reakcja z siarkowodorem

Do 5 cm³ roztworu zawierającego jony miedzi (II) dodawać kroplami wodę siarkowodorową do chwili wytrącenia czarnego osadu, który rozpuszcza się, po odsączeniu, w 1 cm³ gorącego rozcieńczonego HNO₃.



7.9.2.2. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

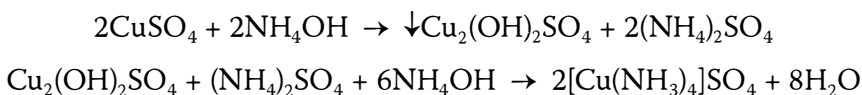
Do 5 cm³ badanego roztworu dodać kilka kropli 10% roztworu NaOH. Powstaje niebieski osad Cu(OH)₂, który w trakcie gotowania przechodzi w ciemnoszary osad tlenku miedzi CuO.



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

7.9.2.3. Reakcja z amoniakiem

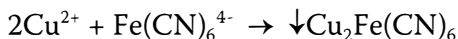
Do 3 cm³ roztworu badanego dodać 1-3 krople rozcieńczonego roztworu amoniaku. W przypadku obecności miedzi tworzy się jaśniebieski osad, który łatwo rozpuszcza się w nadmiarze amoniaku, pogłębiając zabarwienie do ciemnoniebieskiego od powstałej soli zespolonej – [Cu(NH₃)₄]SO₄.



7.9.2.4. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu

Do 5 cm³ roztworu dodać 1-3 krople 10% roztworu heksacyjanożelazianu (II) potasu. Powstaje czerwono-brunatny osad, który można

rozpuścić w 1 cm³ amoniaku, uzyskując w ten sposób intensywną ciemnoniebieską barwę.



7.9.2.5. Reakcja z ditizonem

Do 3 cm³ ditizonu (patrz rozdział 7.4.3) w tetrachlorku węgla dodać zasadowy lub kwaśny roztwór zawierający jony miedzi Cu²⁺ i wytrząsać przez 1 minutę. Zielona warstwa tetrachlorku 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.

7.9.3. Analiza ilościowa

7.9.3.1. Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biologicznym

Oznaczanie zawartości miedzi w materiale biologicznym, np. surowicy krwi wykonuje się za pomocą wodnego roztworu dietyloditio-karbaminianu 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 izoamyłowy, tetrachlorek węgla, chloroform, co wykorzystuje się w ekstrakcyjnym wariacie metody.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór wzorcowy miedzi, zawierający 5 μg Cu/cm³: rozpuścić 393 mg CuSO₄·5H₂O w kilkudziesięciu cm³ wody destylowanej, dodać 1 cm³ stężonego H₂SO₄ i uzupełnić wodą do 1000 cm³;
2. stężony H₂SO₄;
3. 60% roztwór HClO₄;
4. stężony roztwór amoniaku;
5. nasycone roztwory cytrynianu sodu i difosforanu (V) sodu;
6. 0,1% roztwór Na-DDTK zalkalizowany amoniakiem do pH=8;
7. spektrofotometer, zlewki, cylindry miarowe, kolbki Kjeldahla, łaźnia wodna, łaźnia paskowa, pipety.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Badany materiał biologiczny odważyć i zmineralizować za pomocą $0,5 \text{ cm}^3$ stężonego H_2SO_4 w kolbce Kjeldahla w łaźni piaskowej. Po uzyskaniu brunatnej, oleistej cieczy dodać 2-3 krople 60% roztworu HClO_4 i ogrzewać do całkowitego odbarwienia się. Po oziębieniu roztworu bardzo powoli i ostrożnie dodać 2 cm^3 stężonego roztworu amoniaku i uzupełnić wodą do $3,5 \text{ cm}^3$. Po wprowadzeniu $0,5 \text{ cm}^3$ roztworów cytrynianu sodu, difosforanu (V) sodu i Na-DDTK próby dokładnie wymieszać i odczytać po 5 minutach wartość absorbancji przy $\lambda=430 \text{ nm}$ wobec próby odnośnikowej (mineralizowanej i oznaczanej w analogiczny sposób jak próba badana, tylko zamiast odważki badanej substancji dodać $0,5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$).

WYKRES WZORCOWY: Do próbek dodać kolejno po: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i $1,0 \text{ cm}^3$ roztworu wzorcowego ($5 \mu\text{g Cu/cm}^3$) i uzupełnić wodą do 1 cm^3 . Po wprowadzeniu $0,5 \text{ cm}^3$ stężonego roztworu H_2SO_4 i 2 cm^3 stężonego roztworu amoniaku, dodać następnie po $0,5 \text{ cm}^3$ roztworów cytrynianu sodu, difosforanu (V) sodu i Na-DDTK, dokładnie wymieszać i oznaczyć wartość absorbancji wobec roztworu z pierwszej próbki (z wodą). Poszczególne wartości absorbancji odpowiadają 1, 2, 3, 4 i $5 \mu\text{g Cu}$.

7.10. Ołów

7.10.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Ołów (Pb) jest pierwiastkiem metalicznym, miękkim, o zabarwieniu niebieskawoszarym. Dobrze rozpuszcza się w 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 naczynioruchowego. Może być przyczyną ostrych zatruc 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 tetraetylen ołowiu (środek przeciwstukowy dawniej stosowany 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 więdnieniem liści oraz skróceniem wzrostu korzeni.

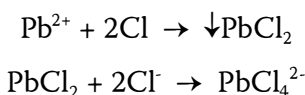
Wartości toksyczne

NDS: $0,05 \text{ mg/m}^3$ (w przeliczeniu na ołów).
 LD_{75} (i.p. świnka morska): 290 mg/kg dla PbSO_4 ; LD_0 (doustnie, człowiek): 571 mg/kg dla PbCO_3 ; LD_{50} (doustnie, szczury): 4665 mg/kg dla $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
PbNO₃, **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 $> 1,8 \text{ mg/dm}^3$; glony: *Scenedesmus quadricauda* toksyczne $> 3,7 \text{ mg/dm}^3$; **stawonogi**: *Daphnia magna* LC_{50} : $2,5 \text{ mg/dm}^3$; **ryby**: śmiertelne $> 1,4 \text{ mg/dm}^3$; *Salmo gairdnerii*: LC_{50} : $0,14 \text{ cm}^3/\text{dm}^3/96 \text{ godz.}$

7.10.2. Reakcje charakterystyczne

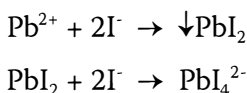
7.10.2.1. Reakcja z kwasem solnym

Do 1-1,5 cm³ 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 PbCl₂, rozpuszczalne w stężonym HCl tworząc zespolone połączenia H₂[PbCl₄].



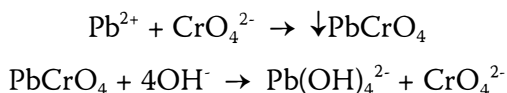
7.10.2.2. Reakcja z jodkiem potasu

Do 1 cm³ 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.



7.10.2.3. Reakcja z chromianem (VI) potasu

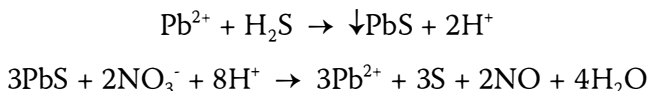
Do 1 cm³ badanego roztworu dodać kilka kropli 0,05 M roztworu chromianu (VI) potasu. Powstaje żółty osad PbCrO₄, który jest rozpuszczalny w roztworze wodorotlenku sodu (odróżnienie od chromianu (VI) baru).



7.10.2.4. Reakcja z siarkowodorem

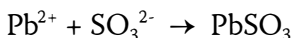
Do 1 cm³ słabo kwaśnego badanego roztworu dodać 1 cm³ wody siarkowodorowej. Natychmiast tworzy się czarny osad siarczku ołowiu

(reakcja pozytywna nawet przy rozcieńczeniu ołowiu w badanej próbce w stosunku 1:100000), który jest rozpuszczalny w gorącym, rozcieńczonym HNO_3 .



7.10.2.5. Reakcja z siarczanem (IV) sodu

Zmieszać w probówce równe objętości roztworu badanego z 2% roztworem Na_2SO_3 . Powstanie białego osadu siarczanu (IV) ołowiu wskazuje na obecność ołowiu.

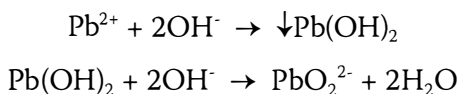


7.10.2.6. Reakcja z ditizonem

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.

7.10.2.7. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

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

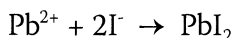


7.10.2.8. Wykrywanie obecności ołowiu u roślin

Zebrać części roślin (łodygi, liście) rosnących w pobliżu ruchliwej jezdni. Umyć starannie wodą destylowaną, następnie osuszyć i wycisnąć z nich po kilka kropli soku na szkiełko zegarkowe. Na dwa płaskie paski bibuły nanieść po 1 kropli soku z roślin, a następnie na jeden

z pasków dodać dodatkowo 1 kroplę 0,1% roztworu azotanu (V) ołowiu (II). Na każdy z pasków nanieść po 1 kropli wody destylowanej i 0,1% roztworu jodku potasu. Porównać kolory otrzymanych plam.

W reakcji jonów jodu z jonami ołowiu powstaje jodek ołowiu o żółtym zabarwieniu.



7.10.3. Analiza ilościowa

7.10.3.1. Oznaczanie zawartości ołowiu w roztworach metodą ditizonową

Jony ołowiu tworzą z ditizonem (patrz rozdział 7.4.3) przy pH 8,5-10 czerwono zabarwiony ditizonian ołowiu, który po ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym określa się spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm. Ditizon jest odczynnikiem bardzo czułym, ale jednocześnie nie specyficznym w stosunku do ołowiu. Przeszkadzający wpływ innych metali eliminuje się przez dodanie substancji kompleksotwórczych (np. winianu sodowo-potasowego).

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór ditizonu – rozpuścić 0,1 g ditizonu w 500 cm³ chloroformu;
2. chloroform;
3. 10% roztwór winianu sodowo-potasowego;
4. roztwór buforowy o pH=10: przygotować 0,1 M roztwór kwasu octowego oraz 0,1 M roztwór amoniaku. W celu uzyskania buforu o pH=10 pobrać 16 cm³ 0,1 M roztworu kwasu octowego i uzupełnić 0,1 M roztworem amoniaku do 100 cm³;
5. roztwór wzorcowy ołowiu: w kolbie miarowej o pojemności 1000 cm³ rozpuścić 0,320 g Pb(NO₃)₂ i uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. 1 cm³ roztworu zawiera 0,2 mg Pb²⁺. Do ćwiczeń odmierzyć 10 cm³ podstawowego roztworu ołowiu do kolbki miarowej o pojemności 200 cm³, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. **Roztwór wzorcowy ołowiu zawiera 0,01 mg Pb²⁺ w 1 cm³;**
6. spektrofotometer, zlewki, pipety, wagi analityczne.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do 3 kolejnych probówek (probówki nr 1, 2, 3) dokładnie odmierzyć po 1 cm³ badanej próby (próby badane). Do probówki nr 4 pobrać 1 cm³ próby wzorcowej ołowiu (próba wzorcowa). Natomiast do probówki nr 5 pobrać 1 cm³ wody destylowanej (próba ślepa).

Do wszystkich prób dodać po 1 cm³ 10% roztworu winianu sodowo-potasowego oraz 1 cm³ roztworu buforowego o pH=10. Dokładnie wymieszać. Po wymieszaniu dodać 2 cm³ roztworu ditazonu oraz 1 cm³ chloroformu. Wytrząsać przez minutę. Odstawić na 5-10 min w celu rozdzielenia się warstw.

Za pomocą suchej pipety Pasteura pobrać warstwę chloroformową do kuwety i zmierzyć absorbancję 3 prób badanych oraz wzorcowej wobec próby ślepej w spektrofotometrze przy długości fali $\lambda=510$ nm.

Zawartość ołowiu w próbce obliczyć według wzoru:

$$C_p = (A_p \cdot C_w) / A_w ,$$

gdzie:

- C_p – stężenie ołowiu w próbce badanej;
- C_w – stężenie wzorca ołowiu (0,01 mg Pb²⁺/cm³);
- A_p – średnia absorbancja próby badanej;
- A_w – absorbancja próby wzorcowej.

7.11. Rtęć

7.11.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Rtęć (Hg) 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_3 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 ograniczania pola widzenia, zaburzeń czucia, pogorszenia mowy i słuchu, obniżenia koordynacji ruchu oraz zaburzeń umysłowych (tzw. choroba Minamata). 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.

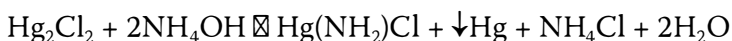
Wartości toksyczne

NDS: 0,025 mg/m^3 ; NDSCh: 0,2 mg/m^3 pary rtęci. NDS: 0,05 mg/m^3 ; NDSCh: 0,15 mg/m^3 (rtęć i jej związki nieorganiczne w przeliczeniu na Hg). NDS: 0,01 mg/m^3 , NDSCh: 0,03 mg/m^3 (rtęć i jej związki organiczne w przeliczeniu na Hg). LD_{50} (doustnie, szczury): 170 mg/kg dla $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; LD_{50} (doustnie, szczury): 1 mg/kg dla HgCl_2 ; LD_{50} (naskórnice, królik): 41 mg/kg dla HgCl_2 ; **LD_0 (doustnie, człowiek): 29 mg/kg dla HgCl_2** ; LD_{50} (doustnie, szczury): 40,9 mg/kg dla $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; LD_{50} (naskórnice, szczury): 570 mg/kg dla $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; LD_{50} (doustnie, szczury): 57 mg/kg dla HgSO_4 ; LD_{50} (naskórnice, szczury): 625 mg/kg dla HgSO_4 ; LD_{50} (doustnie, szczury): 18 mg/kg dla HgO ; LD_{50} (naskórnice, szczury): 315 mg/kg dla HgO .

7.11.2. Reakcje charakterystyczne

7.11.2.1. Reakcje z kwasem solnym i rozpuszczalnymi chlorkami

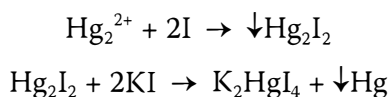
Do kilku cm^3 badanego roztworu dodawać kroplami 10% roztwór HCl. Powstający biały osad po dodaniu 10% amoniaku przechodzi w czarny osad, co wskazuje na obecność rtęci.



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

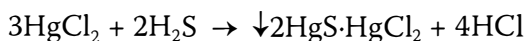
7.11.2.2. Reakcja z jodkiem potasu

Do 2 cm^3 badanego roztworu dodać kroplę 1% roztworu KI. W przypadku obecności jonów rtęci wytrąca się czerwony osad jodku rtęci (II). Jest on rozpuszczalny w nadmiarze odczynnika z wydzieleniem metalicznej rtęci oraz z utworzeniem bezbarwnego zespolonego jonu jodowortęciowego HgI_4^{2-} :

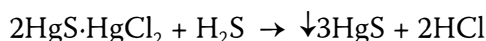


7.11.2.3. Reakcja z siarkowodorem

Do 5 cm^3 badanego roztworu dodać 2 cm^3 wody siarkowodorowej. Wytrąca się biały, przechodzący w żółto-czerwony, brunatny, a później czarny osad soli rtęci.

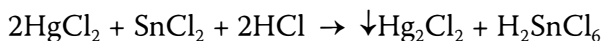


Czarny osad otrzymuje się poprzez działanie w nadmiarze siarkowodorem:



7.11.2.4. Reakcja z chlorkiem cyny (II)

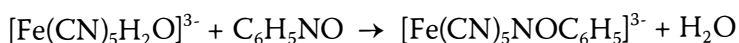
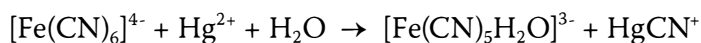
Do kilku kropli badanego roztworu dodać kilka kropli świeżo przygotowanego roztworu SnCl_2 zakwaszonego roztworem HCl . Wydziela się osad Hg_2Cl_2 , a następnie rtęć metaliczna.



7.11.2.5. Reakcja z nitrobenzenem

Do 2 kropli roztworu nitrobenzenu dodać 2 krople badanego roztworu i kroplę 10% roztworu heksacyjanożelazianu (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 Hg^{2+} w obecności nitrobenzenu. Pojawia się fioletowe lub różowe zabarwienie powstałego w ten sposób pentacyjanonitrobenzenu.



7.11.2.6. Reakcja z difenylokarbazydem (I)

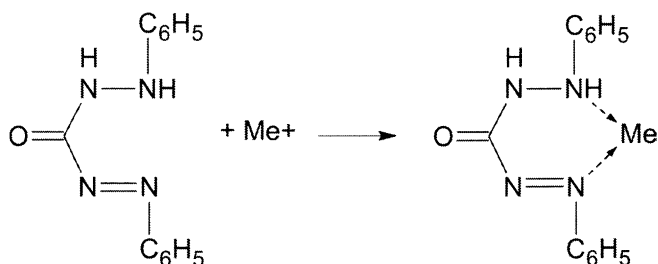
Do 5 cm^3 kwaśnego badanego roztworu dodać 2 cm^3 eterowego, chloroformowego lub siarczkowowęglowego roztworu difenylokarbazydu (I) (patrz rozdział 7.5.4), wytrząsać co najmniej przez 1 minutę. Niebiesko-fioletowe zabarwienie utrzymuje się w warstwie rozpuszczalnika, co wskazuje na obecność rtęci.

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

7.11.2.7. Reakcja z difenylokarbazonem (II)

Do 0,5 cm³ 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.



7.11.2.8. Reakcja z ditizonem

Do 1 cm³ chloroformowego roztworu ditizonu (patrz rozdział 7.4.3) dodać kilka kropli kwaśnego roztworu soli rtęciowej. Zielone zabarwienie odczynnika przechodzi w żółto-pomarańczowe. W słabo alkalicznym środowisku reakcji tworzy się druga forma ditizonianu rtęci o zabarwieniu purpurowoczerwonym. Rtęć reaguje z ditizonem tworząc wewnątrzkompleksowe sole, których budowa i zabarwienie zależne są od pH środowiska.

7.12. Żelazo

7.12.1. Właściwości i toksyczność

Właściwości fizykochemiczne

Żelazo (Fe) jest miękkim, ciągliwym, prawie białym metalem kowalnym o silnych właściwościach magnetycznych. Pod względem chemicznym odznacza się średnią aktywnością.

Efekty toksyczne u człowieka

Żelazo metaliczne nie jest trujące, natomiast bardzo niebezpieczne są tlenki żelaza w postaci dymów i pyłów (kopalnie, huty), które mogą być przyczyną żelazicy płuc (uszkodzenia dróg oddechowych). Niebezpieczne są również sole żelaza (II), które były stosowane do leczenia niedokrwistości. Związki te w nadmiarze są przyczyną ostrych zatruc (tzw. hemochromatozy), które mogą się skończyć śmiercią. Główną przyczyną toksyczności wysokich dawek żelaza jest fakt, że reaguje ono z nadtlenkami tworząc wolne rodniki – wysoce reaktywne związki uszkadzające DNA, białka, lipidy i inne składniki komórkowe. Ponadto żelazo wiąże się z grupami –SH enzymów regulujących komórkowe procesy oksydoredukcyjne. Objawy szkodliwego wpływu żelaza to: wymioty, krwawa biegunka, kwasica, zapaść krążeniowa, drgawki padaczkowe, śpiączka. **Toksyczność żelaza objawia się przy spożyciu około 20 mg na kg m.c. (60 mg na kg m.c. jest dawką śmiertelną).** W przypadkach zatrucia żelazem stosuje się związki chelatujące (wiążące metale) – szczególnie deferoksaminę, wiążącą się z jonami żelaza i powodującą jego wydalenie z organizmu. Natomiast sole żelaza (III-VI) nie są szkodliwe, ponieważ nie wchłaniają się do organizmu.

Efekty toksyczne u roślin

Nadmiar żelaza u roślin powoduje zaburzenia związane z przyswajaniem innych pierwiastków takich jak mangan, nikiel, fosfor i potas.

Wartości toksyczne

NDS: dla tlenku żelaza i dymów w przeliczeniu na żelazo: 5 mg/m³; NDSch od 10 mg/m³.

7.12.2. Reakcje charakterystyczne

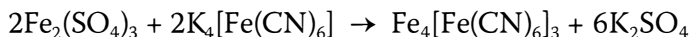
7.12.2.1. Reakcja z wodorotlenkiem sodu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony żelaza (III) dodawać kroplami 10% roztwór NaOH. Zaobserwować pojawienie się czerwonobrunatnego osadu wodorotlenku żelaza (III).



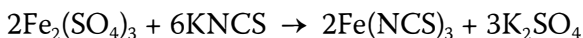
7.12.2.2. Reakcja z heksacyjanożelazianem (II) potasu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony żelaza (III) dodawać kroplami 10% roztwór K₄[Fe(CN)₆]. Wytrąca się błękitny osad heksacyjanianu (II) żelaza (III) tzw. błękit pruski.



7.12.2.3. Reakcja z izotiocyanianem potasu

Do 1 cm³ roztworu zawierającego jony żelaza (III) dodawać kroplami 10% roztwór izotiocyanianu potasu (KNCS). Powstaje dobrze rozpuszczalny w wodzie triizotiocyanian żelaza (III), związek o krwistoczerwonej barwie tzw. smocza krew.



7.12.3. Analiza ilościowa

7.12.3.1. Oznaczanie zawartości żelaza ogólnego i rozpuszczonego metodą wersenianową

Oznaczanie polega na miareczkowaniu kompleksometrycznym badanej próbki roztworem wersenianu sodu (EDTA) wobec wskaźnika, jakim jest kwas sulfosalicylowy. W tej metodzie wykorzystywana jest większa trwałość bezbarwnego związku kompleksowego żelaza w porównaniu z trwałością związku kompleksowego żelaza z kwasem sulfosalicylowym o zabarwieniu czerwonym. Metoda ta ma zastosowanie do oznaczania zawartości żelaza w wodach i ściekach w stężeniu powyżej 10 mg/dm³.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. stężony HCl;
2. roztwór HCl (1:10);
3. roztwór 20% kwasu sulfosalicylowego;
4. kwas solny (roztwór rozcieńczony 1:10);
5. 10% roztwór octanu sodu;
6. 2,5% roztwór amoniaku;
7. 25% roztwór amoniaku;
8. 0,005 M roztwór EDTA (rozpuścić 1,86 g EDTA w 1000 cm³ wody destylowanej);
9. woda utleniona (roztwór stężony H₂O₂);
10. łaźnia wodna, cylindry miarowe, kolby, biurety, pipety, pipety Pasteura.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej (o pojemności 200 cm³) pobrać 50 cm³ badanej próby. Dodać 2 cm³ stężonego kwasu solnego oraz kilka kropli wody utlenionej. Ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 3-5 minut.

Po ostygnięciu dodać 2 cm³ stężonego roztworu amoniaku (25%), po czym po kropli 2,5% roztworu amoniaku do pojawienia się słabego zmętnienia. Następnie dodawać kroplami roztwór kwasu solnego (1:10) do zaniku tego zmętnienia. W kolejnym etapie dodać 3 cm³ 10% roztworu octanu sodu oraz 3 cm³ 20% kwasu sulfosalicylowego.

Miareczkować roztworem EDTA do zmiany barwy z fioletowo-czerwonej na żółtą (słomkową).

Zawartość żelaza w próbce obliczyć według wzoru:

$$X_{\text{Fe}} = \frac{C \cdot a \cdot 1000}{V} \text{ (mg Fe/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

X_{Fe} – stężenie żelaza w próbce badanej;

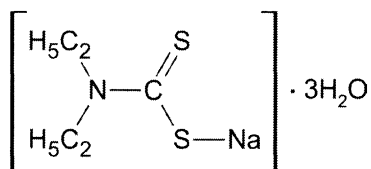
C – stężenie 0,005 M roztworu EDTA;

a – objętość roztworu EDTA zużyta do miareczkowania badanej próby (cm³);

V – objętość badanej próbki (50 cm³).

7.13. 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.



Rycina 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 sekundy, 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 zalkaliżować, 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 cm³ badanego roztworu dodać 0,5 cm³ 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.

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 7.1. 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
brunatno-żółta	Co
zielono-żółta	Ni
zielona	Co
niebieska	Cr
brunatna	Ru, Os, Au
intensywnie żółto-brunatna	Cu
intensywnie fioletowo-brunatna	Mn
intensywnie fioletowa	Mo
brunatnoczarna	Fe

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

Metal	pH ekstrakcji	Faza organiczna
Ag	pH=4-11	CCl ₄
	pH=0-10	CHCl ₃ + aceton (5:2)
As	pH=0-8	CHCl ₃
Bi	pH=4-11	CCl ₄
Cd	pH=1-10	CCl ₄
	pH=1-10	CHCl ₃ + aceton (5:2)
Co (III)	pH=4-11	CCl ₄
Co (II)	pH=0-10	CHCl ₃ + aceton (5:2)
Cr	pH=6	CHCl ₃
Cu	pH=4-11	CCl ₄
	pH=0-10	CHCl ₃ + aceton (5:2)
Fe	pH=4-11	CCl ₄
	pH=0-5	CHCl ₃
Hg	pH=4-11	CCl ₄
	pH=0-10	CHCl ₃
Mn	pH=6-9	CCl ₄
	pH=5,2	CHCl ₃
	pH=1,7	CHCl ₃ + aceton (5:2)

cd. Tabela 7.2.

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

7.14. Wykrywanie trucizn metalicznych metodą chromatografii cienkowarstwowej

W przypadku wykonania rozdzielania 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:

1. 0,5% wodny roztwór Na-DDTK;
2. chloroform cz.d.a.;
3. 3 M HCl;
4. stężony HCl cz.d.a.;
5. *n*-heksan – octan etylu (10:1) cz.d.a.;
6. *n*-heptan cz.d.a.;
7. aceton cz.d.a.;
8. amoniak;
9. acetyloaceton cz.d.a.;
10. 5% wodny roztwór KI;
11. siarczek sodu, roztwór 5%;
12. żel krzemionkowy;
13. pasta do uszczelniania komór – sporządzona z glinki białej i gliceryny;
14. roztwory podstawowe metali zawierające 10 mg metalu w 1 cm³ roztworu, w tym celu należy odważyć odpowiednie ilości soli i rozpuścić w 80 cm³ wody destylowanej i następnie uzupełnić wodą do 100 cm³:

CuSO ₄ ·5H ₂ O	- 3,9 g	Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	- 5,0 g
CdSO ₄	- 1,9 g	Bi(OH) ₃ NO ₃	- 1,5 g
K ₂ Cr ₂ O ₇	- 2,8 g	HgCl ₂	- 1,4 g
Pb(NO ₃) ₂	- 1,6 g	MnSO ₄ ·5H ₂ O	- 4,4 g
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	- 5,0 g	Na ₂ HAsO ₄	- 2,5 g

15. roztwory wzorcowe metali zawierające 1 mg metalu w 1 cm³ roztworu uzyskuje się poprzez 10-krotne rozcieńczenie wodą roztworów podstawowych;
16. zestaw chromatograficzny: komory, płytki, aparat do suszenia, rozpylacze, pipety lub kapilary do nanoszenia prób, bibuła.

WYKONANIE OZNACZENIA:

1. Mineralizacja i ekstrakcja metali z moczu

25 cm³ 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 cm³. 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 rozdzielnicy 10 cm³ roztworu. Dodawać 3M HCl do uzyskania pH~1, następnie dodać 1 cm³ roztworu Na-DDTK i ekstrahować 5 cm³ chloroformu. W warstwie chloroformowej powinny się znaleźć wszystkie metale z wyjątkiem manganu. Po oddzieleniu war-

stwy chloroformowej należy zmienić stężonym amoniakiem odczyn warstwy wodnej do $\text{pH}=6-9$, ponownie dodać 1 cm^3 Na-DDTK i 5 cm^3 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

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

3. Przygotowanie płytek i komór chromatograficznych

Do rozdzielania 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 rozdzielaczy wprowadzać kolejno po 10 cm^3 wody zakwaszonej 3 M HCl do wartości $\text{pH}\sim 1$. Następnie dodać po 1 cm^3 roztworów wzorcowych metali, 1 cm^3 0,5% roztworu Na-DDTK oraz po 5 cm^3 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 $\text{pH}=6-9$, uprzednio alkalizując roztwór soli za pomocą amoniaku. Następnie dodać 1 cm^3 Na-DDTK i 5 cm^3 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 cm³ 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_f można dokonać identyfikacji metali w badanym materiale biologicznym. Znając zawartość metali w roztworach wzorcowych można natomiast orientacyjnie oszacować ich ilość w analizowanej próbie na podstawie wielkości plam.

Płytką A: kompleksy dietyloditiokarbaminianu sodu z jonami Cu, Co, Ni posiadają charakterystyczne zabarwienie. Dla uwidocznienia plam Cd, Pb, Bi i Hg płytkę należy spryskać 5% wodnym roztworem KI, a następnie po wysuszeniu 5% roztworem siarczku sodu.

Płytką B: wywołanie plam Mn i Cr nie jest konieczne.

Płytką C: plama As uwidacznia się po upływie kilku minut bez wywoływania.

Barwy kompleksów metali z Na-DDTK oraz wartości R_f podane są w Tabeli 7.3.

Tabela 7.3. Wartości R_f i barwy kompleksów metali z Na-DDTK

Układ rozwijający	Barwa plam	R_f	Metal
A	jasnobrązowa	0,40-0,44	Cu
	jasnożółta	0,14-0,18	Cd
	brunatna	0,24-0,26	Pb
	jasnozielona	0,19-0,23	Co
	żółta	0,30-0,34	Ni
	brązowo-czerwona	0,13-0,16	Bi
	szara	0,39-0,41	Hg
B	bordowa	0,64-0,70	Mn
	żółta	0,36-0,42	Cr
C	zielona	0,85-0,90	As

7.15. Oddziaływanie metali na wzrost i parametry biochemiczne roślin

Rośliny pobierają pierwiastki głównie za pomocą systemu korzeniowego. Szkodliwość metali ciężkich u roślin objawia się: krótszymi i mniej rozgałęzionymi korzeniami, zanikiem i brązowieniem włóśników, spadkiem biomasy oraz zahamowaniem wzrostu korzeni. Metale ciężkie hamują podziały komórkowe oraz proces wydłużania młodych komórek merystematycznych. Utrudniają pobieranie substancji mineralnych oraz powodują zmiany morfologiczne pędów nadziemnych, a zwłaszcza liści (chloroza, plamy nekrotyczne, zmiany ubarwienia, zwiżanie liści), co prowadzi do spadku biomasy części nadziemnej. Metale ciężkie hamują procesy fotosyntezy i oddychania, powodują zaburzenia gospodarki wodnej i mineralnej, uszkodzenia kwasów nukleinowych, mutacje oraz ograniczają biosyntezę białek. Jednym z najgroźniejszych efektów działania metali ciężkich ze względu na niespecyficzność, reaktywność i właściwości powstających reakcji kaskadowych jest generowanie powstawania reaktywnych form tlenu, w tym wolnych rodników tlenowych i ich pochodnych, prowadzących do powstania znacznych uszkodzeń zarówno białek, lipidów, kwasów nukleinowych oraz innych składników żywej komórki. Wskaźnikiem stresu oksydacyjnego indukowanego metalami ciężkimi jest peroksydacja lipidów.

7.15.1. Założenie hodowli roślin traktowanych metalami ciężkimi

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory soli metali ciężkich (np. chlorek kadmu, azotan ołowiu, siarczan cynku, azotan baru, siarczan miedzi, chlorek żelaza) o stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$;
2. szalki Petriego;
3. bibuła filtracyjna;
4. nasiona rzeżuchy.

WYKONANIE:

Odliczyć 7 porcji po 50 nasion rzeżuchy i umieścić na szalkach Petriego wyłożonych podwójną warstwą bibuły filtracyjnej. Do 6 szalek kolejno wlać uprzednio przygotowane roztwory wodne metali ciężkich o takiej samej objętości. Do szalki siódmej dodać wodę destylowaną (kontrola). Szalki umieścić w fitotronie w temperaturze $25 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$ i mocy oświetlenia $50 \mu\text{mola}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR na okres 7 dni. Po tym okresie przeprowadzić obserwacje i określić: procent wykiełkowanych nasion, średnią długość pędu i korzenia, zawartość barwników fotosyntetycznych i białek oraz stopień peroksydacji lipidów u roślin traktowanych metalami w stosunku do kontroli.

7.15.2. Oddziaływanie metali na kiełkowanie nasion, wzrost roślin oraz zmiany morfologiczne

Zasadniczym kryterium jakości biologicznej nasion jest ich żywotność i wigor. **Żywotność nasion**, mierzona głównie zdolnością do kiełkowania, jest tylko wstępnym i przybliżonym wskaźnikiem możliwości produkcyjnych diaspor. **Wigor nasion** to: zdolność do szybkiego i równomiernego kiełkowania, dobre wschody, oraz rozwój normalnych siewek i roślin w szerokim zakresie czynników środowiskowych. Z rolniczego punktu widzenia wigor nasion charakteryzuje przyszłą wartość plonotwórczą (produktywność). **Wzrost roślin** to nieodwracalny proces przyrostu organizmu lub organu (np. pędu, korzenia).

WYKONANIE OZNACZENIA:

Po 7 dniach hodowli policzyć ilość wykiełkowanych nasion w każdej hodowli. Należy zwrócić uwagę na wygląd siewek rzeżuchy, barwę i liczbę liści. Następnie z każdej szalki losowo wybrać po 10 roślin, aby zmierzyć długość korzenia i pędu i obliczyć średnią. Zebrać wyniki z doświadczeń z całej grupy i zestawić w Tabeli 7.4. Wyznaczyć na wykresie wpływ metali na wymienione parametry morfologiczne w porównaniu z próbą kontrolną. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnąć wnioski dotyczące wpływu różnych metali na wzrost i kiełkowanie roślin rzeżuchy.

7.15.3. Wpływ metali ciężkich na zawartość barwników fotosyntetycznych w siewkach rzeżuchy

Analizę barwników chloroplastowych przeprowadza się po wyekstrahowaniu ich z tkanek roślinnych za pomocą rozpuszczalników organicznych.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. metanol;
2. łaźnia wodna, wykalibrowane probówki ze szlifem zamykane na korek, wagi analityczne, pipety Pasteura, spektrofotometr.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Zważyć po 1 pędzie rzeżuchy pochodzącej z hodowli kontrolnej i hodowli traktowanych metalami ciężkimi. Pędy umieścić w wykalibrowanych probówkach. Dodać po 5 cm³ metanolu, probówki zatkać korkami i owinąć folią aluminiową. Wstawić do łaźni wodnej na 30 minut o temperaturze 70 °C. Po wyjęciu z łaźni uzupełnić metanolem do 5 cm³. Metanolowy ekstrakt barwników przelać do kuwet (po 3,5 cm³). W spektrofotometrze odczytać wartość absorbancji wobec próby ślepej (metanol) przy następujących długościach fal: $\lambda=652,4 \text{ nm}$, $\lambda=665,2 \text{ nm}$ i $\lambda=470 \text{ nm}$. Zawartość barwników wyrażonych jako μg

na gram biomasy dla poszczególnych prób badanych obliczyć według następujących wzorów:

$$\text{Chl}_a = (16,72 \cdot A^{665,2} - 9,16 \cdot A^{652,4}) \cdot V/M,$$

$$\text{Chl}_b = (34,092 \cdot A^{652,4} - 15,28 \cdot A^{665,2}) \cdot V/M,$$

$$\text{Karat} = \left(\frac{1000 \cdot A^{470} - 1,63 \cdot \text{Chl}_a - 104,96 \cdot \text{Chl}_b}{221} \cdot V \right) / M,$$

gdzie:

- A – wartości absorbancji dla długości fal: 652,4 nm, 665,2 nm, 470 nm;
- Chl_a – stężenie chlorofilu a;
- Chl_b – stężenie chlorofilu b;
- Karat – stężenie karotenoidów;
- V – objętość metanolowego ekstraktu w cm³;
- M – biomasa poszczególnych pędów rzeźuchy w gramach.

Zebrać wyniki z doświadczeń z całej grupy i zestawić w Tabeli 7.4. Wyznaczyć na wykresie wpływ metali na zawartość barwników chloroplastowych w porównaniu z próbą kontrolną. Określić wpływ metali ciężkich na zawartość barwników fotosyntetycznych w pędach rzeźuchy w porównaniu z kontrolą.

7.15.4. Wpływ metali ciężkich na zawartość białek w siewkach rzeźuchy

Zmiany w zawartości białek w roślinach są wskaźnikiem zmian biochemicznych zachodzących pod wpływem stresów środowiskowych (np. zanieczyszczenie metalami ciężkimi). Ponadto rośliny w obecności metali syntezują małowcząsteczkowe białka (peptydy) wiążące i unieszkodliwiające metale (metalotioneiny).

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 1 M NaOH;
2. odczynnik miedziowy:
 - a) roztwór A: 2% Na₂CO₃ w 0,1 M NaOH,
 - b) roztwór B: 0,5% CuSO₄·5H₂O w 1% roztworze cytrynianu sodu (przygotować na świeżo, ponieważ kompleks soli ulega wytrąceniu po 1 dniu).

Przed wykonaniem oznaczenia roztwór A zmieszać z roztworem B w stosunku 50:1;

3. 1 N odczynnik Folina;
4. wzorzec albuminy: 30 mg liofilizowanej albuminy wołowej rozpuścić w 100 cm³ wody destylowanej;
5. łaźnia wodna, probówki, wagi analityczne, pipety, spektrofotometr, cylindry miarowe.

WYKONANIE EKSTRAKTU:

Zważyć po 1 pędzie rzeżuchy pochodzącej z hodowli kontrolnej i hodowli traktowanych metalami ciężkimi. Pędy umieścić w probówkach i dodać 2,5 cm³ 1 M roztworu NaOH. Probówki zatkać korkami bakteriologicznymi, włożyć do metalowego koszyka, owinąć folią aluminiową i całość wstawić do wrzącej łaźni wodnej (100 °C) na 10 minut. Po wyjęciu próbek ostrożnie oziębic pod strumieniem zimnej wody i następnie dodać 2,5 cm³ wody destylowanej. Z rozcieńczonego ekstraktu pobrać 0,5 cm³ do dalszych analiz.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do 0,5 cm³ prób badanych (ekstrakty białek pochodzące z kultur traktowanych metalami ciężkimi oraz kontroli), 0,5 cm³ próby ślepej (0,25 cm³ wody destylowanej + 0,25 cm³ 1 M NaOH) oraz 0,5 cm³ roztworu wzorcowego albuminy, dodać 2,5 cm³ odczynnika miedziowego (sporządzić bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń tj. zmieszać w stosunku 50:1 roztwór A z roztworem B). Bardzo dobrze wymieszać. Po 10 minutach stale mieszając dodać 0,25 cm³ 1 N odczynnika Folina. Próby odstawić na 30 minut, a następnie odczytać wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=750$ nm wobec próby ślepej.

Obliczyć stężenie białka w próbach badanych według wzoru:

$$C_p = (A_p \cdot C_w) / A_w ,$$

gdzie:

C_p – stężenie próby badanej;

C_w – stężenie wzorca albuminy (0,3 mg/cm³);

A_p – absorbancja próby badanej;

A_w – absorbancja próby wzorcowej.

Zebrać wyniki z doświadczeń z całej grupy i zestawić w Tabeli 74. Wyznaczyć na wykresie wpływ metali na zawartość białek w porównaniu z próbą kontrolną. Określić wpływ metali ciężkich na zawartość białek w pędach rzeżuchy w porównaniu z kontrolą.

7.15.5. Wpływ metali ciężkich na peroksydację lipidów w siewkach rzeżuchy

Metale ciężkie indukują stres oksydacyjny. Jest to stan, w którym dochodzi do zachwiania równowagi pomiędzy nadprodukcją wolnych rodników, a ich efektywnym usuwaniem przez enzymy antyoksydacyjne. Substancje wolnorodnikowe – reaktywne formy tlenu i reaktywne formy azotu mogą uszkadzać lipidy, białka i kwasy tłuszczowe. Obecnie uważa się, że najbardziej wiarygodnym markerem stresu oksydacyjnego jest **peroksydacja lipidów**. Jest to biologiczny proces utleniania lipidów, w którego wyniku powstają nadtlenki tych lipidów: aldehydy (np. dialdehyd malonowy, MDA), hydroksyaldehydy (4-hydroksynonenal) i węglowodory. Produkty tego procesu modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych, np. obniżają hydrofobowość lipidowego wnętrza błon, depolaryzują błony, zaburzają asymetrię lipidową błon, hamują aktywność enzymów błonowych oraz aktywność białek transportujących, co w konsekwencji może skutkować utratą integralności błon wewnątrzkomórkowych i błony plazmatycznej.

Poziom peroksydacji lipidów w biomacie roślinnej oznacza się jako zawartość MDA, który daje barwny produkt w reakcji z kwasem tiobarbiturowym.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,1% kwas trichlorooctowy (TCA);
2. 15% TCA w 0,25 M HCl (**roztwór A**);
3. 0,37% kwas tiobarbiturowy (TBA) w 0,25 M HCl (**roztwór B**);
4. spektrofotometr, łaźnia wodna, zlewki, cylindry miarowe, moździerz, wagi analityczne, pipety.

WYKONANIE EKSTRAKTU:

Zważyć po 1 pędzie rzeżuchy pochodzącej z hodowli kontrolnej i hodowli traktowanych metalami ciężkimi. Pędy umieścić

w mózdzierzach i homogenizować w 0,1% roztworze kwasu trichlorooctowego (TCA), stosując na 0,5 g biomasy 5 cm³ TCA. Homogenat przenieść do probówek wirówkowych i odwirować przez 10 minut przy obrotach 2000 rpm. Uzyskany supernatant użyć do dalszych oznaczeń. W tym celu z każdej próby badanej pobrać po 1 cm³ ekstraktu.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do nowych probówek wlewamy po 1 cm³ supernatantu (próby badane), 1 cm³ odczynnika A i 1 cm³ odczynnika B. Równolegle przygotować próby kontrolne:

- **próba kontrolna nr 1:** 1 cm³ H₂O zamiast próby badanej,
- **próba kontrolna nr 2:** 1 cm³ H₂O zamiast roztworu B.

Wszystkie próby (badane i kontrolne) dokładnie wymieszać, zamknąć korkiem, wstawić do koszyka, ogrzać w temp. 100 °C (łaźnia wodna) przez 10 minut. Próby ochłodzić, następnie odwirować (2000 rpm, 10 minut). Pobrać supernatant do pomiaru absorbancji w spektrofotometrze przy długości fali $\lambda=535$ nm względem pierwszej próby kontrolnej. Na koniec zmierzyć absorbancję drugiej próby kontrolnej. Od otrzymanych wartości absorbancji prób badanych odjąć absorbancję drugiej próby kontrolnej.

Peroksydację lipidów w biomacie oznacza się na podstawie zawartości MDA, który daje barwny produkt w reakcji z TBA. MDA uzyskuje się w wyniku hydrolizy 1,1,3,3-tetraetoksypropanu o stężeniu 0,1 mM pod wpływem 0,1 M roztworu HCl w temperaturze 50 °C. Absorbancja hydrolizatu wynosząca 31,800 przy długości fali $\lambda=267$ odpowiada 1 mM MDA. Roztwór należy rozcieńczyć do stężenia wynoszącego 10 μ M MDA. Następnie sporządzić serię próbek zawierających od 0 do 1 cm³ roztworu MDA, które należy dopełnić wodą destylowaną do objętości 1 cm³. Do tak przygotowanych próbek MDA dodać roztwory TCA i TBA, które tworzą z MDA barwny produkt reakcji. Próby gotować w łaźni wodnej w temperaturze 100 °C przez 10 minut, a następnie odczytać wartość absorbancji przy długości fali $\lambda=535$ nm względem pierwszej próby. Na podstawie uzyskanych wyników sporządzić krzywą wzorcową i odczytać zawartość MDA w próbach badanych.

Zebrać wyniki z doświadczeń z całej grupy i zestawić w Tabeli 7.4. Określić wpływ metali ciężkich na peroksydację lipidów w pędach rzeżuchy w porównaniu z kontrolą.

Tabela 7.4. Wpływ metali na wzrost i parametry biochemiczne rzeżuchy

Parametr	Metal					Kontrola
	Bar	Kadm	Miedź	Żelazo	Ołów	
% wykiełkowanych nasion						
Średnia długość pędu						
Średnia długość korzenia						
Zawartość chlorofilu <i>a</i>						
Zawartość chlorofilu <i>b</i>						
Zawartość karotenoidów						
Zawartość białek						
Peroksydacja lipidów						

7.15.6. Oznaczenie zawartości metali ciężkich w siewkach rzeżuchy

Zawartość metali w pędach i korzeniach rzeżuchy rosnącej na podłożu z dodatkiem metali oraz na wodzie destylowanej (kontrola) należy oznaczyć metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (patrz rozdział 7.16).

7.16. Oznaczanie zawartości wybranych metali w materiale biologicznym 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 różnorodnego materiału biologicznego. 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 otrzymanie z dużą wydajnością atomów z próbek analitycznych. Stosowane są różne techniki atomizacji, z których najbardziej popularne są **technika płomienna i bezpłomienna** (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 ng/cm^3 do $\mu\text{g/cm}^3$. System elektrotermiczny jest znacznie efektywniejszy przy przeprowadzaniu analitu w postaci wolnych atomów w fazie gazowej. Można też dozować znacznie mniejsze objętości próbki (10-50 μl). Technika tą można oznaczać stężenia rzędu od pg/cm^3 do ng/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 wzmacniony i przetworzony.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe metali o stężeniu 1 mg/cm^3 ;
2. 1% roztwór HNO_3 ;
3. spektrometr AAS, zestaw do mineralizacji, pipety, kolby miarowe o pojemności 50 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 cm³ HNO₃. Na podstawie wyników absorbancji uzyskanych dla prób wzorcowych wykreślić krzywą wzorcową. Z wykresu wzorcowego odczytać zawartość analizowanego metalu w pędach i korzeniach roślin. Wyprowadzić wnioski dotyczące akumulacji metali ciężkich w poszczególnych częściach rośliny oraz ustalić toksyczność metali u roślin na podstawie ich zawartości.

Tabela 7.5. Długości fal (λ) dla metali w pomiarach metodą AAS

Metal	λ (nm)	Metal	λ (nm)
Arsen	193,7	Magnez	285,2
Bar	553,6	Miedź	324,7
Chrom	357,9	Nikiel	232,0
Cyna	224,6	Ołów	283,3
Cynk	213,9	Rtęć	253,6
Glin	309,3	Selen	193,7
Kadm	228,8	Tal	276,8
Kobalt	240,7	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 20 800 alkaloidów (naturalnych i syntetycznych). Gromadzone są najczęściej w określonych, często peryferyjnych częściach rośliny, np. chinina występuje w korze drzew chinowych, kokaina 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, kodeina, 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 lecznictwie, np. kodeina jako lek przeciwkaszlowy czy morfina jako lek przeciwbólowy (długotrwałe stosowanie prowadzi do uza-

leżnienia – morfinizmu). Nasila się jednak nielecznicze 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 piperydyny (uwodnionej pirydyny), 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 ośrodków oddechowych. Objawy zatrucia koniina może spowodować nawet wachanie rośliny. W moździerzu porcelanowym należy rozetrzeć owoce lub kłącza szczwołu plamistego zwanego również cykutą (*Conium maculatum*) z niewielką ilością 20% roztworu KOH. Rozchodzi się zapach „mysiego moczu” charakterystyczny dla piperydyny.

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 sześcioczłonowe. Wytwarzana jest przez tytoń (*Nicotiana tabacum*, *N. rustica*), występuje w postaci bezbarwnego oleistego płynu, który na powierzchni żywicowacieje 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 częstotliwość tętna oraz podwyższa tętnicze ciśnienie krwi, przyspiesza akcję serca.

Dawka śmiertelna dla człowieka

dla człowieka 50-100 mg nikotyny.

Roztarte cygaro należy destylować z 20 cm³ roztworu Ca(OH)₂ z kolbki z chłodnicą destylacyjną do probówki. Bezbarwny, szybko żółknący destylat posiada zapach tytoniu. Pobraną kroplę destylatu zmieszać na szkiełku zegarkowym z kroplą mieszaniny 10% roztworu AuCl₃ i NaBr zmieszanej w stosunku 10:1. Następnie pod mikroskopem można obserwować powstawanie rombokatych 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 niezwykle 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 rozpuszczalną w wodzie. Gorzki smak strychniny utrzymuje się nawet w rozcieńczeniu 1:130000. Brucyna charakteryzuje się wyjątkowo gorzkim smakiem, wyczuwalnym w rozcieńczeniu 1:220 000, 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 H_2SO_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

wzmóŜona pobudliwość, bolesna sztywność karku, skurcz Źwaczy i utrudnione połykanie, skurcze tęŜcowe, 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 H_2SO_4 , następnie dodać do ekstraktu stężony HNO_3 . Powstaje intensywne czerwone zabarwienie, przechodzące stopniowo w Źółte, co świadczy o obecności **brucyny**.

Dawka śmiertelna dla człowieka

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

8.1.4. Wykrywanie alkaloidów glistnika jaskółczego ziele

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 naleŹy 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 Mar-

quisa (1 cm³ stężonego H₂SO₄ 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 układu oddechowego 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 wywołać przyzwyyczajenia.

Objawy zatrucia u 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 szkiełko podstawowe należy nanieść kroplę soku z korzenia glistnika jaskółczego ziela z kroplą stężonego HCl. Po skrzepnięciu powstają liczne kryształy alkaloidów o różnym kształcie i barwie, które obserwuje się pod mikroskopem. Sok mleczny glistnika jaskółczego ziela zawiera szereg barwnych i fluoryzujących alkaloidów, m.in. **berberynę, chelidoninę, chelerytrynę, sangwinarynę**. Związki te można rozdzielić metodą chromatografii bibułowej.

Pocięty, a następnie roztarty w moździerzu z niewielką ilością wyprażonego piasku korzeń glistnika jaskółczego ziela ekstrahować ciepłym alkoholem etylowym. Przesączony ciemnoczerwonobrunatny 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 pasmami **chelerytryny** ($R_f=0,35$);

karminowoczerwony pasek **sangwinaryny** ($R_f=0,4$); żółto-zielone 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 przeciwpierwotniakowo (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 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 żółto-zielony.

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 kola (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 cm³) – >100 mg kofeiny.

Kofeina 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 cm³ 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 igiełki kryształów kofeiny. Do niedużej ilości badanego osadu dodać 2 cm³ odczynnika Nesslerera. Ogrzewać w łaźni wodnej. W przypadku obecności kofeiny tworzy się obfity, czerwonobrunatny osad.

ODCZYNNIK NESSLERA: 6 g chlorku rtęci (II) rozpuścić w 50 cm³ ciepłej wody i dodać 50 cm³ 15% roztworu KI. Osad przemyć wodą, zdekantować i do osadu dodać 5 g stałego KI. Powstały roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 cm³, dodać 60 cm³ 30% roztworu NaOH, wymieszać i dopełnić do kreski. Po 24 godzinach zlać płyn z nad osadu do ciemnej butelki. **Można zakupić gotowy odczynnik Nesslerera.**

Objawy zatrucia u człowieka

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

Dawka śmiertelna dla człowieka

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 cykliczacji cząsteczki), w *N*-glikozydach rolę atomu tlenu spełnia atom azotu. *O*-glikozydy 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. migdałina – pierwszy wyizolowany w 1830 r. naturalny glikozyd), barwę (flawony, antocyjany). Wytwarzane są głównie w liściach, natomiast magazynowane są w korze, kłęczach, 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 cm³ kwasu octowego, 2 cm³ stężonego H₂SO₄ i 1 cm³ 5% roztworu FeCl₃. W obecności glikozydów występuje w komórkach zabarwienie turkusowoniebieskie lub ciemnoniebieskie (**reakcja Keller-Kiliani**).

Do skrawków liści zhydrolizowanych 1% etanolem roztworem H_2SO_4 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 nasycyonym roztworze winianu antymonylopotasowego na 1 godzinę. Glikozydy flawonoidowe wytrącają się w postaci żółtych osadów, podczas gdy garbniki tworzą drobne osady. Po przeniesieniu skrawków liści do 1% roztworu $FeCl_3$ na okres 1-12 godzin glikozydy nie zmieniają się, natomiast osady garbników przyjmują zabarwienie brunatne (**reakcja Jabłokowej-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 zielono-żółte do brunatnego.

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 wierzb (*Salix* sp.) umieścić w stężonym H_2SO_4 na 6-8 minut, następnie przenieść na ten sam czas do mieszaniny zawierającej stężony H_2SO_4 i 2% roztwór selenianu sodu (w stosunku 1:2). Preparat należy obserwować w czystym glicerolu. Komórki zawierające glikozydy – **salicynę** zabarwiają się na czerwono. Salicyna wykazuje słabe działanie przeciwgorączkowe.

Skrawki liści gruszy (*Pyrus communis*) umieścić w 30% roztworze 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 – antroń 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 ro-

dziny: motylkowate (*Papilionaceae*), marzanowate (*Rubiaceae*), trawy (*Gramineae*), kasztanowcowate (*Hippocastanaceae*). Wiele kumaryn działa słabo uspokajająco na ośrodkowy układ nerwowy, przeciwskurczowo, przeciwozbrzękowo, 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 rakotwórcze.

Skrawki kory kasztanowca (*Aesculus hippocastanum*) umieścić na kilka sekund w stężonym HNO₃, 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 cyjanowodor. 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 uwolnionego HCN jest niewielka, zatem nie zachodzi niebezpieczeństwo zatrucia. Niemniej jednak spożycie dużej ilości np. gorzkich migdałów może spowodować śmiertelne zatrucie. Przyjmuje się, że pojedynczy migdał gorzki zawiera około 1 mg HCN. Znane są przypadki zatrucia śmiertelnego 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% FeSO₄, 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⁻.

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 lecznictwie 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 H₂SO₄ i NaNO₃. W obecności saponin występuje w komórkach zabarwienie czerwono-krwiste (**reakcja Mitchella**). Do skrawków liści dodać kilka cm³ etanolowego roztworu stężonego H₂SO₄ i 1% FeCl₃. 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 cm³ wody, zmieszać z 10 cm³ 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 wyłaczanie. Do najbardziej znanych należą: anyżowy (anetol), cedrowy (seskwiterpeny), cynamonowy (aldehyd cynamonowy), cyprysowy (terpeny), eukaliptusowy (cyneol), goździkowy (eugenol), irysowy (iron), jałowcowy (α -piren), jodłowy (pinen), kminkowy (karwon), lawendowy (octan linalilu), miętowy (mentol), migdałowy (aldehyd benzoesowy), pomarańczowy (aldehyd decylowy), szafranowy (safrol), tymiankowy (tymol), z gałki muszkatołowej (izo-eugenol), 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 naparów, 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 herbatek ziołowych. Olejki mogą osłabiać aktywność enzymów trawiennych wywołując zaburzenia w czynnościach trawienia oraz objawy braku łaknienia.

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 chloralu) 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 łaźnią 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 proazuleniny 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 łaźni wodnej z 1,5 cm³ odczynnika EP przez 5-10 minut. W obecności proazulenów występuje zabarwienie zielone lub niebieskie.

ODCZYNNIK EP: 0,25 g *p*-dimetyloaminobenzaldehydu rozpuścić w mieszaninie 50 g kwasu octowego lodowatego i 5 g 85% H₃PO₄, następnie uzupełnić wodą do 100 cm³.

8.4. Garbniki

Garbniki są to niskocząsteczkowe organiczne związki chemiczne o charakterze fenolowym, które są bardzo rozpowszechnione w świecie roślinnym. W przypadku drzew występują one najczęściej w największych ilościach w korze oraz w strefie twardej. Można je znaleźć także w liściach, okrywkach nasion i owoców oraz naroślach, szczególnie takich jak galasy. Fizjologiczna rola garbników nie jest do końca poznana, ale wiadomo, że pełnią one rolę antyseptyków chroniących roślinę przed grzybami i owadami. Działanie bakteriobójcze (podobnie jak garbujące na skóry zwierzęce) polega na wiązaniu z substancjami białkowymi, z wytworzeniem związków nierozpuszczalnych. Garbniki rozpuszczają się w wodzie oraz w polarnych rozpuszczalnikach organicznych, np. w etanolu, acetonie i octanie etylu. Nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych, np. benzenie, chloroformie i eterze naftowym. Garbniki naturalne można podzielić, według produktów rozkładu otrzymanych podczas ich suchej destylacji, na:

1. pirogalowe;
2. pirokatechinowe.

Ze względu na budowę i właściwości substancji garbnikowych dzielimy je na:

1. hydrolizujące:
 - elagotanniny – estry kwasu elagowego i węglowodanów;
 - galatoniny – estry kwasu galusowego i węglowodanów;
 - depsydy – estry związków fenylokarboksylowych i związków niemających charakteru węglowodanowego;
 - glikozydy – glikon stanowi resztę polihydroksyfenylową;
2. skondensowane:
 - pochodne flawonowe;
 - pochodne hydrostilbenów;
 - o nieznanym budowie chemicznej.

Garbniki są czynnymi składnikami wielu surowców zielarskich takich, jak: kora dębu, kłącze pięciornika, kłącze wężownika, liść orzecha, kora oczaru, liść jeżyny, liść maliny. Otrzymuje się je w formie ekstraktów wodnych z części roślin. Jednym z najdawniej poznanych garbników roślinnych jest tanina chińska.

W medycynie, ze względu na działanie:

- **przeciwzapalne** wykorzystuje się je w leczeniu hemoroidów, podrażnień i zranień skóry. Stosowane na skórę garbniki działają ściągająco na powierzchniowe naczynia krwionośne obkurczając je i łagodząc obrzęki. Reagując z białkiem na powierzchni skóry tworzą na niej nierozpuszczalną w wodzie warstewkę ochronną, zabezpieczającą głębiej położone warstwy przed utratą wody, podrażnieniami i ułatwiają ich regenerację. Równocześnie działają lekko znieczulająco i przeciwświądowo;
- **przeciwbiegunkowe** stosowane są jako środki zapierające. Podawane doustnie działają ściągająco na błony śluzowe jelit, utrudniając przenikanie wody do ich światła i w ten sposób hamują rozrzedzanie treści jelitowej. Osłabiają też wydzielanie śluzu w jelitach;
- **bakteriobójcze i przeciwwirusowe** stosowane są w stanach zapalnych błon śluzowych i na rany. Garbniki działają bezpośrednio na drobnoustroje denaturując ich białka;
- **przeciwkrwotoczne** stosuje się je czasem w leczeniu nadmiernych krwawień. Garbniki powodują aglutynację czerwonych krwinek stymulując powstawanie skrzepów. Hamowanie krwawień wspomaga również działanie obkurczające na naczynia krwionośne.

Garbniki są stosowane również jako **odtrutka podczas zatruc**, ponieważ tworzą połączenia kompleksowe z toksycznymi alkaloidami lub solami metali ciężkich. Połączenia te mają jednak ograniczoną trwałość i z czasem mogą ulegać rozpadowi, co prowadzi do ponownego uwalniania toksyn. Dlatego po podaniu odtrutki zawierającej garbniki, wskazane jest podanie środków przeczyszczających. Należy również pamiętać, że stosowanie garbników w przypadku zatruc niektórymi alkaloidami i metalami (kokainą, atropiną, morfiną, arsenem, rtęcią) daje mierne rezultaty, z powodu słabego wiązania tych konkretnych toksyn.

Pełnią również ważną rolę w środowisku jako **chemiczna obrona roślin przed nadmiernym zgrzyzaniem przez zwierzęta roślinożerne**. Swoje właściwości odstrasżające zawdzięczają **cierpkiemu smakowi**, natomiast ich toksyczne działanie wiąże się ze zdolnością do **wiązania i denaturacji białek**.

8.4.1. Wykrywanie garbników w materiale roślinnym

Około 3 g herbaty zalać 50 cm³ wody destylowanej i gotować przez 10 minut. Otrzymany wywar przesączyć. Do 2 cm³ przesączu dodać kilka kropli 10% roztworu FeCl₃. Roztwór barwi się na kolor granatowo-czerwony w obecności garbników.

8.4.2. Wpływ garbników na denaturację białek

Do 2 cm³ przesączu dodać 1 cm³ roztworu żelatyny. W obecności garbników natychmiast powstaje zmętnienie jako wynik denaturacji białka.

8.4.3. Właściwości redukujące garbników

Do 2 cm³ 2,5% roztworu AgNO₃ dodawać kroplami 25% roztwór amoniakalny, aż do rozpuszczenia się osadu. Następnie dodać 1 cm³ przesączu, zagotować. Wytrąca się osad srebra.

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, odstraszenia lub hamowania rozwoju szkodników roślinnych i zwierzęcych. Obecnie stosuje się ponad 1000 aktywnych substancji w postaci 60 000 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 to:

- a) kierunek zastosowania i sposób działania;
- b) budowa chemiczna;
- 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.
2. 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.

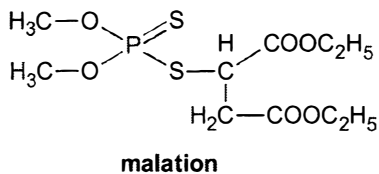
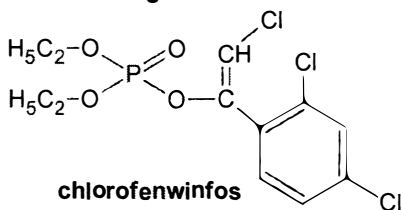
W praktyce stosuje się podziały chemiczno-użytkowe, pozwalające powiązać budowę związku z kierunkiem jego działania. Wyróżniamy przykładowo:

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

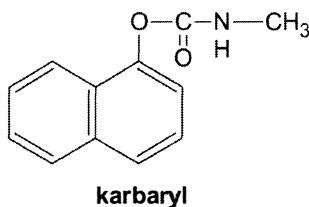
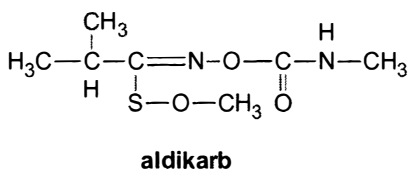
Wybrane wzory strukturalne pestycydów przedstawione zostały na Rycinie 9.1.

I. INSEKTYCYDY

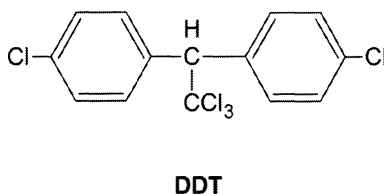
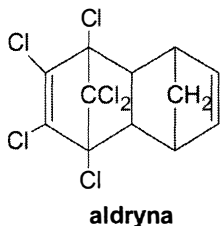
a. fosforoorganiczne



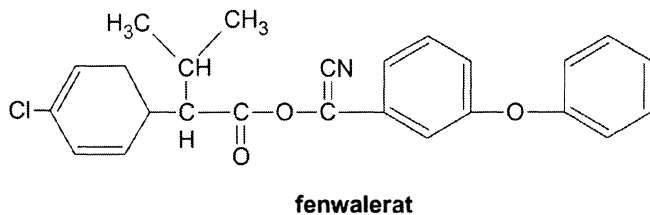
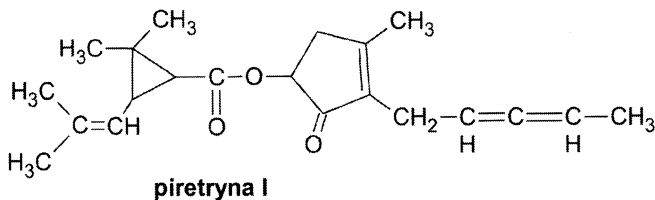
b. karbaminianowe



c. polichlorowe



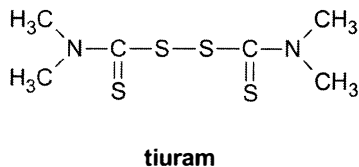
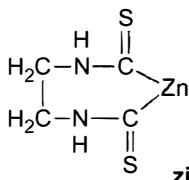
d. piretroidowe



Rycina 9.1a. Wybrane wzory strukturalne pestycydów z podziałem na insektycydy, fungicydy, herbicydy i rodentycydy

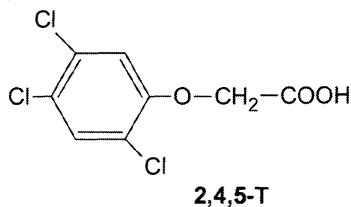
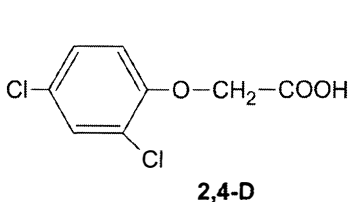
II. FUNGICYDY

a. ditiokarbamiiny

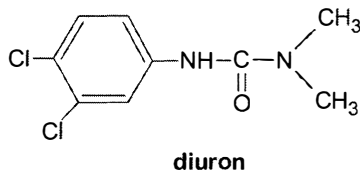
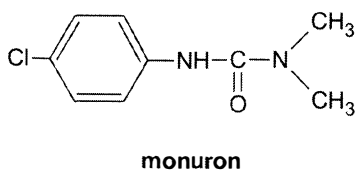


III. HERBICYDY

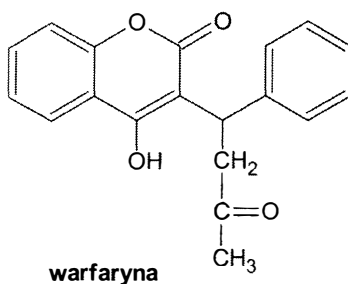
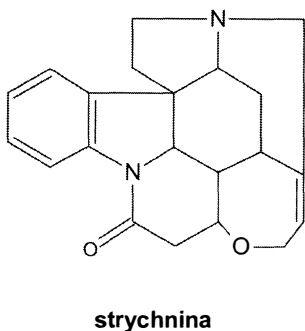
a. pochodne kwasu chlorofenoksyoctowego



b. pochodne mocznika



IV. RODENTYCYDY



Rycina 9.1b. Wybrane wzory strukturalne pestycydów z podziałem na insektycydy, fungicydy, herbicydy i rodentycydy

C. Podział pestycydów w zależności od stopnia toksyczności

Podstawą podziału jest średnia toksyczność ostra danego środka wyrażona wartością dawki LD₅₀ 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. Klasyfikacja toksykologiczna pestycydów według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Klasa toksyczności i jej określenie	LD ₅₀ dla szczura (mg/kg masy ciała)			
	doustnie		naskórnie	
	stałe *	ciekłe	stałe *	ciekłe
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

W Polsce na podstawie Ustawy o ochronie roślin z dnia 18.12.2003 r. (Dz. U. z 2004r. 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 ₅₀ (mg/kg masy ciała) dla szczura lub królika		LD ₅₀ (mg/dm ³ /4 godz.) dla szczura
	doustnie	naskórnie	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

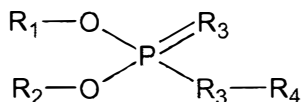
Wysoka toksyczność i brak selektywności pestycydów obligują użytkowników do przestrzegania:

- okresu karencji (czas od oprysku do zbioru plonu);
- przechowywania preparatów;
- niszczenia opakowań (nie dopuszczalne 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:

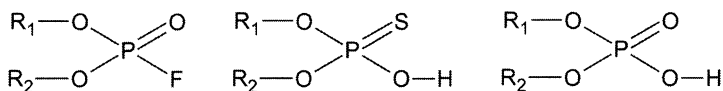
R_1 i R_2 – podstawniki alkilowe (najczęściej CH_3 lub C_2H_5);

R_3 – atom tlenu lub siarki;

R_4 – grupy kwasowe, chlorowec, grupa CN, reszty fenyłowe, podstawniki alifatyczne i arylowe.

Insektycydy fosforoorganiczne to krystaliczne ciała stałe lub oleiste ciecze 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 nastę-

puje wraz z wydłużaniem łańcuchów węglowodorowych R_1 i R_2 oraz w szeregu:



spadek toksyczności insektydów fosforoorganicznych ➔

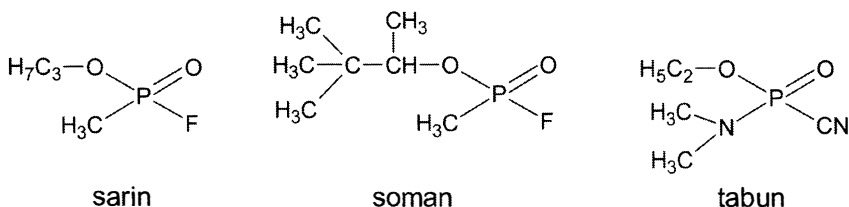
Charakterystykę toksyczności wybranych insektydów fosforoorganicznych przedstawiono w Tabeli 9.3.

Tabela 9.3. Charakterystyka toksyczności niektórych insektydów fosforoorganicznych

Nazwa zwyczajowa	LD ₅₀ 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

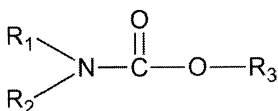
Niektóre insektycydy fosforoorganiczne o mniejszej toksyczności i lepszej rozpuszczalności w wodzie są stosowane w zabiegach sanitarnych i gospodarstwie domowym, np. trichlorfon. Do organizmu dostają się przez przewód pokarmowy, układ oddechowy, skórę i błony śluzowe, gdzie ulegają szybkim przemianom (nie kumulują się). Wszystkie insektycydy fosforoorganiczne są inhibitorami enzymów z grupy cholinnostraz, obecnych w większości tkanek ludzkich i zwierzęcych: mózg, 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 insektydów acetylocholina zapoczątkowuje działanie toksyczne. Ostre stany zatrucia kończą się śmiercią spowodowaną pora-

zeniem układu oddechowego i uduszeniem. Zatrucia insektydami 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_{50} 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 cholinoestraz. 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 teratogenicznie 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 ₅₀ dla szczura samca (mg/kg)		Klasa toksyczności
	doustnie	naskórnice	
Aldikarb	0,8	3,0	I
Izolan	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

Obejmują kilka dużych grup związków chemicznych – chloropochodne węglowodorów, fenoli i kwasów karboksylowych. Od połowy lat 70. 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, bischlorofenyłowe – **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 ₅₀ dla szczura samca (mg/kg)		Klasa toksyczności
	doustnie	naskórnie	
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: piretrołu, cynerolu i jasmolonu oraz kwasów: chryzantemowego 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. 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 przechowywaniu 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 ₅₀ dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Aletryna	620-1500	III
Cypermetyryna	251-500	III
Fenwalerat	450	III
Permetryna	1500-4000	IV
Rozmetryna	1400-1600	III

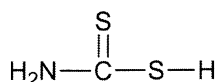
9.2.5. Fungicydy

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 grzybostatycznie. Hamują wówczas procesy rozwojowe grzybów w kontakcie bezpośrednim. Po usunięciu preparatu (spłukanie 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. Przypuszczalne 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 płciowych. Większość z nich utrzymuje się w organizmie do tygodnia (wyjątek: tiuram – do miesiąca) ulegając przemianom do bardziej toksycznych metabolitów (izotiocyaniany, etylenotiomocznik, CS₂, H₂S). 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 ₅₀ dla szczura samca (mg/kg)	Klasa toksyczności
	doustnie	
Maneb	7500	IV
Tiuram	865	IV
Zineb	5200	IV
Ziram	5000	IV
Rozmetryna	1400-1600	IV

9.2.6. Herbicydy

Herbicydy (środki chwastobójcze) pochodzenia naturalnego to głównie pochodne kwasu indoliloctowego (stymulator wzrostu komórek roślinnych), gibereliny (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).

Tabela 9.8. Charakterystyka toksyczności niektórych herbicydów

Nazwa zwyczajowa	LD ₅₀ 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
TTCCD	0,02-0,045		I
Monuron	3600		IV
Diuron	3400		IV
Linuron	1500-4000		IV

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 LD₅₀ wynosi 300-1000 mg/kg masy ciała dla różnych gatunków zwierząt doświadczalnych. Najbardziej wrażliwe są psy; LD₅₀ 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-tetrachlorodibenzodoksyny (TTCCD)**, która występuje jako zanieczyszczenie, stwierdzono również działanie teratogenne i rakotwórcze. Herbicydy należące do grupy związków pochodnych mocz-

nika i 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.

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 ₅₀ 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, działającą jako antagonistą witaminy K. Zatrucia objawiają się krwotokami. **Strychnina** to alkaloid występujący w nasionach kulczyby wroniego 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 $\text{pH}=7$, 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_2SO_4 , a następnie uwolnić od rozpuszczalnika do objętości 0,5-1 cm^3 . Pozostałość poddaje się analizie chromatograficznej. Wydajność ekstrakcji wynosi 80-90%.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe insektycydów fosforoorganicznych (chlorfenwinfosu, fenitrothionu, malationu, metyloparationu) o stężeniu 1 mg/cm^3 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_2 rozpuścić w kilku kroplach 25% HCl i uzupełnić wodą destylowaną do 100 cm^3 ;
 - odczynnik Tollensa – zmieszać 9 cm^3 5% roztworu AgNO_3 z 1 cm^3 25% roztworu amoniaku (aby wywołać chromatogram należy płytkę ogrzewać przez 10 minut w temperaturze 105 °C);

- jod;
 - 0,5% roztwór KMnO_4 ;
7. płytki chromatograficzne firmy Merck DC-Plastikrolle Kieselgell 60 F254, 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	Wywołывacz (zabarwienie plamy)				
		0,5% PdCl_2	pary jodu	odczynnik Tollensa	0,5% KMnO_4	lampa UV
Chlorfeninfos	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 $\text{pH}=7$. 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_2SO_4 , a następnie uwolnić od rozpuszczalnika do objętości 0,5-1 cm^3 . Pozostałość poddaje się analizie chromatograficznej. Wydajność ekstrakcji wynosi 90-100%.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe insektycydów karbaminianowych (aldikarbu, karbarylu, karbofuranu, propoksuru, pirymikarbu) o stężeniu 1 mg/cm^3 rozpuszczone w mieszaninie etanol-chloroform (1:1);
2. aceton;
3. cykloheksan;
4. eter dietylowy;
5. tetrachlorek węgla;
6. azydek sodu: 1 g azydku w 100 cm^3 $0,005 \text{ M/dm}^3$ roztworu KI;
7. Fast Blue B: 1 g Fast Blue B w 10 cm^3 9% etanolu;
8. 0,5% wodny roztwór KMnO_4 ;
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 $100 \mu\text{l}$ 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	Wywołувacz (zabarwienie plamy)		
		Azydek sodu	KMnO_4	lampa UV
Aldikarb	60	brązowa	żółta	fioletowa
Karbaryl	69	brązowa	-	fioletowa
Karbofuran	69	brązowa	żółta	fioletowa
Propoksur	72	brązowa	-	fioletowa
Pirymikarb	71	fioletowa	żółta	fioletowa

2. tetrachlorek węgla – kwas octowy lodowaty (8,5:1,5):

Wykrywany pestycyd	R_f	Wywoływalcz (zabarwienie plamy)	
		Fast Blue B	lampa UV
Aldikarb	-	-	-
Karbaryl	58	fioletowo-różowa	brązowa
Karbofuran	51	pomarańczowa	-
Propoksur	43	pomarańczowa	-
PirykARB	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 M/dm³ w HNO₃;
2. chloroform;
3. cykloheksan;
4. tetrachlorek węgla;
5. *p*-dimetyloaminoaniliny chlorowodorek, roztwór 0,5% w etanolu sodowym (1 g sodu w 100 cm³ 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 KMnO₄ w 10% NaCO₃;
11. rodamina B, roztwór 0,5% w etanolu;
12. Al₂O₃;
13. 10% roztwór NaCO₃;
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. Czułość metody wynosi 5 µg. Wartości R_f na płytkach pokrytych tlenkiem glinowym są następujące:

Wykrywany pestycyd	Faza ruchoma	R_f
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, cykloheksanem lub tetrachlorkiem węgla. Wartości R_f na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym są następujące:

Wykrywany pestycyd	Faza ruchoma	R_f
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

W celu uwidocznienia plam analizowanych substancji, płytki należy spryskać:

- a) **roztworem rodaminy B** – pestycydy widoczne są w nadfiolecie jako różowe fluoryzujące plamy;
- b) **10% roztworem NaCO_3** – 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_4 z dodatkiem Na_2CO_3** – 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 cm³ etanolu;
3. stężony H_2SO_4 ;
4. etanolewy roztwór wzorcowy *o*-fenylofenolu: 100 µg w 1 cm³;
5. roztwór buforowy o pH=10: 2,8 g bezwodnego tetraboranu sodu i 10,5 g NaCO_3 w 100 cm³ wody destylowanej.

WYKONANIE OZNACZENIA:

20 cm³ moczu zakwaszyć do pH=1 przy pomocy H_2SO_4 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 cm³ destylatu zebrać w ciągu 20-30 minut. 10 cm³ destylatu przenieść do 15-cm³ kolby miarowej i dodać 2,5 cm³ buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm³ etanolewego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Zawartość kolby uzu-

pełnić wodą destylowaną. Absorbancję zmierzyć przy długości fali 620 nm, używając jako próby ślepej wody destylowanej traktowanej analogicznie jak próba badana, tzn. 10 cm³ wody destylowanej przenieść do 15-cm³ kolby miarowej i dodać 2,5 cm³ buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm³ etanolowego roztworu 2,6-dibromochinonochlorimidu. Zawartość kolby uzupełnić ponownie wodą destylowaną. Próbę wzorcową wykonać w następujący sposób: 10 cm³ *o*-fenylofenolu przenieść do 15-cm³ kolby miarowej i dodać 2,5 cm³ buforu, zmieszać i następnie dodać 0,25 cm³ 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 cm³ formaliny w 5 cm³ 10% roztworu NaOH;
2. 0,5 % roztwór AgNO₃;
3. eter naftowy;
4. odczynnik utleniający: HNO₃ i H₂O₂ (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-chlorofenoksyoctowego (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 roz-

wijania 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 odczynnikami utleniającym. Po dokładnym osuszeniu płytkę naświetlić światłem UV. Identyfikację przeprowadzić przez porównanie wartości R_f plam związków poszukiwanych z wartościami R_f substancji wzorcowych (2,4-D i MCPA).

9.3.6. Test jakościowy wykrywania pirydylu w moczu

Substancje aktywne herbicydów (dikwat, parakwat) z grupy chemicznej pirydylu można wykryć metodą redukcji jonów błękitu lub zieleni z kwaśnym disiarczkiem sodu (NaHS_2) w warunkach alkalicznych. Szybki test polega na zmieszaniu ze sobą:

- 0,24 g kwaśnego disiarczku sodu NaHS_2 ;
- 0,15 g sproszkowanego buforu zasadowego;
- 0,61 g wodorowęglanu sodu NaHCO_3 .

Starannie wymieszane odczynniki (w sumie 1 g) umieścić w 10 cm³ moczu. Dokładnie wytrząsać, aż do momentu ich rozpuszczenia. Zabarwienie roztworu na zielono lub niebiesko wskazuje na obecność parakwatu lub dikwatu w moczu.

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;
7. spalanie odpadów w miejscach i obiektach do tego celu nie przystosowanych;
8. nawozy i środki ochrony roślin (Rycina 10.1).

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).

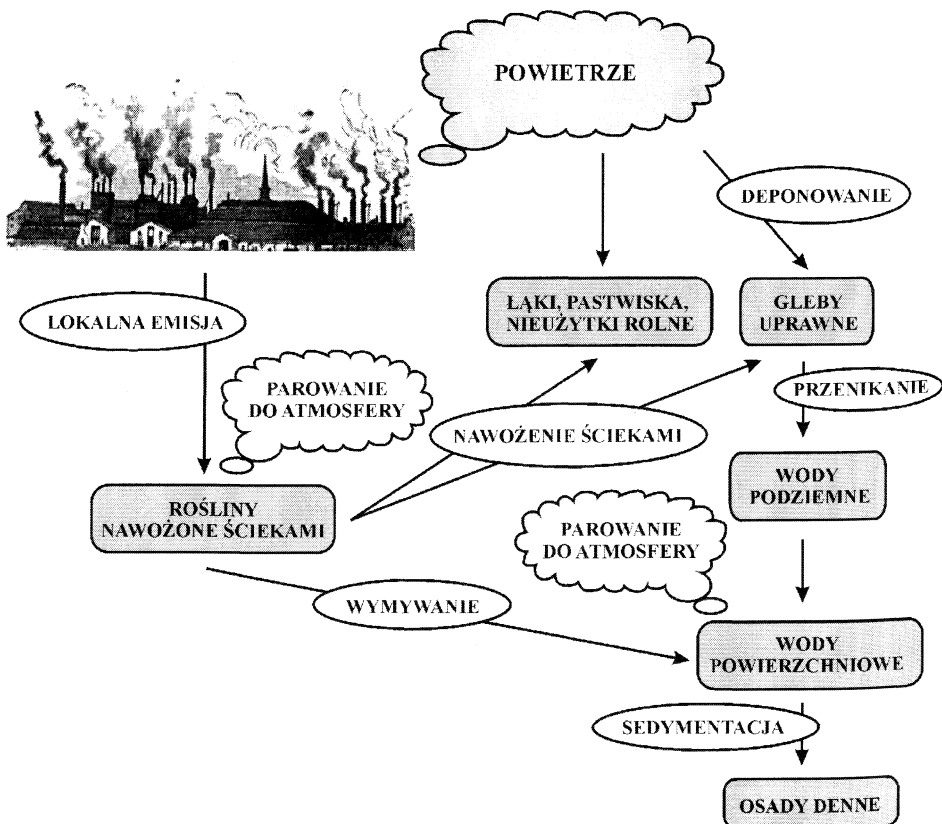
Stężenie substancji szkodliwych w środowisku zależy od wielkości emisji z danego źródła, a ponadto:

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.



Rycina 10.1. Drogi zanieczyszczenia środowiska

Działanie szkodliwe substancji toksycznych zależy m.in. 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.

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, doprowadzają 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:

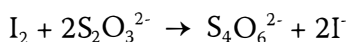
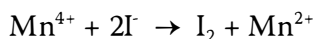
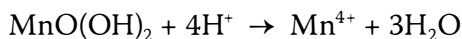
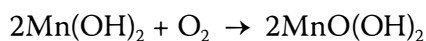
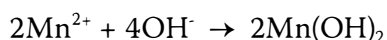
1. **zanieczyszczenia nieorganiczne**, rozpuszczalne w wodzie, np. azotany (III), azotany (V), ortofosforany (V), sole metali ciężkich, amoniak, które mogą występować nie tylko w postaci rozpuszczonej, ale także adsorbować się na cząstkach zawieszonych;
2. **zanieczyszczenia organiczne**, rozpuszczone lub zaadsorbowane, np. węglowodory, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, fenole, pestycydy;

3. **zanieczyszczenia radioaktywne** pochodzą z reaktorów jądrowych, z izotopów promieniotwórczych stosowanych w przemyśle, medycynie, np. ^3H , ^{226}Ra , ^{32}P , ^{60}Co , ^{90}Sr , ^{137}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 MnSO_4 ;
3. stężony H_2SO_4 cz.d.a.;
4. tiosiarczan sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) – roztwór mianowany o stężeniu 10 mM/dm³;
5. 0,5% roztwór skrobi;
6. biureta, strzykawki polietylenowe zaopatrzone w nakładane kapilary polietylenowe, kalibrowane na wlew butelki szklane.

WYKONANIE OZNACZENIA:

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 cm³ 40% roztworu MnSO₄ i 2 cm³ 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) umożliwiają 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 cm³ H₂SO₄, wprowadzając końcówkę strzykawki pod powierzchnię cieczy. Zamknąć butelkę, zwracając uwagę na to, aby nie pozostał pod nim pęcherzyk powietrza i nie wypłynął osad. Po wymieszaniu do całkowitego rozpuszczenia się osadu, całą zawartość butelki przelać do kolby Erlenmayera o pojemności 500 cm³ i natychmiast miareczkować roztworem tiosiarczanu sodu do uzyskania barwy jasnożółtej, a po dodaniu roztworu skrobi – do odbarwienia.

Stężenie tlenu (mg O₂/dm³) w badanej próbce wody obliczyć ze wzoru:

$$C_{O_2} = \frac{M_{O_2} \cdot c \cdot V}{f(V_{\text{but}} - f_1)},$$

gdzie:

- V_{but} – objętość butelki (dm³);
- V – objętość zużytego tiosiarczanu sodu (dm³);
- c – stężenie roztworu tiosiarczanu sodu (M);
- M_{O₂} – masa molowa tlenu;
- f₁ – objętość (cm³) dodanych roztworów MnSO₄ i alkalicznego KI (f₁=4·10⁻³);
- 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_{O_2} – oznaczona zawartość tlenu rozpuszczonego w badanej próbce wody ($\text{mg O}_2/\text{dm}^3$);

n – zawartość tlenu rozpuszczonego w wodzie destylowanej o temperaturze badanej próbki wody, potrzebna do nasycenia jej tlenem (Tabela 10.1).

Tabela 10.1. Ilość tlenu potrzebna do nasycenia 1 dm^3 wody destylowanej o temperaturze $^{\circ}\text{C}$, stykającej się z powietrzem o zawartości 20,9% tlenu pod ciśnieniem 1013 hPa

Temperatura wody ($^{\circ}\text{C}$)	Rozpuszczalność tlenu (n) ($\text{mg O}_2/\text{dm}^3$)	Temperatura wody ($^{\circ}\text{C}$)	Rozpuszczalność tlenu (n) ($\text{mg O}_2/\text{dm}^3$)
0	14,62	16	9,95
1	14,23	17	9,74
2	13,84	18	9,54
3	13,48	19	9,35
4	13,13	20	9,17
5	12,80	21	8,99
6	12,48	22	8,83
7	12,17	23	8,68
8	11,87	24	8,53
9	11,59	25	8,38
10	11,33	26	8,22
11	11,08	27	8,07
12	10,83	28	7,92
13	10,60	29	7,77
14	10,37	30	7,63
15	10,15		

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 ₂ /dm ³	7	6	5	4	< 4
BZT ₅	mg O ₂ /dm ³	2	3	6	12	> 12
ChZT-Mn	mg O ₂ /dm ³	3	6	12	24	> 24
ChZT-Cr	mg O ₂ /dm ³	10	20	30	60	> 60
Ogólny węgiel organiczny	mg C/dm ³	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 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.

Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen 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 $MnSO_4$;
3. stężony H_2SO_4 cz.d.a.;
4. tiosiarczan sodu ($Na_2S_2O_3$) – roztwór mianowany o stężeniu 10 mM/dm³;
5. 0,5% roztwór skrobi;
6. biureta, strzykawki polietylenowe zaopatrzone w nakładane kapilary polietylenowe, kalibrowane na wlew butelki szklane.

WYKONANIE OZNACZENIA

Dwie butelki inkubacyjne napełnić wodą do rozcieńczeń o znanej zawartości tlenu, zamknąć tak, aby nie zostawić pod korkiem pęcherzyka powietrza i wstawić do cieplarki 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 cieplarki. Po zakończeniu okresu inkubacji butelki wyjąć z cieplarki 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_2) w każdej butelce należy obliczyć za pomocą następujących wzorów:

$$O_{wt} = [O]_{wt} \cdot (V_{but} - V_{śc}),$$

$$O_{śc} = [O]_{śc} \cdot V_{śc},$$

$$O_k = \frac{M_{O_2} \cdot c \cdot V \cdot V_{but}}{f(V_{but} - f_1)},$$

a na ich podstawie obliczyć wartość BZT ($\text{mg O}_2/\text{dm}^3$) dla danego rozcieńczenia:

$$\text{BZT} = \frac{O_{\text{wt}} + O_{\text{śc}} - O_{\text{k}}}{V_{\text{śc}}},$$

gdzie:

- O_{wt} – zawartość tlenu końcowego w wodzie do rozcieńczeń (mg O_2);
- $O_{\text{śc}}$ – zawartość tlenu początkowego w ściekach (mg O_2);
- O_{k} – zawartość tlenu końcowego w inkubowanej próbce (mg O_2);
- $[O]_{\text{wt}}$ – stężenie tlenu w wodzie do rozcieńczeń po inkubacji (mg O_2);
- $[O]_{\text{śc}}$ – stężenie tlenu w ściekach do rozcieńczeń przed inkubacją (mg O_2);
- V_{but} – objętość butelki kalibrowanej na wylew (dm^3);
- $V_{\text{śc}}$ – objętość próby ścieków znajdująca się w butelce inkubowanej (dm^3),
- V – objętość titranta (dm^3);
- M_{O_2} – masa molowa tlenu;
- f_1 – objętość (dm^3) dodanych roztworów siarczanu manganu i alkalicznego jodku potasu ($f_1=4 \cdot 10^{-3}$);
- 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 ozna-

czenie należy wykonać w ściśle określonych warunkach, ustalonych w metodyce oznaczania, a przy wyniku podać stosowaną metodę.

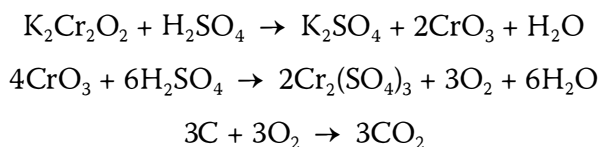
Oznaczenie ChZT można przeprowadzić kilkoma metodami, różniącymi się użytym utleniaczem:

- za pomocą dichromianu (VI) potasu ($K_2Cr_2O_7$) (**metoda dichromianowa**) – oznaczenie ChZTCr dla ścieków;
- za pomocą manganianu (VII) potasu ($KMnO_4$) (**metoda nadmanganianowa**) – oznaczenie ChZTMn w przypadku analizy wód;
- za pomocą jodanu potasu (**metoda jodanowa**).

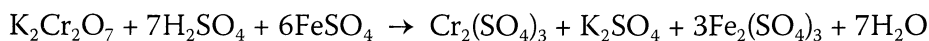
Wymienione metody stosowane są najczęściej do manualnego oznaczania ChZT. Polegają one na traktowaniu próbki wody lub ścieków nadmiarem utleniacza, reakcji utleniania związków w podwyższonej temperaturze przez okres do 2 godzin i miareczkowaniem nadmiaru utleniacza. Opracowano również kilka wersji instrumentalnego 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 siarczanu (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 siarczanu 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 ChZTCr polega na dodaniu do próbki wody, siarczanu rtęci (II) w ilości zależnej od stężenia jonów chlorkowych, nadmiaru mianowanego

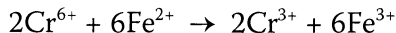
wodnego roztworu dichromianu (VI) potasu oraz stężonego H_2SO_4 z Ag_2SO_4 . Całość utrzymywana jest w stanie wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Utlenianie węgla przebiega ilościowo zgodnie z reakcją:



Początkowe stężenie $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ wynosi 7 M, natomiast H_2SO_4 – 9 M. Po ostudzeniu nadmiar dichromianu należy oznaczyć poprzez miareczkowanie roztworem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 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 g/dm^3 . Gdy badana próbka zawiera azotany (III), należy dodać 10 mg kwasu amidosulfonowego na 1 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 ChZTCr 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 °C i przechowywać w ciemności lub zakwaszić H_2SO_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 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ z katalizatorem HgSO_4 ;
4. 0,05 M roztwór soli Mohra – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$;
5. roztwór ferroiny (wskaźnik);
6. pipety, kolba Erlenmayera, cylindry miarowe, biureta.

WYKONANIE OZNACZENIA:

a) mianowanie roztworu soli Mohra

Do kolby stożkowej odmierzyć 90 cm^3 wody destylowanej i $27 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$. Roztwór oziębić. Dodać 10 cm^3 mianowanego roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 5 kropli ferroiny i miareczkować roztworem soli Mohra do zmiany zabarwienia z zielono-niebieskiego na czerwono-brunatne. Mianowanie należy przeprowadzić każdorazowo w dniu oznaczania ChZT;

b) oznaczenie ChZT w próbie badanej

Do kolby dokładnie odmierzyć 10 cm^3 badanej próby oraz 10 cm^3 roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ z HgSO_4 . Następnie ostrożnie wlać po ścianie kolby $27 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$ 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 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 cm^3 wody destylowanej zamiast próby badanej. Stężenie roztworu soli Mohra (CFe) zużytej na miareczkowanie próby badanej obliczyć według wzoru:

$$C_{\text{Fe}} = \frac{f \cdot C_{\text{Cr}} \cdot V_{\text{Cr}}}{V_{\text{Fe}}},$$

gdzie:

- f – współczynnik równoważności wynikający z równania reakcji redoks ($f=6$);
- C_{Cr} – stężenie roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ użytego do miareczkowania (M);
- V_{Cr} – objętość roztworu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ użytego do miareczkowania (cm^3);
- V_{Fe} – objętość roztworu soli Mohra użyta na miareczkowanie (cm^3).

Wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) obliczyć z równania:

$$\text{ChZT} = \frac{M_{\text{O}_2} \cdot (V_{\text{Fe}}^{\text{sl}} - V_{\text{Fe}}^{\text{pr}})}{f \cdot V_{\text{pr}}},$$

gdzie:

- M_{O_2} – masa molowa tlenu;
- $V_{\text{Fe}}^{\text{sl}}$ – objętość roztworu soli Mohra zużyta na miareczkowanie próby ślepej (cm^3);
- $V_{\text{Fe}}^{\text{pr}}$ – objętość roztworu soli Mohra zużyta na miareczkowanie próby badanej (cm^3);
- f – współczynnik równoważności wynikający z równania reakcji redoks ($f=4$);
- V_{pr} – objętość badanej próby wody lub ścieków (cm^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). Oznaczenie zawartości ogólnej węgla organicznego (OWO) pozwala także określić zawartość związków organicznych. Wykazano istnienie korelacji pomiędzy OWO a BZT i ChZT. Biochemiczne zapotrzebowanie na tlen 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 spaleniu związków organicznych do ditlenku węgla, który oznacza się następującymi metodami: miareczkową, 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 °C) – wspomaganie katalizatorami, takimi jak: Pd, Pt, CuO, CuO/Fe, BaCrO₄, Al₂O₃ lub V₂O₃. Przy oznaczeniu zawartości węgla organicznego metodą spalania związków organicznych należy wcześniej usunąć węgiel nieorganiczny lub równoległe 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 zawieszynie);
- lotny węgiel organiczny (LWO) (lotne substancje organiczne).

Metoda spektrofotometrii w podczerwieni pozwala na oznaczenie zawartości węgla organicznego i nieorganicznego w zakresie 1-1000 mg/dm³ C. W przypadku większych stężeń należy próbkę rozcieńczyć, natomiast mniejszych – zagęścić lub wprowadzać do aparatu pomiarowego próbki o większych objętościach.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. wzorcowe roztwory węgla organicznego:
 - A. rozpuścić 0,5571 g bezwodnego szczawianu sodu w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm³ (1 cm³ zawiera 0,1 mg C_{org.});
 - B. rozpuścić 0,2128 g bezwodnego wodoroftalanu potasu w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm³ (1 cm³ zawiera 0,1 mg C_{org.});
2. wzorcowe roztwory węgla nieorganicznego: rozpuścić 0,35 g NaHCO₃ i 0,4418 g Na₂CO₃ w wodzie 2-krotnie destylowanej w kolbie miarowej do objętości 1000 cm³ (1 cm³ zawiera 0,1 mg C_{nieorg.});

Roztwory wzorcowe są nietrwałe, należy je sporządzać bezpośrednio przed oznaczaniem.

3. tlen lub powietrze niezawierające CO₂ i związków organicznych;
4. stężony HCl;
5. woda 2-krotnie destylowana;
6. analizator ogólnego węgla organicznego, mikser do homogenizowania próbek wody, mieszało magnetyczne, strzykawki o pojemności 0-50, 0-500 cm³.

WYKONANIE KRZYWEJ WZORCOWEJ:

Do kolb miarowych o pojemności 100 cm³ odmierzyć kolejno: 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 i 100 cm³ 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/dm³ węgla. Z uzyskanych pomiarów w spektrofotometrze na podczerwień (lub analizatorze 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 2 godziny po pobraniu. Jeżeli oznaczenia nie można przeprowadzić bezpośrednio, próbkę należy zakwasić do pH≤2, np. za pomocą stężonego HCl lub H₂SO₄.

Do kanału C_{org.} analizatora ogólnego węgla organicznego wprowadzić 0,02 cm³ próby badanej (oznaczenie zawartości węgla organicznego i nieorganicznego). Do kanału C_{nieorg.} analizatora wstrzyknąć kolejne 0,02 cm³ 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. Oznaczenie zawartości ditlenku węgla w wodzie

Ditlenek węgla występuje prawie we wszystkich wodach naturalnych. W wodach powierzchniowych pochodzi on głównie z procesów przemian organizmów żywych (głównie glonów) i rozkładu związków organicznych. W wodach podziemnych ditlenek węgla może pochodzić z procesów przemian formacji geologicznych. Jego obecność jest niepożądana ze względu na właściwości korozyjne w stosunku do betonu i metali. Ditlenek węgla może występować w wodzie jako wolny i związany. Wolny ditlenek węgla występuje w wodzie w postaci rozpuszczonej. Natomiast związany występuje w związkach jako wodorowęglany i węglany. Głównym źródłem ditlenku węgla w wodzie są zwierzęta, a właściwie ich oddychanie (proces fotosyntezy redukuje ilość CO_2 i wytwarza m.in. tlen). Drugim ważnym źródłem są zanieczyszczenia powietrza.

Metoda oznaczania ditlenku węgla w wodzie polega na oznaczeniu sumy zawartego w wodzie CO_2 i H_2CO_3 .

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 30% roztwór winianu sodowo-potasowego;
2. 35% roztwór tiosiarczanu (VI) sodu;
3. 1% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny;
4. 0,1 M roztwór NaOH;
5. cylindry miarowe, zlewki, pipety Pasteura, pipety, kolby stożkowe, biurety.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej ze szlifem odmierzyć 100 cm^3 badanej wody. Dodać 2 cm^3 30% roztworu winianu sodowo-potasowego i 5 cm^3 35% roztworu tiosiarczanu(VI)sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) w celu wyeliminowania z wody czynników przeszkadzających w oznaczeniu (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}). Następnie dodać 1 cm^3 fenoloftaleiny (1%) i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez 3 minuty. Podczas miareczkowania zawartość kolby wstrząsnąć po dodaniu kolejnej porcji odczynnika NaOH. Powtórzyć miareczko-

wanie dodając od razu do badanej wody porcję roztworu NaOH zmniejszoną o $0,1 \text{ cm}^3$, a następnie domiareczkować do lekko różowego zabarwienia utrzymującego się krócej niż 3 minuty. Za wynik miareczkowania przyjąć objętość roztworu NaOH zużytego przy drugim miareczkowaniu. Zawartość wolnego ditlenku węgla (X) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{V_1 \cdot 4,4 \cdot 1000}{V} (\text{mgCO}_2/\text{dm}^3),$$

gdzie:

- V_1 – objętość 0,1 M roztworu NaOH zużyta do miareczkowania próbki (cm^3) (drugie miareczkowanie);
- V – objętość badanej próbki wody (cm^3);
- 4,4 – liczba mg wolnego CO_2 odpowiadająca 1 cm^3 0,1 M roztworu NaOH.

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce, a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.6. 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 ($^\circ\text{n}$) lub miligramrównoważnik (mval/dm^3), które wynoszą: $1^\circ\text{n} = 10 \text{ mg}/\text{dm}^3 \text{ CaO}$ lub $17,84 \text{ mg}/\text{dm}^3 \text{ CaCO}_3$; $1 \text{ mval}/\text{dm}^3 = 20,04 \text{ mg}/\text{dm}^3 \text{ CaO}$ lub $50,04 \text{ mg}/\text{dm}^3 \text{ CaCO}_3$. Opisowe określenia skali twardości wody przedstawia Tabela 10.3.

Tabela 10.3. Skala twardości wody

Stopnie twardości (°n)	mg/dm ³ CaCO ₃	mval/dm ³	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.

Próbkę wody przeznaczoną do pomiaru twardości wody należy analizować w ciągu 24 godzin od pobrania. Jeżeli oznaczenia nie można przeprowadzić bezpośrednio, próbkę należy zakwasić do $\text{pH} \leq 2$, np. za pomocą stężonego HCl lub H₂SO₄. Umożliwia to przechowywanie próby przez okres miesiąca.

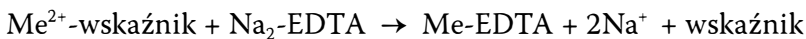
Najdokładniejszą metodą określenia twardości wody jest obliczenie jej na podstawie wyników oznaczania wapnia i magnezu (**metoda obliczeniowa**). W przypadku, gdy w badanej wodzie występują w znacznych ilościach inne kationy wpływające na twardość, należy koniecznie oznaczyć ich stężenie. Twardość wody 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/dm³.

Tabela 10.4. Współczynniki przeliczeniowe do obliczania twardości wody

Kation	Mnożnik	Kation	Mnożnik
Ca ²⁺	0,04990	Fe ³⁺	0,05372
Mg ²⁺	0,08224	Al ³⁺	0,11120
Sr ²⁺	0,02282	Zn ²⁺	0,03059
Fe ²⁺	0,03581	Mn ²⁺	0,07281

Metoda wersenianowa stosowana jest do oznaczeń twardości ogólnej wody powyżej 0,357 mval/dm³ (1 stopień twardości, 17 mg/dm³ CaCO₃). Z kolei wody naturalnej o twardości wody równej lub mniejszej od 0,357 mval/dm³ 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:

1. 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g Na₂-EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm³;
2. 0,1 M roztwór HCl;
3. bufor amoniakalny (pH=10): rozpuścić 26,8 g NH₄Cl w 100 cm³ wody destylowanej i mieszać z 300 cm³ 25% roztworu NH₄OH; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50 cm³ 0,05 M roztworu MgSO₄ oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M Na₂-EDTA, którą należy określić przez zmiareczkowanie roztworu MgSO₄. Dodać 5 cm³ roztworu buforowego do 100 cm³ wody destylowanej i zmierzyć odczyn tego roztworu (pH=10);
4. czern eriochromowa T (wskaźnik): rozetrzeć 0,5 g czerni eriochromowej T ze 100 g NaCl;
5. siarczek sodu: rozpuścić 5 g Na₂S·9H₂O lub 3,7 g Na₂S·5H₂O w 100 cm³ wody destylowanej;
6. 1% roztwór chlorowodoru hydroksylaminy;
7. pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć odpowiednią ilość wody taką, by na jej miareczkowanie nie trzeba było zużyć więcej niż 15 cm³ roztworu wersenianu sodu. Orientacyjnie można przyjąć, że dla zakresu twardości > 20 mval/dm³ należy odmierzyć do oznaczania 25 cm³ wody, dla twardości 10-20 mval/dm³ – 100 cm³ wody, dla twardości 5-10 mval/dm³ – 200 cm³ wody, a dla twardości 0,357-5 mval/dm³ – 250 cm³ wody. Próbkę wody mniejszą niż 50 cm³ 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 cm³ 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 cm³ roztworu buforowego na każde 50 cm³ roztworu w kolbie, a następnie tak samo na każde 50 cm³ po 1 cm³ roztworu chlorowodoru hydroksylaminy i po 0,1 cm³ roztworu siarczku sodu oraz 0,1 g wskaźnika czerni eriochromowej T. Natychmiast miareczkować 0,01 M roztworem Na₂-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 (TW) obliczyć według wzoru:

$$T_w = \frac{V \cdot 0,02 \cdot 1000}{V_{pr}} \text{ (mval/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na₂-EDTA zużyta do miareczkowania próbki (cm³);
- V_{pr} – objętość badanej próbki (cm³);
- 0,02 – współczynnik przeliczeniowy określający ilość wapnia odpowiadającą 1 cm³ 0,01 M roztworu Na₂-EDTA (cm³).

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 naturalnych, 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:

1. 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm^3 ;
2. 1 M roztwór NaOH;
3. mureksyd (wskaźnik): rozetrzeć 0,2 g mureksydu ze 100 g NaCl;
4. pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 50 cm^3 badanej wody. Dodać 2 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 równoległe wykonanych oznaczeń różniących się objętością zużytego titranta nie większą niż 0,1 cm^3 .

Stężenie wapnia (C_{Ca}) w wodzie obliczyć według wzoru:

$$C_{\text{Ca}} = \frac{V \cdot 0,4008 \cdot 1000}{V_{\text{pr}}} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ zużyta do miareczkowania próbki (cm^3);
- V_{pr} – objętość badanej próbki (cm^3);
- 0,4008 – współczynnik przeliczeniowy określający ilość wapnia odpowiadającą 1 cm^3 0,01 M roztworu $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (cm^3).

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 CaCO ₃ /dm ³	> 200	100	20	10	< 10
Siarczany	mg SO ₄ /dm ³	100	150	250	300	> 300
Chlorki	mg Cl/dm ³	100	200	300	400	> 400
Wapń	mg Ca/dm ³	50	100	200	400	> 400
Magnez	mg Mg/dm ³	25	50	100	200	> 200
Fluorki	mg F/dm ³	0,5	1,0	1,5	1,7	> 1,7

b) oznaczanie zawartości magnezu:

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 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 cm³ 25% roztworu NH₄OH i dopełnić do 250 cm³;
2. bufor amoniakalny (pH=10): rozpuścić 26,8 g NH₄Cl w 100 cm³ wody destylowanej i zmieszać z 300 cm³ 25% roztworu NH₄OH; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50 cm³ 0,05 M roztworu MgSO₄ oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M Na₂-EDTA, którą należy określić przez zmiareczkowanie roztworu MgSO₄. Dodać 5 cm³ roztworu buforowego do 100 cm³ wody destylowanej i zmierzyć odczyn roztworu;
3. czerń eriochromowa T (wskaźnik): rozetrzeć 0,5 g czerni eriochromowej T ze 100 g NaCl;
4. 0,01 M roztwór wersenianu sodu: 18,6 g Na₂-EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm³;
5. pehametr, pipety, biureta, kolby stożkowe.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 100 cm³ badanej wody, dodać 25 cm³ roztworu szczawianu amonu i chlorku amonu, następnie dokładnie wymieszać. Wytrącony szczawian wapnia odsączyć ilościowo przez suchy sączek do suchego naczynia. Z przesączu odmierzyć 50 cm³ do kolby stożkowej, dodać 2,5 cm³ roztworu buforowego oraz 0,1 g wskaźnika czerni eriochromowej T. Miareczkować 0,01 M roztworem Na₂-EDTA do zmiany barwy

z czerwonej przez fioletową do błękitnej. Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną z 3 równoległe wykonanych oznaczeń różniących się objętością zużytego titranta nie większą niż $0,1 \text{ cm}^3$.

Stężenie magnezu (C_{Mg}) w wodzie obliczyć według wzoru:

$$C_{\text{Mg}} = \frac{V_1 \cdot 0,243 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_{\text{pr}}} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- V_1 – objętość 0,01 M roztworu $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 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 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (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 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 nadającym 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 cm³ badanej wody. Dodać 2-3 krople roztworu oranżu metylowego i miareczkować 0,1 M roztworem HCl do zmiany barwy na żółto-różową. W celu usunięcia CO₂ z miareczkowanej próbki 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 żółto-różowe. Jeśli zabarwienie nie ulegnie zmianie na skutek ogrzewania można uznać oznaczenie za zakończone.

Zasadowość wody (Z_m) obliczyć według wzoru:

$$Z_m = \frac{V \cdot 100}{V_{pr}} \text{ (mval/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

V – objętość 0,1 M roztworu HCl zużyta do miareczkowania próbki (cm³);

V_{pr} – objętość badanej próbki (cm³).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.8. 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 hydrolicznie niektórym soli, np. FeSO₄. 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 cm³ 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:

$$X_{og} = \frac{V \cdot 50}{V_{pr}} \text{ (mval/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

V – objętość 0,05 M roztworu NaOH zużyta do miareczkowania próbki (cm³);
 V_{pr} – objętość badanej próbki (cm³).

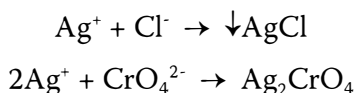
10.2.9. Oznaczanie zawartości chlorków w wodzie

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 AgNO₃ wobec K₂CrO₄ 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 AgNO_3 ;
2. 5% roztwór K_2CrO_4 (wskaźnik);
3. 2 M roztwór H_2SO_4 ;
4. 1 M roztwór 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 H_2SO_4 lub NaOH . Następnie odmierzyć 100 cm^3 badanej wody dodać kilka kropli wskaźnika i miareczkować 0,1 M roztworem 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 cm^3 .

Ze wzoru obliczyć objętość jonów chlorkowych (X_{Cl^-}):

$$X_{\text{Cl}^-} = \frac{V \cdot C \cdot M_{\text{Cl}^-}}{V_{\text{pr}}} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

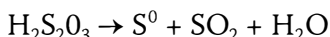
gdzie:

- V – objętość roztworu AgNO_3 zużyta do miareczkowania (cm^3);
- C – stężenie roztworu AgNO_3 zużytego do miareczkowania (M);
- M_{Cl^-} – masa molowa jonu chlorkowego;
- V_{pr} – objętość badanej próbki wody (cm^3).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.5), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.10. Oznaczanie zawartości tiosiarczanów w wodzie

Anion tiosiarczanowy jest resztą kwasową kwasu tiosiarkowego ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$), który w stanie wolnym nie jest znany, gdyż ulega natychmiastowemu rozkładowi z wydzieleniem siarki i dwutlenku siarki:



Sole kwasu tiosiarkowego (tiosiarczany) są trwałe. Większość tiosiarczanów rozpuszcza się w wodzie. Do nierozpuszczalnych w wodzie należą: $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$, BaS_2O_3 , CuS_2O_3 oraz PbS_2O_3 . Tiosiarczany mają właściwości redukujące, gdyż anion tiosiarczanowy utlenia się pod wpływem silnych utleniaczy do anionu SO_4^{2-} , a wobec słabych utleniaczy – do anionu czterotlionianowego – $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$. Tiosiarczan sodu często jest używany w analizie chemicznej (jodometria). Jest jedną z odtrutek na cyjanek potasu.

Zasada oznaczania tiosiarczanów polega na zmiareczkowaniu ich jodem w środowisku kwasu octowego wobec skrobi jako wskaźnika.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. gliceryna cz.d.a.;
2. 10% roztwór siarczanu cynku;
3. 10% roztworu węglanu sodu;
4. 35-40% roztwór formaldehydu;
5. 10% roztwór kwasu octowego;
6. 0,5% roztwór skrobi;
7. 0,1 M roztwór jodu;
8. cylindry miarowe, kolby stożkowe, sączi, lejki, pipety, biurety.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do kolby stożkowej odmierzyć 100 cm^3 badanej wody, dodać 10 cm^3 gliceryny. Następnie dodać 20 cm^3 świeżo przygotowanej zawiesiny węglanu cynku (w tym celu zmieszać ze sobą 10 cm^3 10% roztwór siarczanu cynku z 10 cm^3 10% roztworu węglanu sodu). Kolbę bardzo dobrze wymieszać. Następnie zawartość kolby przesączyć przez sącze. Do nowej kolby pobrać 50 cm^3 przesącza, dodać $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu formaldehydu, 20 cm^3 10% roztworu kwasu octowego oraz 1 cm^3 0,5% roztworu skrobi. Kolbę dobrze wymieszać. Całość zmiareczkować 0,1 M roz-

tworem jodu do wystąpienia trwałego, wyraźnie niebieskiego zabarwienia.

Stężenie tiosiarczanów (X_{Ti}) w wodzie obliczyć według wzoru:

$$X_{Ti} = \frac{a \cdot f \cdot 200 \cdot 1,12 \cdot 1000}{V_1 \cdot V_2} \text{ (mg S}_2\text{O}_3\text{/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

a – objętość roztworu jodu użytego do zmiareczkowania próby;

f – współczynnik przeliczeniowy wynoszący dla jodu 8,806;

V_1 – objętość próbki wody pobranej do badania (cm^3);

V_2 – objętość przesączu pobranego do badania (cm^3).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce, a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.11. 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). Stężenie azotu wyższe od $0,3 \text{ mg/dm}^3$, a fosforu od $0,03 \text{ mg/dm}^3$, rozpoczyna proces eutrofizacji, czyli wzbogacania zbiorników wody w składniki pokarmowe. Następstwem tego procesu jest wzmożony rozwój roślin, w szczególności glonów i planktonu, oraz niebezpieczny dla organizmów wodnych deficyt tlenu. Skutkuje to ich wymieraniem, w wyniku którego powstają toksyczne substancje, np. amoniak, metan i siarkowodór. Długotrwała eutrofizacja przyczynia się do starzenia zbiorników wodnych, które stopniowo wypływają się i przekształcają w torfowiska w wyniku gromadzenia osadów zawierających szczątki obumierającej flory i fauny.

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 hydrolizy 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 cm^3 wody destylowanej. 280 cm^3 stężonego H_2SO_4 rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 400 cm^3 . Roztwory ostudzić, połączyć razem i uzupełnić do objętości 1000 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 cm^3 gliceryny);
3. 1% roztwór fenoloftaleiny;
4. roztwór mieszaniny kwasu siarkowego (VI) i azotowego (V) (300 cm^3 H_2SO_4 dodawać powoli do 600 cm^3 wody destylowanej, roztwór ostudzić, dodać 4 cm^3 stężonego HNO_3 , a następnie całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 cm^3);
5. roztwór wzorcowy podstawowy KH_2PO_4 o stężeniu 1 mg $\text{PO}_4^{3-}/\text{cm}^3$;
6. 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 cm^3 odmierzyc 1 cm^3 podstawowego roztworu wzorcowego ortofosforanów (V) i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. W 1 cm^3 tego roztworu znajduje się 0,01 mg PO_4^{3-} . Sporządzić serię roztworów wzorcowych w kolbach miarowych o pojemności 100 cm^3 w zakresie stężeń od 0,01 do 0,2 mg PO_4^{3-} . W tym celu do kolb odmierzyc kolejno następujące objętości wzorca roztwo-

ru roboczego ortofosforanów (V): 0; 0,03; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 cm^3 . Zawartość kolbek uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Następnie do wszystkich dodać, dokładnie mieszając 2 cm^3 roztworu molibdenianu (VI) amonu i 0,5 cm^3 roztworu chloru cyny (II). Po upływie 10 minut zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej (woda destylowana) przy długości fali $\lambda=690$ nm. Wykreślić krzywą wzorcową.

b) badanie próbki wody:

Odmierzyć 100 cm^3 wody, dodać kroplę roztworu fenoloftaleiny. Jeżeli wystąpi różowe zabarwienie dodawać kroplami mieszaninę kwasów do zaniku barwy. Następnie dodać, dokładnie mieszając, 2 cm^3 roztworu molibdenianu (VI) amonu i 0,5 cm^3 roztworu chloru cyny (II). Po upływie 10 minut zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej (woda destylowana) przy długości fali $\lambda=690$ nm. Zawartość ortofosforanów odczytać z krzywej wzorcowej.

Obliczyć zawartość ortofosforanów (X_{PO_4}) według wzoru:

$$X_{\text{PO}_4} = \frac{a}{V_{\text{pr}}} \text{ (mg/cm}^3\text{) ,}$$

gdzie:

a – zawartość ortofosforanów (V) odczytana z wykresu wzorcowego (mg);

V_{pr} – objętość pobranej próbki wody (cm^3).

Tabela 10.6. Wartości graniczne wybranych wskaźników biogennych 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

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.6), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.12. 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.

Dobrze jest poznana toksyczność tych związków. Azotany (V) działają drażniąco na śluzówkę przewodu pokarmowego. Azotany (III) przeprowadzają hemoglobinę w methemoglobinę (co prowadzi do niedotlenienia organizmu), rozszerzają naczynia krwionośne, działają neurotoksycznie. Objawy zatrucia ostrego to: zaburzenia hematologiczne (tzw. czekoladowa krew), pokarmowe (ślinienie, wymioty, biegunka), ze strony układu nerwowego (chwiejny chód, brak koordynacji, drżenie mięśni, drgawki) i krążenia (spadek ciśnienia krwi, przyspieszone, ale słabo wyczuwalne tętno), częste oddawanie moczu, trudności w oddychaniu (duszność) objawiające się sinicą, ogólne osłabienie. Objawy zatruc przewlekłych to: zaburzenia rozrodczości, poronienia, niechęć do jedzenia i chudnięcie.

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 NO^{2-} do NO^{3-} i końcowym oznaczeniu azotanów (V). Metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze jonu powstałego po dysocjacji kwasu nitrosali-

cyłowego. 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:

1. 0,5% roztwór salicylanu sodu;
2. 0,5% roztwór NaOH;
3. roztwór wzorcowy podstawowy 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 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ o stężeniu $0,7 \text{ g}/\text{cm}^3$;
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). W tym celu do parownicy odmierzyć 10 cm^3 roztworu wzorcowego podstawowego o stężeniu $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$, 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 robczego znajduje się $0,01 \text{ mg}$ azotu azotanowego (V). Sporządzić serię roztworów wzorców w kolbach miarowych o pojemności 100 cm^3 . W zakresie stężeń od $0,003$ do $0,05 \text{ mg NO}_3^-$ w próbce tj.: 0; 0,003; 0,007; 0,01; 0,03;

0,05 mg. Do każdej kolbki dodać po 7 cm³ 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° według skali chromianowo-kobaltowej, należy poddać ją koagulacji, dodając do 150 cm³ próbki 1,5 cm³ roztworu Al₂(SO₄)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 cm³ próby dodać wyliczoną ilość siarczanu (VI) srebra, wymieszać, pozostawić na godzinę w ciemnym miejscu i przesączyć;

c) utlenianie azotanów (III):

Przygotować 100 cm³ próbki wody (patrz w punkcie b) i dodać 1 cm³ H₂SO₄ i 0,5 cm³ roztworu H₂O₂. Pozostawić na 15 minut;

d) badanie próbki wody na zawartość azotanów (V):

Do porcelanowej parownicy odmierzyć 100 cm³ 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:

$$X_{N-NO_3} = \frac{a}{V_{pr}} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

a – zawartość azotanów (V) odczytana z wykresu wzorcowego (mg);

V_{pr} – objętość wody pobranej do badania (cm³).

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.6), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.13. Oznaczanie zawartości detergentów 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 alkiularylosulfoniacy	III czwartorzędowe związki amoniowe	V-VI alkioglikole
	IV siarczany alkoholi tłuszczowych	III czwartorzędowe związki pirydynowe	V-VI alkilofenole
	IV siarczane 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 wchodzi 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 olejowych 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 grupę detergentów stanowią alkilofenole polioksyetylenowane (detergenty niejonowe), których degradacja polega na wytworzeniu alkilofenoli, zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego zwierząt.

Toksyczność detergentów to przede wszystkim ich zdolność do zmniejszania napięcia powierzchniowego. Ułatwia to wchłanianie innych substancji toksycznych z przewodu pokarmowego do krwi (np. stwierdzono ułatwione przenikanie do organizmu niektórych pestycydów i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych). Detergenty gromadzą się w komórkach tłuszczowych oraz błonach komórkowych, gdzie zakłócają pracę kwasów tłuszczowych i uszkodzają błony, może to w konsekwencji doprowadzić do śmierci komórki. Po wnikięciu do organizmu działają alergizująco, podrażniają śluzówkę przewodu pokarmowego i powodują stany nieżytowe. Długotrwałe przyjmowanie detergentów może prowadzić do powstania tak poważnych schorzeń, jak: uszkodzenie kory nadnerczy i marskość wątroby, a także wzrost ryzyka zachorowania na nowotwory. Detergenty działają także szkodliwe na skórę powodując jej wysuszenie i pękanie oraz różnego rodzaju egzemy.

Poza toksycznością związaną z bezpośrednim spożyciem detergentów, związki te są dużym problemem dla funkcjonowania zbiorników wodnych, do którego dostają się ze ściekami komunalnymi i przemysłowymi. Detergenty m.in.:

- powodują pienienie się wód;
- zaburzają proces samooczyszczania się wód;
- zmniejszają dyfuzję tlenu atmosferycznego;
- działają jak emulgatory, zmniejszając napięcie międzyfazowe między wodą, a np. olejami;
- zawarte w detergentach fosforany wywołują eutrofizację wód stojących i wolno płynących.

Najwyższe dopuszczalne stężenie detergentów anionowych w wodach pitnych wynosi $0,2 \text{ mg/dm}^3$, kationowych – $0,1 \text{ mg/dm}^3$, a niejonowych – $0,2 \text{ mg/dm}^3$. Natomiast dopuszczalna zawartość detergentów anionowych i niejonowych w wodach powierzchniowych wynosi odpowiednio:

- I klasa czystości** – 0,2 i 0,5 mg/dm³;
- II klasa czystości** – 0,5 i 1,0 mg/dm³;
- III klasa czystości** – 1,0 i 2,0 mg/dm³.

10.2.13.1. Oznaczanie zawartości detergentów anionoaktywnych w wodzie

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 H₂SO₄ 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 cm³ wody destylowanej, następnie 30 cm³ tego roztworu przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 cm³. Dodać 500 cm³ wody destylowanej, 6,8 cm³ stężonego H₂SO₄ i 50 g Na₂HPO₄. Wstrząsnąć do rozpuszczenia odczynników. Uzupełnić wodą destylowaną do kreski;
2. 1% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny;
3. chloroform cz.d.a;
4. 1 M roztwór NaOH;
5. 1 M roztwór H₂SO₄;
6. roztwór do przemywania: do 500 cm³ wody destylowanej dodać 6,8 cm³ stężonego H₂SO₄ i 50 g Na₂HPO₄, wstrząsnąć do rozpuszczenia odczynników i uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm³;
7. roztwór dodecylsulfianu sodu (SDS) o stężeniu 0,1 mg/cm³;
8. spektrofotometr, rozdzielacze, zlewki, statyw, łąpy, łączniki, kolby miarowe, lejek, pipety, cylindry.

WYKONANIE OZNACZENIA:**a) badanie próbki wody:**

Odmierzyć 100 cm^3 badanej wody i zalkalizować roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny do lekko różowego zabarwienia. Następnie kroplami dodawać 1 M roztwór H_2SO_4 do zaniku barwy. Próbkę przenieść do rozdzielacza, dodać 10 cm^3 chloroformu i 25 cm^3 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^3 chloroformu. Zebrane ekstrakty chloroformowe (30 cm^3) przemyć 50 cm^3 roztworu do przemywania, energicznie wytrząsając przez 30 sekund. Po rozdzieleniu się, warstwę chloroformową przesączyć do kolby miarowej o objętości 50 cm^3 . Pozostałość w rozdzielaczu wytrząsać z 10 cm^3 chloroformu i warstwę chloroformową przenieść do tej samej kolbki miarowej. Zawartość kolbki dopełnić do kreski czystym chloroformem, dokładnie wymieszać i zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda=652\text{ nm}$ wobec próby ślepej – czystego chloroformu. Z wykresu wzorcowego odczytać zawartość substancji anionoaktywnej w badanej wodzie;

b) wykres wzorcowy:

Przygotować 1000 cm^3 roztworu wzorcowego podstawowego substancji anionoaktywnej – dodecylsulfianu sodu (SDS) przez rozpuszczenie 0,1 g SDS w wodzie destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1000 cm^3 i uzupełnienie wodą do kreski. Roztwór ten zawiera 0,1 mg detergentu w 1 cm^3 wody. W dniu wykonania oznaczenia przygotować wzorcowy roztwór roboczy przez rozcieńczenie 10 cm^3 roztworu podstawowego wodą destylowaną w kolbie miarowej na 100 cm^3 . Roztwór ten zawiera 0,01 mg detergentu w 1 cm^3 .

Następnie do szeregu rozdzielaczy odmierzyć podane ilości wzorcowego roztworu roboczego: 0; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 i 20 cm^3 , co odpowiada następującym ilościom SDS w próbie:

0; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,15 i 0,2 mg. Roztwory dopełnić wodą do objętości 100 cm³ 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:

$$X = \frac{a}{V_{pr}} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- a – zawartość detergentu anionoaktywnego w badanej próbce wody odczytana z krzywej wzorcowej (mg);
V_{pr} – objętość badanej próbki wody.

Otrzymane wyniki należy porównać z normami obowiązującymi w Polsce (Tabela 10.8), a następnie zaklasyfikować badaną wodę do określonej klasy jakości.

10.2.13.2. Oznaczanie zawartości detergentów kationoaktywnych w wodzie

Detergenty kationowe – wraz z amfoterycznymi stanowią około 10% wszystkich substancji powierzchniowo czynnych. Zbudowane są z czwartorzędowego jonu amonowego oraz rodnika alkilowego. Zawartość detergentów kationoaktywnych można oznaczyć za pomocą błękitu metylenowego.

ODCZYNNIKI:

1. 1 M kwas siarkowy;
2. roztwór błękitu metylenowego (1 g błękitu metylenowego rozpuścić w 1000 cm³ 0,01 M roztworu kwasu siarkowego);
3. chloroform cz.d.a.;
4. 0,01 M roztwór SDS.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Do cylindra miarowego odmierzyć 50 cm³ badanej wody. Dodać 1 cm³ 1 M roztworu kwasu siarkowego, 5 cm³ roztworu błękitu metylenowego. Następnie dodać 10 cm³ chloroformu i dopełnić do 100 cm³ wodą destylowaną (do kreski). Całość przelać do kolby stożkowej i dobrze wymieszać. Następnie miareczkować 0,01 M roztworem SDS do wystąpienia niebieskiego zabarwienia warstwy chloroformowej.

Zawartość substancji powierzchniowo czynnych (SPC) kationoaktywnych obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{a \cdot c \cdot 1000}{V} \text{ (mg/dm}^3\text{)},$$

gdzie:

- X – stężenie SPC kationoaktywnych w próbce badanej;
- c – stężenie 0,01 M roztworu SDS (rozpuścić 2,88 g SDS w 1 dm³ wody destylowanej);
- a – objętość roztworu SDS zużyta do zmiareczkowania badanej próby (cm³);
- V – objętość badanej próbki (50 cm³).

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 ³	0,02	0,02	0,05	0,05	> 0,05
Fenole	mg/dm ³	0,001	0,005	0,01	0,05	> 0,05
Oleje mineralne	mg/dm ³	0,01	0,05	0,2	0,5	> 0,5
Substancje powierzchniowo czynne anionowe	mg/dm ³	0,1	0,2	0,5	1,0	> 1,0
Pestycydy (suma lindanu i dieldryny)	µg/dm ³	0,1	1,0	2,5	5,0	> 5,0

10.2.14. Oznaczanie zawartości wybranych metali w wodzie

Wiele jest źródeł pochodzenia metali ciężkich w wodach powierzchniowych. Mogą przedostawać się do środowiska wodnego m.in. z atmosfery w wyniku intensywnego opadu deszczu lub śniegu. Często pierwiastki te są wymywane z podłoża skalnego bądź gleby. Jednak najczęściej przekroczenie dopuszczalnych stężeń spowodowane jest ich emisją z terenów przemysłowych. Kationy metali ciężkich obecne w środowisku wodnym mogą występować w kilku postaciach, w tym:

- w postaci jonowej – formie najbardziej toksycznej dla organizmów żywych;
- jonu związanego z różnymi ligandami – powstają związki kompleksowe;
- wytrąconej cząsteczki związku chemicznego, zawieszanej w fazie ciekłej, zaadsorbowanej na zawiesinach i koloidach.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwory wzorcowe metali: cynku, miedzi, ołowiu, kadmu, niklu, manganu, kobaltu i żelaza o stężeniu 1 mg/cm^3 ;
2. stężony HNO_3 ;
3. 1% roztwór HNO_3 ;
4. pipety, kolby miarowe o pojemności 50 cm^3 , spektrometr AAS.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Próbkę wody przeznaczoną do badań przesączyć przez sączki membranowe średniej gęstości, tj. $0,45 \mu\text{m}$ i utrwalić za pomocą stężonego HNO_3 do $\text{pH} \leq 2$. Jeżeli w zakwaszonej próbce obecne są substancje nierozpuszczone, należy je usunąć. Do zlewki o pojemności 150 cm^3 odmierzyć 50 cm^3 próbki, dodać $2,5 \text{ cm}^3$ stężonego HNO_3 , roztwór ogrzać do wrzenia i utrzymywać w tym stanie przez około 15 minut. Po ostygnięciu, roztwór przenieść do kolby miarowej o pojemności 50 cm^3 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** $\lambda=213,9 \text{ nm}$, **miedzi** $\lambda=324,7 \text{ nm}$, **ołowiu** $\lambda=217,0 \text{ nm}$ lub $283,3 \text{ nm}$, **kadmu** $\lambda=228,8 \text{ nm}$, **niklu** $\lambda=232,0 \text{ nm}$, **manga-**

nu $\lambda=279,5$ nm, kobaltu $\lambda=240,7$ nm i żelaza $\lambda=248,3$ nm. Wartość absorbancji odczytać wobec próby ślepej, którą jest 1% roztwór HNO_3 . 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 ³	0,3	0,5	1,0	2,0	> 2,0
Glin	mg/dm ³	0,1	0,2	0,4	0,8	> 0,8
Kadm	mg/dm ³	0,0005	0,001	0,001	0,005	> 0,005
Mangan	mg/dm ³	0,05	0,1	0,5	1,0	> 1,0
Miedź	mg/dm ³	0,02	0,04	0,06	0,1	> 0,1
Nikiel	mg/dm ³	0,01	0,02	0,05	0,2	> 0,2
Ołów	mg/dm ³	0,01	0,01	0,02	0,05	> 0,05
Rtęć	mg/dm ³	0,0005	0,001	0,001	0,005	> 0,005
Żelazo	mg/dm ³	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 trakcie 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 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 (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.

Spośród 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 glebie 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 elek-

trycznym, 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, łąpy, 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 objętość dodanej wody. Otrzymaną pastę pozostawić pod przykryciem na kilka dni. Następnie przefiltrować na lejku Büchnera i zmierzyć przewodnictwo ekstraktu (G) oraz przewodnictwo właściwe (κ), 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:

κ [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 (Pb^{2+} , Cd^{2+}) oraz anionów (NO_3^- , Cl^-). Jako elektrodę porównawczą stosuje się elektrodę wodorową lub chlorosrebrową.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,05 M roztwór $AgNO_3$;
2. roztwór żelatyny w H_2SO_4 ;
3. stężony roztwór KCl do przechowywania elektrody odniesienia;
4. mieszadło magnetyczne z mieszadłem, statyw z łapami do elektrod, biurety, potencjometr, elektroda jonoselektywna Cl^- , elektroda odniesienia chlorosrebrowa, zlewki, tygiel, tryskawka.

WYKONANIE OZNACZENIA:

20 g gleby wyprażonej w ciągu 3 godzin w temperaturze $450\text{ }^\circ C$ umieścić w zlewce i dodać 20 cm^3 roztworu żelatyny w stężonym H_2SO_4 . Delikatnie włożyć mieszadło i umieścić na płytce mieszadła magnetycznego. Podłączyć elektrody do pehametru zgodnie z instrukcją użytkowania. Opłukane i osuszone elektrody: wskaźnikową i odniesienia zanurzyć w badanym roztworze do głębokości 1,5 cm od dna zlewki. Włączyć mieszanie. Ustawić biuretę wypełnioną roztworem $AgNO_3$ 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 $AgNO_3$ jednocześnie mieszając. Dodawanie roztworu $AgNO_3$ 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 cm³ 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_{Cl^-} – zawartość chlorków Cl⁻ (mg);

V_{AgNO_3} – objętość roztworu zużytego podczas miareczkowania (cm³);

C_{AgNO_3} – stężenie roztworu AgNO₃ (M);

M_{Cl^-} – masa molowa Cl⁻.

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:

1. **czynną**, spowodowaną obecnością jonów wodorowych pojawiających się w roztworze glebowym po zalaniu gleby wodą (wolne jony wodorowe);
2. **potencjalną**, związaną z tą częścią jonów wodorowych, która jest silniej związana w kompleksie glebowym. Wyróżnia się tutaj kwasowość potencjalną wymienną i hydrolityczną.

Kwasowość wymienna spowodowana jest obecnością jonów wodorowych, które przechodzą do roztworu po zalaniu 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 zalaniu 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.

Przypomiarach 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. 1 M roztwór KCl;
2. 0,1 M roztwór NaOH;
3. 1% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny;
4. 0,5 M roztwór octanu wapnia;
5. 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 cm³ wody destylowanej i wymieszać. Po 10 minutach zmierzyć pH zawiesiny.

b) oznaczanie kwasowości wymiennej:

Odważyć 10 g gleby powietrznie suchej. Dodać 25 cm³ 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 cm³ 0,5 M roztworu octanu wapnia. Mieszać na mieszadle przez 1 godzinę. Następnie przesączyć na lejku Büchnera. Pobrać 125 cm³ klarownego przesączu 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:

$$H_h = V \cdot c \cdot 2 \cdot k \text{ (mmol(+)/100 g) ,}$$

gdzie:

V – objętość roztworu NaOH zużytego na miareczkowanie (cm^3);

c – stężenie roztworu NaOH (M);

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-gytowe)
> 7,2	zasadowe (rędziny, słone)

10.3.4 Oznaczanie zawartości wapnia i magnezu metodą wersenianową w glebie

Zwiększenie stężenia kationów metalicznych w glebie: Ca^{2+} i Mg^{2+} 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 sorbcji wolnych jonów z roztworu glebowego. Ilościowym parametrem określającym tę właściwość jest wielkość zwana pojemnością sorbcyjną gleby (T), zdefiniowana jako maksymalna ilość jonów, które mogą być zasorbowane w glebie wymiennie. Wyliczenie wartości

T polega na zsumowaniu kwasowości hydroalitycznej (H_h), czyli jonów H^+ z sumą kationów zasadowych (S), np. Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ . 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_2 -EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić wodą do 1000 cm^3 ;
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_4Cl w 100 cm^3 wody destylowanej i zmieszać z 300 cm^3 25% roztworu NH_4OH ; do otrzymanego roztworu buforowego dodać 50 cm^3 0,05 M roztworu $MgSO_4$ oraz zrównoważyć ilość roztworu 0,05 M Na_2 -EDTA, którą należy określić przez zmiareczkowanie roztworu $MgSO_4$. Dodać 5 cm^3 roztworu buforowego do 100 cm^3 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, pierścien, łącznik, biureta Peleta, kolby Erlenmayera, lejek szybko ssący, 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^3 roztworu octanu amonu i mieszać mieszadłem magnetycznym przez 2 godziny. Po tym czasie roztwór przesączyć i odmierzyć 50 cm^3 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_2 -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 cm³ wody destylowanej, 2 cm³ roztworu 1 M NaOH, 0,2 g mureksydu oraz kroplę Na₂-EDTA. Powstaje intensywne fioletowe zabarwienie mieszaniny.

Zawartość wapnia obliczyć ze wzoru:

$$X = \frac{V \cdot M_{\text{Ca}} \cdot c \cdot f}{m} \text{ (mg Ca}^{2+} \text{ /kg gleby) ,}$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na₂-EDTA zużytego na miareczkowanie próby (cm³);
- c – stężenie roztworu Na₂-EDTA (M);
- m – masa gleby użytej do ekstrakcji (kg);
- M_{Ca} – masa molowa wapnia;
- 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 cm³ buforu amoniakalnego i 0,5 g czerni eriochromowej T. Następnie miareczkować roztworem Na₂-EDTA do uzyskania błękitnego zabarwienia.

Obliczyć zawartość magnezu (X) ze wzoru:

$$X = \frac{V \cdot M_{\text{Mg}} \cdot c \cdot f}{m} \text{ (mg Mg}^{2+} \text{ /kg gleby) ,}$$

gdzie:

- V – objętość 0,01 M roztworu Na₂-EDTA zużytego na miareczkowanie próby (cm³);
- c – stężenie roztworu Na₂-EDTA (M);
- m – masa gleby użytej do ekstrakcji (kg);
- M_{Mg} – masa molowa magnezu;
- f – współczynnik równoważności (f=4).

10.3.5. Oznaczanie zawartości wybranych metali metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej 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 (ang. *atomic absorption spectrometry*). Podstawy teoretyczne metody AAS oraz zasady pomiaru zostały opisane w rozdziale 7.13.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 0,5 M roztwór HNO_3 ;
2. 0,14 M roztwór HNO_3 ;
3. roztwory wzorcowe metali: cynku, kadmu, kobaltu, miedzi i ołowiu o stężeniu 1 g/dm³;
4. pipety, kolby miarowe o pojemności 50 cm³, 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 cm³ 0,5 M roztworu HNO_3 . Mieszać na mieszadło 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 cm³ roztwory wzorcowe robocze o stężeniach: 5, 10 i 20 mg/dm³, 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			
	0-0,3	Głębokość (m)						0-2	2-15	
		0,3-15		>15		Wodoprzepuszczalność gruntów (m/s)			do	poniżej
		do	poniżej	do	poniżej	1·10 ⁻⁷				
1·10 ⁻⁷		1·10 ⁻⁷		1·10 ⁻⁷						
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:

1. rodzaju działalności będącej przyczyną emisji zanieczyszczeń. Zalicza się do nich zanieczyszczenia:
 - a) **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;
 - b) **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);
2. lokalizacji emitera: punktowe, liniowe, powierzchniowe, objętościowe, stacjonarne, ruchome;
3. typu emisji zanieczyszczeń: emisja zorganizowana (zakłady produkcyjne), niezorganizowana (indywidualne domy, kamienice, mieszkania);
4. stanu skupienia emitowanych zanieczyszczeń (gazy, pary i aerozole);
5. pochodzenia zanieczyszczeń: zanieczyszczenia własne i transgraniczne, tj. pochodzące z krajów sąsiednich;
6. sposobu, w jaki zanieczyszczenie znalazło się w powietrzu:
 - a) **pierwotne** (podstawowe) (Tabela 10.13) – występujące w postaci takich substancji chemicznych, w jakich zostały uwolnione do atmosfery ze źródła ich wytwarzania;

- b) **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)	Aerozol	Przedział stężeń ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Tlenek siarki (IV)	0,002-0,5	Pył i sadza	10-200
Tlenek siarki (VI)	<0,05	Ołów	0,1-5
Siarkowódór	0,002-0,03	Cynk	0,1-2
Tlenek węgla (II)	0,1-50	Żelazo	0,1-10
Tlenek azotu (II)	0,01-0,4	Miedź	0,03-1
Tlenek azotu (IV)	0,01-0,2	Arsen	0,01-0,5
Amoniak	0,001-0,02	Kadm	0,001-0,5
Fluorowódór	0,0001-0,5	Mangan	0,01-0,5
Chlorowódór	0,005-5	Wanad	0,001-0,2
Węglowodory niemetanowe	10^{-5} -0,01	Rtęć	0,002-0,05
Węglowodory aromatyczne	0,01-0,1	Sód	0,1-10
Aldehydy	0,001-0,1	Chlor	0,1-10
		Kwas siarkowy (VI)	0,1-10

Tabela 10.14. Stężenia wtórnych zanieczyszczeń powietrza

Składnik gazowy	Przedział stężeń (ppm)	Aerozol	Przedział stężeń ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Ozon	0,01-0,2	Siarczany	1-50
Nadtlenek acetylu (PAN)	0-0,1	Azotany	0,1-15
Homologi PAN	0-0,01	Amoniak	0,1-15
Inne utlenione produkty	0-0,1	Organiczne	1-50
Aldehydy	0-0,2	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

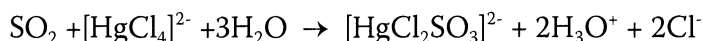
Krytyczne układy	Truczny gazowe
Układ krążenia	CO, NO _x
Układ krwionośny	SO ₂ , O ₃ , H ₂ S
Ośrodkowy układ nerwowy	NO _x , CO, H ₂ S, NH ₃
Układ oddechowy	SO ₂ , NO _x , O ₃ , CO, H ₂ S, NH ₃ , HF
Układ odpornościowy	O ₃
Układ hormonalny	O ₃

Oznaczanie stężeń substancji toksycznych znajdujących się w powietrzu składa się 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 autoanalizator 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 wybielanie liści. SO_2 dobrze rozpuszcza się w kroplach wody tworząc H_2SO_4 i H_2SO_3 , 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 ruchliwość 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 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 H_3PO_4 . Kwas metylosulfonowy powstający w tej reakcji wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=575$ nm i $\text{pH}=1$. Metoda ta pozwala oznaczyć zawartość SO_2 w zakresie stężeń 0,002-5 ppm.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. roztwór pochłaniający (do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 odważyć 13,6 g Hg_2Cl , 5,85 g NaCl i 0,07 g Na_2 -EDTA rozpuścić w wodzie destylowanej. Roztwór uzupełnić do objętości 1000 cm^3);

2. roztwór podstawowy chlorowodoru *p*-rozaliny rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 cm³. Przed użyciem rozcieńczyć według poniższego przepisu (punkt a);
3. 0,2% roztwór aldehydu mrówkowego;
4. roztwór kwasu amidosulfonowego (0,3 g rozpuścić w 25 cm³ wody);
5. roztwór roboczy SO₂ (1 cm³ zawiera 0,01 mg SO₂);
6. stężony 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 cm³ odmierzyć 20 cm³ roztworu podstawowego chlorowodoru *p*-rozaliny i 3 cm³ stężonego 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 cm³ odpowiednie objętości roztworów: SO₂ (zawierającego 0,01 mg SO₂/1 cm³) i roztworu pochłaniającego (Tabela 10.16).

Tabela 10.16. Skład roztworów wzorcowych SO₂

Nr wzorca	Objętość roztworu roboczego <i>p</i> -rozaliny (cm ³)	Objętość roztworu pochłaniającego (cm ³)	Zawartość 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 cm³ kwasu amidosulfonowego, wymieszać, po 10 minutach dodać 1 cm³ aldehydu mrówkowego i roztworu roboczego chlorowodoru *p*-rozaliny, każdorazowo

mieszając. Po upływie 20 minut zmierzyć 3-krotnie absorbcję przy długości fali $\lambda=560$ 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 absorbcji od zawartości SO_2 wyrażonej w mg).

c) oznaczanie ditlenku siarki w próbce badanej:

Napełnić płuczkę 10 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 cm^3 , dopełnić wodą destylowaną do kreski i wymieszać. Do kolby stożkowej o pojemności 25 cm^3 odmierzyć 10 cm^3 badanego roztworu, dodać $0,5 \text{ cm}^3$ roztworu kwasu amidosulfonowego, wymieszać i pozostawić na 10 minut. Następnie dodać kolejno, mieszając: 1 cm^3 aldehydu mrówkowego i 1 cm^3 roztworu wzorcowego roboczego. Po 20 minutach i nie później niż po 40 minutach zmierzyć absorbcję przy długości fali $\lambda=550$ nm, stosując jako odnośnik próbę ślepą (próba nr 1 sporządzona dla wykresu wzorcowego). Ilość ditlenku siarki w próbce odczytać z krzywej wzorcowej.

Zawartość SO_2 w m^3 badanego powietrza (X) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{f \cdot m}{V} \text{ (mg SO}_2\text{/m}^3\text{)},$$

gdzie:

m – zawartość ditlenku siarki odczytana z krzywej wzorcowej (mg);

V – objętość przepuszczonego powietrza w m^3 ;

f – stosunek objętości cieczy wprowadzonej do płuczki do objętości pobranej do oznaczenia.

Uzyskane wyniki zawartości 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 w ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) 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_2) często są traktowane łącznie jako tlenki azotu NO_x . W powietrzu tlenki azotu mogą pochodzić ze źródeł naturalnych, takich jak wyładowania atmosferyczne, wybuchy wulkanów, bakteryjne trawienie materii organicznej. Naturalne stężenie NO_x 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_x są silniki spalinowe i odrzutowe. Tlenki azotu mogą przedostawać 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_3 i HNO_2 , które mają znaczny udział w tworzeniu kwaśnych deszczy. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego reagują z węglowodorami, 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 nitrozoamin.

Oznaczanie tlenków azotu NO_x 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 $\lambda=550$ nm. Jeżeli pożądane jest oznaczenie sumy tlenków azotu NO_x , to konieczne jest wstępne utlenienie tlenku azotu do N_2O_5 , 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 trietanolaminy 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. płyn pochłaniający: do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 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^3 ;
2. roztwór utleniający: do kolby miarowej o pojemności 1000 cm^3 odważyć 3 g manganianu (VII) potasu i rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej. Dodać 2 cm^3 H_2SO_4 i uzupełnić wodą destylowaną do kreski;
3. roztwór chlorowodorku *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy (odważyć 0,2 g chlorowodorku *N*-(1-naftylo)-etylenodiaminy i 60 g kwasu szczawowego

(dwuwodnego), rozpuścić w wodzie destylowanej. Roztwór uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 cm³);

4. roztwór wzorcowy podstawowy azotanu (III) sodu, w którym w 1 cm³ znajduje się 0,1 mg NO₂ (0,150 g azotanu (III) sodu rozpuścić w 1000 cm³ 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 NO₂/cm³ przygotować roztwór wzorcowy roboczy. W tym celu do kolby miarowej na 100 cm³ wprowadzić 10 cm³ roztworu podstawowego i dopełnić wodą destylowaną do kreski (1 cm³ zawiera 10 μg NO₂). Serię wzorców przygotować, odmierzając do zlewek o pojemności 25 cm³ następujące składniki: roztwór wzorcowy roboczy ditlenku azotu, płyn pochłaniający i roztwór chlorowodoru *N*-1-(naftylo)-etylenodiaminy według Tabeli 10.18. Dokładnie wymieszać i po 5 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali λ=550 nm w kuwetach o grubości warstwy 1 cm, stosując jako roztwór odniesienia (próbę ślepą) wzorzec numer 1. Pomiar absorbancji powtórzyć trzy razy. Sporządzić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia ditlenku azotu (mg).

Tabela 10.18. Skład roztworów wzorcowych NO₂

Nr wzorca	Objętość roztworu (cm ³)			Zawartość NO ₂ (μg)
	wzorcowego roboczego	pochłaniającego	chlorowodoru <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 próbie badanej:

Do pierwszej płuczki zestawu wlać pipetą 10 cm³ roztworu utleniającego, do drugiej 10 cm³ roztworu pochłaniającego. Powietrze przepuszczać przez zestaw w ciągu 30 minut z prędkością 10 dm³/godz. Zmierzyć objętość roztworu w drugiej płuczce po przepuszczeniu powietrza. Pobrać 5 cm³ tego płynu, dodać 3 cm³ roztworu chlorowodoru *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/m³), przeliczone na pięciotlenek diazotu (N₂O₅), obliczyć według wzoru:

$$c = \frac{1,17 \cdot V_r \cdot m}{V_p \cdot V_a} \text{ (mg/m}^3\text{)},$$

gdzie:

- 1,17 – współczynnik przeliczeniowy ditlenku azotu na pięciotlenek diazotu;
- V_r – objętość roztworu pochłaniającego w płuczce zmierzona po przepuszczeniu powietrza (cm³);
- m* – masa ditlenku azotu odczytana z krzywej wzorcowej (μg);
- V_p – objętość powietrza przepuszczonego przez płuczkę w dm³;
- V_a – objętość roztworu pobranego do analizy w cm³.

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. **antropogenicznego**, 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. Osiadają 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_2 , który w obecności wilgoci tworzy kwas siarkowy (VI). Jeśli w tej postaci dostaną się do układu oddechowego, warstwa H_2SO_4 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 niezłyty 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 μm . Stopień zapylenia określa

się jako ilość mg pyłu w m^3 lub jako liczbę cząstek pyłu w 1 cm^3 powietrza (powierzchnia właściwa pyłu).

Wykonanie oznaczenia zawartości metali ciężkich w pyłe można dokonać za pomocą metody **absorpcyjnej spektrometrii atomowej** (AAS, ang. *atomic absorption spectrometry*). Podstawy teoretyczne metody AAS oraz zasady pomiaru zostały opisane w rozdziale 7.13.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. stężony HNO_3 ;
2. 0,14 M roztwór HNO_3 ;
3. roztwory wzorcowe metali o stężeniu 1 mg/cm^3 ;
4. zestaw do pobierania próbek powietrza, spektrometr AAS, eksykator, szalki Petriego, zlewki, łaźnia wodna, kolbki miarowe, pipety.

Założyć zważony dokładnie sączonek 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 mg/m^3 powietrza. Następnie sączonek umieścić w zlewce o pojemności 150 cm^3 i dodać $7,5\text{ cm}^3$ stężonego HNO_3 . Ogrzewać delikatnie w łaźni wodnej do rozłożenia sączonek i odparować prawie do sucha. Ponownie dodać $2,5\text{ cm}^3$ porcję stężonego HNO_3 i znowu odparować prawie do sucha. Pozostałość przenieść do kolbki 50 cm^3 , przemyć zlewkę 0,14 M roztworem HNO_3 i tym roztworem uzupełnić kolbkę do kreski. Równolegle, przygotować analogicznie próbkę kontrolną (sączonek tej samej wielkości niewystawiony na działanie powietrza).

Wykonać pomiar stężenia metali ciężkich w pyłe zawieszonym ustalając 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 mg metalu/m^3 i porównać z wartościami dopuszczalnych stężeń zanieczyszczeń powietrza (Tabela 10.17).

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 codziennie w okresie 2, 3 i 4 tygodni), toksyczności podprzewlekłej (powtarzanie dawkowania codziennie w sposób przerywany lub ciągły do 3 miesięcy) czy toksyczności przewlekłej (powtarzanie dawkowania codziennie w sposób przerywany lub ciągły przez co najmniej 9 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 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, dożołądkowo, 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 dla 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 płć, 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 LD₅₀ wykorzystuje się szereg metod, które pozwalają z dostateczną precyzją ocenić tę dawkę stosując odpowied-

nie, 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. Najczęściej stosowaną metodą obliczania LD_{50} jest graficzna metoda Litchfielda i Wilcoxa. Metoda ta została z pewnymi modyfikacjami zaadaptowana przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) jako test 401 – toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową). Wymaga stosowania co najmniej 10 gryzoni (5 samic i 5 samców) dla każdego poziomu dawkowania. Przyjmując jako minimum trzy poziomy dawkowania test ten wymaga użycia przynajmniej 30 zwierząt oraz 10 zwierząt w grupie kontrolnej. Z kolei Diechmann i LeBlanc opisali metodę, w której używa się około 6 zwierząt dla wykonania całego doświadczenia, jakkolwiek uzyskany wynik określany był jako tzw. przybliżona dawka śmiertelna. Wytyczne OECD dotyczące metod badawczych są okresowo uaktualniane w wyniku postępu naukowego i praktycznych potrzeb. Konwencjonalny test ostrej toksyczności doustnej (test 401) jest mocno krytykowany za: 1) dość znaczną liczbę zwierząt używanych do badań (minimum łącznie 40) oraz 2) fakt, że w celu określenia klasy toksyczności substancji nie ma potrzeby wyznaczania dokładnej wartości LD_{50} . Spowodowało to, że opracowano trzy alternatywne testy ostrej toksyczności po podaniu drogą pokarmową. Klasyczny test 401 został usunięty z wytycznych OECD. W ostatnich latach wprowadzono modyfikacje procedur oznaczania toksyczności ostrej, zmierzające do zmniejszenia liczby zwierząt oraz ograniczenia ich cierpień. W tym celu OECD zarekomendowała stosowanie następujących **testów alternatywnych**:

- test 420: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura stałej dawki (FDP – *Fixed Dose Procedure*),
- test 423: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura klas ostrej toksyczności (ACT – *Acute Toxic Class Method*),
- test 425: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura większej – mniejszej dawki (*Up-down-Up Procedure*),

które powinny spełniać następujące warunki:

- zaspokajać wymogi prawne dotyczące rejestracji substancji chemicznych w obszarze krajów członkowskich OECD,

- umożliwić wyznaczenie krzywej zależności dawka/śmiertelność,
- ile to jest możliwe, pozwolić na określenie przedziałów ufności, co uwiarygodnia klasyfikację ostrej toksyczności w zakresie dawek od 5 mg/kg do 5000 mg/kg masy ciała (szczura),
- badania powinny być wykonane z zastosowaniem jednej płci danego gatunku, mniejszej liczby zwierząt oraz w sposób minimalizujący ból i cierpienie,
- testy powinny umożliwić określenie toksyczności substancji zgodnie z klasyfikacją Systemu Globalnej Harmonizacji dla substancji chemicznych o ostrym działaniu toksycznym. System ten klasyfikuje substancje chemiczne według następujących kryteriów klas i zakresu dawek: klasa (1) > 0-5 mg/kg, (2) > 5-50 mg/kg, (3) > 50-300 mg/kg, (4) > 300-2000 mg/kg, (5) > 2000-5000 mg/kg.

11.1.1. Test 420: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura stałej dawki

Badanie toksyczności ostrej drogą pokarmową dostarcza informacji na temat szkodliwych efektów, które mogą się ujawnić w krótkim okresie po spożyciu pojedynczej dawki substancji chemicznej. Badanie metodą stałej dawki przeprowadza się w dwóch etapach.

1. W badaniu wstępnym bada się skutki różnych dawek (5, 50, 300, 2000 mg/kg) podawanych kolejno pojedynczym zwierzętom jednej płci. Badanie wstępne dostarcza informacji o zależności objawów toksycznych od zastosowanej dawki, włączając w to oszacowanie minimalnej dawki śmiertelnej. W ustaleniu wielkości wstępnej dawki mogą pomóc dane odnośnie do struktury chemicznej substancji lub dane z badań *in vitro*. Jeżeli takie dane są niedostępne eksperyment rozpoczyna się od podania dawki 300 mg/kg. Na tym etapie badania używa się nie więcej niż pięć zwierząt.
2. W badaniu głównym substancję podaje się drogą pokarmową w jednej ustalonej dawce w oparciu o badanie wstępne w dawce 5, 50, 300 i 2000 mg/kg grupie 5 zwierząt jednej płci. W przypadku wymogów legislacyjnych niektórych krajów, dodatkowo można zastosować dawkę 5000 mg/kg. Dawkę wyprowadzoną

z badania wstępnego dobiera się w ten sposób, by wywoływała objawy widocznej toksyczności, ale nie śmierć zwierzęcia. Po podaniu substancji notuje się wyniki z obserwacji pojawiających się objawów. W przypadku, gdy wybrana dawka wywołuje wyraźne objawy toksyczne, ale nie śmierć zwierząt, nie zachodzi potrzeba dalszych badań. Jeżeli nie obserwuje się wyraźnych objawów toksycznych przy danym poziomie dawkowania, należy przejść do badań z użyciem wyższej dawki badanej substancji. W przypadku śmierci zwierząt, lub kiedy wybitne objawy toksyczne zmuszają do uśmiercenia zwierząt ze względów humanitarnych, substancję należy badać w kolejnej, niższej dawce.

Ogólne zasady postępowania oraz interpretacji wyników przedstawia Tabela 11.1.

11.1.2. Test 423: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura klas ostrej toksyczności

Metoda klas toksyczności ostrej polega na podaniu substancji chemicznej w jednej z czterech ustalonych dawek odpowiednio oddzielonych, by w oparciu o wyniki badania umożliwić zaszeregowanie związku w różnych, powszechnie stosowanych systemach klasyfikacyjnych. Metoda ta wykorzystuje określone dawki początkowe (5, 50, 300, 2000 mg/kg) i nie pozwala na dokładne wyliczenie LD_{50} , lecz pozwala na określenie zakresu dawek, po podaniu których spodziewana jest śmiertelność, ponieważ padnięcia części zwierząt są jednak głównym parametrem końcowym w tym badaniu.

Grupie trzech zwierząt doświadczalnych podaje się dożołądkowo testowaną substancję w jednej z ustalonych dawek. Dawką wyjściową powinna być ta, która prawdopodobnie wywoła śmiertelność przynajmniej jednego z trzech zwierząt. Przy wyborze dawki wyjściowej można wykorzystać następujące informacje:

- dane o właściwościach fizykochemicznych,
- zależność aktywności od struktury,
- wszystkie wyniki badań z innych badań toksyczności,
- przewidywane zastosowanie badanej substancji.

Tabela 11.1. Klasy toksyczności według Systemu Globalnej Harmonizacji

Dawka	Wyniki	Interpretacja	Klasa toksyczności
5 mg/kg	padły 1-2 szczury	substancja bardzo toksyczna	1
	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancja może być toksyczna	2
	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	podać dawkę 50 mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	2
50 mg/kg	padły 1-2 szczury	substancja może być toksyczna lub bardzo toksyczna; podać dawkę 5 mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	-
	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancja może być szkodliwa	3
	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	podać dawkę 300 (500) mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	3
300 mg/kg	padły 1-2 szczury	substancja może być toksyczna lub bardzo szkodliwa; podać dawkę 50 mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	-
	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancja nie stwarza ryzyka ostrego zatrucia	4
	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	podać dawkę 2000 mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	4
2000 mg/kg	padły 1-2 szczury	podać dawkę 300 mg/kg, gdy jeszcze jej nie badano	-
	100% przeżycia, lecz widoczna toksyczność	substancja nie stwarza ryzyka ostrego zatrucia	5
	100% przeżycia, brak widocznej toksyczności	substancja nie stwarza ryzyka ostrego zatrucia lub nieklasyfikowana	5

Nieobecność lub obecność zależnej od substancji śmiertelności zwierząt narażonych na jednym etapie warunkuje wykonanie następnego etapu badania, tzn.:

- nie ma potrzeby dalszego badania,
- następny etap należy przeprowadzić z tą samą dawką, lecz na zwierzętach innej płci,
- następny etap należy przeprowadzić na kolejnym wyższym lub niższym poziomie dawkowania.

Przykładowo, gdy po podaniu dawki 300 mg/kg padną 2 z 3 zwierząt, testowaną substancję należy podać w dawce mniejszej (50 mg/kg). W przypadku 1 lub 0 zgonów ponownie podaje się substancję w takiej samej ilości/dawce (300 mg/kg). Jeżeli ponownie stwierdzono 0 lub 1 padnięcie, substancję podaje się w kolejnej większej dawce (w tym przypadku 2000 mg/kg). Natomiast procedura klas toksyczności przewiduje rozpoczęcie badania od dawki 2000 mg/kg (test graniczny). Jeżeli padną 2-3 zwierzęta podaje się substancję w mniejszych dawkach (300 lub 50 mg/kg). Natomiast w przypadku braku lub jednego padnięcia ponownie podaje się dawkę 2000 mg/kg. Po stwierdzeniu 2 lub 3 zgonów substancję testuje się w dawce mniejszej - 300 mg/kg. Natomiast brak lub 1 zgon zezwala na zaklasyfikowanie substancji do klasy 5 (klasyfikacja według Systemu Globalnej Harmonizacji, Tabela 11.1).

11.1.3. Test 425: toksyczność ostra (podanie drogą pokarmową) – procedura większej – mniejszej dawki

Badanie toksyczności ostrej metodą większej-mniejszej dawki umożliwia określenie medialnej dawki śmiertelnej LD_{50} , a w związku z tym dostarcza odpowiednich danych dla klasyfikacji substancji chemicznych. Po raz pierwszy zasada testu została opisana przez Dixona, a następnie Bruce opisał procedurę i opracował naukowe podstawy określania ostrej toksyczności tą metodą. Procedura większej–mniejszej dawki polega na podawaniu pojedynczemu zwierzęciu jednej dawki poniżej oczekiwanej wartości LD_{50} . W oparciu o uzyskane efekty po podaniu pierwszej dawki, następnemu zwierzęciu podaje się dawkę powiększoną lub pomniejszoną o pewien stały współczynnik. Następnie kontynuuje się to sekwencyjne postępowanie do osiągnięcia takiej dawki, kiedy jej zwiększenie powoduje zgon, a obniżenie, przeżycie zwierzęcia. Procedura przeprowadzana jest w dwóch etapach.

Pierwszym etapem jest test graniczny, który polega na podaniu jednemu zwierzęciu dawki 2000 mg/kg. W przypadku padnięcia realizuje się test główny. Jeżeli zwierzę przeżyje testowaną substancję w dawce 2000 mg/kg podaje się ją grupie czterech zwierząt. Jeżeli 2 z 5 zwierząt padną to wartość LD_{50} jest większa od 2000 mg/kg. W przypadku gdy padną 3 z 5 zwierząt wartość LD_{50} jest mniejsza od 2000 mg/kg i niezbędne jest wykonanie testu głównego. Test graniczny przewiduje

również rozpoczęcie badania od dawki 5000 mg/kg, brak lub 1-2 zgony zwierzęcia pozwalają na stwierdzenie, że LD_{50} jest większe od 5000 mg/kg. Z kolei padnięcie 3 zwierząt wskazuje, że LD_{50} jest mniejsze od 5000 mg/kg i wskazuje na konieczność dalszych badań – podanie najwyższych dawek granicznych 2000 mg/kg lub 300 mg/kg.

Test główny polega na sekwencyjnym podawaniu kolejnych dawek w odstępie 48 godzin. Dawkę początkową ustala się w oparciu o dane wynikające z właściwości fizykochemicznych, zależności aktywności od struktury lub o dane z innych badań toksyczności. Jeżeli dane te są niedostępne, test rozpoczyna się od podania dawki 1,75 mg/kg lub 17,5 mg/kg zwiększanej o stały współczynnik, zalecany 3,2 (wartość 0,5 na skali logarytmicznej). Stosując zalecany współczynnik uzyskuje się ciąg dawek: 1,75; 3,5; 17,5; 55; 175; 550; 2000 mg/kg. Jeżeli wymagają tego określone przepisy danego kraju ciąg dawek należy poszerzyć o dawkę 5000 mg/kg. Podawanie substancji kontynuuje się do osiągnięcia takiej dawki, gdy spełnione jest jedno z następujących kryteriów:

- 3 zwierzęta przeżyły po podaniu sekwencji 3 największych dawek,
- 5 przypadków zgonu lub przeżycia w grupie 6 testowanych zwierząt,
- zgon lub przeżycie występuje co najmniej u 4 zwierząt i wyznaczony współczynnik prawdopodobieństwa przewyższa wartość krytyczną.

Wartość LD_{50} obliczana jest za pomocą metody szacowania maksymalnego prawdopodobieństwa (arkusz kalkulacyjny umożliwiający obliczenie wartości LD_{50} wraz z całą procedurą TG 425 jest dostępny na stronie internetowej OECD <http://www.oecd.org/ehs>).

Przedstawione testy alternatywne toksyczności ostrej zostały opracowane z jednej strony w celu istotnej poprawy dobrostanu zwierząt, a z drugiej dostarczają danych umożliwiających określenie klasy toksyczności (Tabela 11.2-3) i oszacowanie ryzyka dla zdrowia ludzi i środowiska. Przy ich realizacji należy mieć świadomość zalet i wad oraz ograniczeń w interpretacji wyników.

Tabela 11.2. Klasyfikacja toksyczności trucizn według Hodge'a i Sternera (USA)

Wartości toksyczne	Klasa toksyczności	LD ₅₀ jednorazowo doustnie u szczurów
1	nadzwyczaj toksyczna	≤ 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	≥ 15 g/kg

Tabela 11.3. Klasyfikacja toksyczności trucizn po podaniu dożołądkowym stosowana w krajach Unii Europejskiej (dyrektywa Rady 92/32/EWG z 30 kwietnia 1992 r.)

Klasa toksyczności	Zakres LD ₅₀ (mg/kg m.c.)
Bardzo toksyczna	< 25
Toksyczna	25-200
Szkodliwa	200-2000
Niesklasyfikowano	> 2000

Zalety testów alternatywnych:

- testy uwzględniają dążenie do poprawy dobrostanu zwierząt i zasady 3R,
- testy umożliwiają zaklasyfikowanie badanej substancji do odpowiedniej klasy toksyczności zgodnie w wymogami Systemu Globalnej Harmonizacji,
- testy wykonywane są na mniejszej liczbie zwierząt w porównaniu do klasycznego testu ostrej toksyczności (test 401),
- założenia testów dopuszczają badania tylko na jednej płci zwierząt (jako bardziej wrażliwe uznano samice), co zmniejsza liczbę zwierząt w eksperymencie o 50%,
- celem testu 420 jest uzyskanie wyraźnych efektów toksycznych, a nie śmierć zwierząt,
- test 425 umożliwia wyznaczenie krzywej zależności dawka–efekt, a więc oszacowanie medialnej dawki śmiertelnej (LD₅₀) wraz z przedziałem ufności.

Wady testów alternatywnych:

- testy 420 i 423 nie dają możliwości wyznaczenia zależności dawka–efekt i określenia LD_{50} ,
- dopuszczenie wykonania badań tylko na zwierzętach jednej płci może prowadzić do błędnej klasyfikacji testowanej substancji,
- testu 425 nie można stosować dla substancji wykazujących opóźnione działanie toksyczne.

Zasada 3R, która ma na celu ograniczenie cierpień zwierząt stanowiących nieodłączną część wielu badań, zakłada:

- I. REDUCTION** – **zmniejszenie** liczby używanych do doświadczeń zwierząt tak, by przynosiły pożądane efekty przy użyciu jak najmniejszej liczby zwierząt (metody statystyczne, rachunek prawdopodobieństwa).
- II. REPLACEMENT** – **zastąpienie** metody alternatywnej (hodowle komórek i tkanek *in vitro*, modelowanie zjawisk biologicznych).
- III. REFINEMENT** – **doskonalenie** metod doświadczalnych (humanitarne zakończenie badań – przerwanie doświadczeń z chwilą uzyskania odpowiednich danych).

Aby metoda alternatywna, opracowana przez akademickich i przemysłowych naukowców, została wprowadzona jako swoisty zamiennik badania na zwierzęciu, musi przejść skomplikowany proces walidacji oraz rejestracji, prowadzony przez Europejskie Centrum Walidacji Metod Alternatywnych (ECVAM). Proces walidacji potwierdza istotność naukową metody alternatywnej pod kątem klasyfikacji i oznakowania, zatwierdzenia produktu lub badania bezpieczeństwa.

W trakcie walidacji określone są:

- wiarygodność i przydatność poszczególnych badań,
- przystępność metody lub procesu badawczego,
- niezawodność metody zdefiniowana jako zakres powtarzalności wyników w czasie badań w ramach jednego laboratorium i pomiędzy laboratoriami, gdy wykonywane są przy użyciu tego samego standardowego protokołu,

- trafność metody badania, która opisuje zależność między badaniem a jego wynikami u gatunków docelowych oraz czy metoda badania jest znacząca i przydatna do określonego celu, wraz ze zidentyfikowanymi ograniczeniami.

Przewidywalność i niezawodność testu toksyczności określają:

- czułość, czyli procent pozytywnych (toksycznych) chemikaliów prawidłowo zidentyfikowanych,
- specyficzność, czyli procent substancji chemicznych negatywnych (nietoksycznych) prawidłowo rozpoznawanych,
- przewidywalność, czyli procent prognozy dla poszczególnych klasyfikacji, które były prawidłowe,
- dokładność, czyli ogólny odsetek poprawnych klasyfikacji.

Inne parametry oceniane przez biostatystyków podczas walidacji:

- powtarzalność wyników pomiędzy laboratoriami, czyli zgodność klasyfikacji między laboratoriami,
- powtarzalność w laboratoriach, czyli zgodność klasyfikacji między trzema i większą ilością niezależnych działań w jednym laboratorium,
- prawdopodobieństwo poprawności klasyfikacji.

Do zastąpienia zwierząt w eksperymentach toksykologicznych mogą być stosowane następujące systemy:

- metody *in vitro*: hodowle komórkowe, zrekonstruowane tkanki, systemy „co-cultur”
- *ex vivo*: wyizolowane zwierzęce tkanki i organy,
- *in silico*: symulacje komputerowe i modele matematyczne, np. QSAR (ang. *quantitative structure–activity relationship*, zależności między aktywnością a strukturą związku).

Przedstawione poniżej obliczanie LD₅₀ metodami Thompsona (rozdział 11.1.4.) czy Kärbera (rozdział 11.1.5) nie jest już stosowane, ale stanowiły podstawę dla wyżej wymienionych testów toksykologicznych. Zatem należy je traktować bardziej jako ciekawostkę.

11.1.4. Oznaczenie LD₅₀ 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-LD₅₀ oblicza się według wzoru Weila:

$$\log m \cong \log D_a + d \cdot (f + 1) ,$$

gdzie:

m – wartość A-LD₅₀;

D_a – najniższa stosowana dawka;

d – logarytm iloczynu kolejnych dawek (współczynnika postępu geometrycznego);

f – wartość tabelaryczna odczytana z tablic Weila.

11.1.5. Oznaczenie LD₅₀ metodą Kärbera

Obliczanie LD₅₀ metodą Kärbera przeprowadza się stosując wiele dawek, wśród których powinna być dawka powodująca śmierć wszystkich zwierząt oraz dawka niedziałająca. Metoda pozwala na otrzymanie dostatecznie dokładnego wyniku przy silnym rozproszeniu poszczególnych wartości. Dawkę LD₅₀ metodą Kärbera oblicza się według następującego wzoru:

$$LD_{50} = D - \frac{\sum z \cdot d}{n} ,$$

gdzie:

D – dawka, przy której padły wszystkie zwierzęta;

z – połowa sumy zwierząt padłych po 2 po sobie następujących dawkach;

d – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek;

n – całkowita liczba zwierząt w grupie.

Przykładowe obliczenie przedstawia Tabela 11.4.

Tabela 11.4. Sposób obliczania LD₅₀ metodą Kärbera (w każdej grupie było 6 zwierząt)^a

Dawka (mg/kg m.c.)	Liczba zwierząt padłych w grupie	<i>z</i>	<i>d</i>	<i>z·d</i>
75	0	-	-	-
83	1	0,5	8	4
91	3	2	8	16
100	4	3,5	9	31,5
110	2	3	10	30
121	4	3	11	33
133	6	5	12	60
Suma:				174,5

^a LD₅₀ = 133 - (174,5 : 6) = 104 mg/kg m.c.

Na podstawie przedstawionych powyżej informacji oznaczyć wstępnie określoną dawkę śmiertelną oraz LD₅₀ badanej substancji jedną z wybranych metod oraz określić wartości toksyczne badanej substancji (Tabela 11.2-3). Uzyskane obserwacje i wyniki doświadczenia przedstawić w Tabelach 11.5 i 11.6.

Tabela 11.5. 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 11.6. Toksyczność ostra A-LD₅₀

Dawka A-LD ₅₀ (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 polega jedynie 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 eksponuje 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_{50} 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 metodę 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_{50} dla *Daphnia* i 96-godzinny LD_{50} dla ryb w układach statycznych.

11.2.1. Test toksyczności na rozwielitkach

W teście wykorzystuje się świeżo przeobrażone rozwielitki *Daphnia magna*, jednak nie starsze niż 24-godzinne. Osobniki umieszcza się pojedynczo w 100 cm³ zlewce z 60-80 cm³ 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.

WYKONANIE ĆWICZENIA:

Po 48 godzinach trwania hodowli rozwielitek traktowanych różnymi ksenobiotykami (np. pestycydami, metalami ciężkimi, truciznami organicznymi, detergentami) policzyć ile osobników padło, a ile przeżyło w każdej grupie. Obliczyć wartości z (połowa sumy zwierząt padłych po dwóch po sobie następujących dawkach), d (różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek) oraz $z \cdot d$. Uzyskane dane wpisz do Tabeli 11.7.

Tabela 11.7. Sposób obliczania LD₅₀ metodą Kärbera

Dawka (mg/kg m.c.)	Liczba zwierząt w grupie		z	d	$z \cdot d$
	całkowita	padłych			
Suma					

gdzie:

- z – połowa sumy zwierząt padłych po 2 po sobie następujących dawkach;
 d – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek.

Dane z kolumny $z \cdot d$ zsumuj. Następnie oblicz LD_{50} dla każdej trucizny według poniższego wzoru:

$$LD_{50} = D - \frac{\sum z \cdot d}{n},$$

gdzie:

- D – dawka, przy której padły wszystkie zwierzęta;
 z – połowa sumy zwierząt padłych po 2 po sobie następujących dawkach;
 d – różnica wartości liczbowych 2 kolejnych dawek;
 n – całkowita liczba zwierząt w grupie.

Na podstawie obliczonej dawki LD_{50} dla wybranych substancji chemicznych określ, która z nich jest najbardziej toksyczna.

11.2.2. Test toksyczności na glonach

Jednokomórkowe glony są często wykorzystywane w ocenie i monitoringu środowiska wodnego. Gatunki glonów stosowane w biotestach to: *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Cyclotella cryptica*, *Dunaliella tertiolecta*, *Navicula pelliculosa*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Scenedesmus acutus*, *Poteroiochromonas malhamensis*, *Raphidocelis subcapitata*, *Skeletonema costatum*. Główne powody, dla których testy na glonach stają się popularne to:

1. glony są na najniższym poziomie piramidy pokarmowej (przekazują energię i zanieczyszczenia wyższym organizmom);
2. testy są proste, szybkie i niedrogie;
3. technika jest zminiaturyzowana, co pozwala na liczne powtórzenia;
4. test jest bardziej czuły i wykazuje większą stabilność niż na organizmach wyższych;
5. testy mogą być wykorzystywane do monitoringu różnych wód (np. wód ściekowych, wody porowej osadów) oraz osadów;
6. test może być przeprowadzony jako test chroniczny, gdyż można badać oddziaływanie na wiele pokoleń;

7. test opiera się na pomiarze inhibicji wzrostu glonów (zliczanie komórek, asymilacja ^{14}C , fluorescencja);
8. standaryzacja jest daleko posunięta (UE; USA; Kanada).

Glony są stosowane w testach Algaltoxkit, które opierają się na pomiarze zaniku wzrostu glonów OECD i normie ISO *Water Quality – Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae*. Zasada testu oparta jest na szybkim pomiarze gęstości optycznej glonów (pomiar spektrofotometrem), którą graficznie można przekształcić na liczbę glonów. Powyższy test nie gwarantuje wykrycia wszystkich biologicznych skutków skażenia wód. Należy go traktować jako pierwszy i szybki wskaźnik zagrożeń. Jeśli wskazuje na wysoki stopień toksyczności, uzasadnione jest zastosowanie dużo dokładniejszych metod biologicznych w połączeniu z metodami chemicznymi, co pozwoli na pełniejszą ocenę ryzyka ekotoksykologicznego.

11.2.2.1. Test toksyczności na *Chlorella vulgaris*

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 11.8) 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 cm³ ze 100 cm³ 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 80 małych kwadratach; oznaczenie należy powtórzyć, co najmniej 3-krotnie. Liczbę komórek glonów obliczyć według następującego wzoru:

$$\text{LK} = a \cdot v \cdot 5 \cdot 10^4,$$

gdzie:

LK – liczba komórek;

a – ilość komórek w 80 kwadratach;

v – objętość zawiesiny w cm^3 .

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_{50} badanej substancji metodą Kärbera. Uzyskane obserwacje i wyniki doświadczenia przedstawić w Tabeli 11.9.

Tabela 11.8. Skład pożywki Knopa (mg/cm^3 ; $\text{pH}=6,8$)

1.	KNO_3	0,5
2.	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5
3.	KH_2PO_4	0,2
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
5.	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01
6.	H_3BO_3	0,003
7.	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,002
8.	NH_4VO_3	0,0003
9.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0002
10.	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0001

Tabela 11.9. Zależność między śmiertelnością glonów a wielkością dawki

Dawka (g/kg)	Liczba glonów		Odsetek glonów padłych	Czas od podania do uzyskania efektu śmiertelnego
	w grupie	padłych		

Dawkę LD_{50} metodą Kärbera obliczyć według następującego wzoru (patrz Tabela 11.5):

$$LD_{50} = D - \frac{\sum z \cdot d}{n},$$

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.

11.2.2.2. Oznaczanie stopnia skażenia wody metalami ciężkimi na podstawie zmian gęstości optycznej glonów *Chlorella vulgaris*

Przygotować odpowiednie roztwory glonów *Chlorella vulgaris* i 1% roztworu soli ołowiu $Pb(NO_3)_2$. Każda para studentów przygotowuje jedną kolbkę według procedury przedstawionej w Tabeli 11.10.

Tabela 11.10. Absorbancja zawiesiny glonów pod wpływem soli ołowiu

Stężenie azotanu ołowiu	Skład roztworów w kolbce	Absorbancja zawiesiny w dniu założenia hodowli	Absorbancja zawiesiny glonowej w 7 dni	% inhibicji wzrostu glonów
0 (kontrola)	50 cm ³ glonów			
1	49 cm ³ glonów+1 cm ³ 1% $Pb(NO_3)_2$			
5	45 cm ³ glonów+5 cm ³ 1% $Pb(NO_3)_2$			
10	40 cm ³ glonów+10 cm ³ 1% $Pb(NO_3)_2$			
15	35 cm ³ glonów+15 cm ³ 1% $Pb(NO_3)_2$			
20	30 cm ³ glonów+20 cm ³ 1% $Pb(NO_3)_2$			

Następnie każda para mierzy w spektrofotometrze gęstość optyczną roztworu glonów. W tym celu należy dokładnie wymieszać zawieszoną glonów, pipetą pobrać do kuwety 3 cm³ roztworu i zmierzyć jego absorbancję przy długości fali $\lambda=680$ nm wobec wody destylowanej w spektrofotometrze. Pomiar wykonać w dniu założenia hodowli oraz po 7 dniach. Wyniki umieścić w tabeli.

Oblicz procent inhibicji (%I) glonów według wzoru:

$$\%I = \frac{G_c - G_7}{G_c - G_0} ,$$

gdzie:

G_c – absorbancja roztworu glonów (gęstość optyczna) w próbce kontrolnej po 7 dniach;

G_7 – absorbancja roztworu glonów (gęstość optyczna) w próbce badanej po 7 dniach;

G_0 – absorbancja roztworu glonów (gęstość optyczna) w próbce kontrolnej w dniu założenia hodowli.

Na podstawie wyników sporządź wykres zależności dawka–efekt (na osi Y – % inhibicji, na osi X – dawka).

Toksykologia żywności – jest to nauka eksperymentalna, badająca zależności między budową chemiczną i działaniem biologicznym szkodliwych substancji naturalnych występujących w produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz wytwarzających się w nich wskutek działania czynników biologicznych, chemicznych i fizycznych oraz w wyniku interakcji ze składnikami żywności.

Celem toksykologii żywności jest badanie oraz zapobieganie zatruciom wywołanym przez substancje trafiające do organizmu z racją pokarmową. Zatrucia mogą być spowodowane obecnością w żywności:

- naturalnych substancji szkodliwych, występujących w roślinach i zwierzętach;
- substancji toksycznych, które mogą powstawać ze składników naturalnych w czasie procesów technologicznych i przechowywania żywności;
- związków chemicznych dodawanych celowo do żywności lub stykających się z nią podczas uprawy roślin przeznaczonych do spożycia, hodowli zwierząt, a także przetwórstwa, przechowywania i rozprowadzania;
- substancji dodawanych w celu zafałszowania;
- substancji stanowiących zanieczyszczenie środowiska (Tabela 12.1).

Tabela 12.1. Pochodzenie wybranych zanieczyszczeń chemicznych żywności

Źródło	Przykładowe zanieczyszczenia chemiczne
Środowisko	pierwiastki szkodliwe, azotany, azotyny, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), polichlorowane bi- i tri-fenyle, dioksyny, pestycydy
Produkcja rolnicza	pestycydy, azotany, azotyny, pierwiastki szkodliwe
Hodowla zwierząt	leki weterynaryjne, stymulatory wzrostu, pestycydy, naturalne substancje przechodzące z pasz
Procesy przetwórcze	katalizatory, środki sanityzujące, substancje pomocnicze, substancje powstające w czasie procesów (WWA, heterocykliczne aminy)
Urządzenia, opakowania, przechowywanie	pierwiastki szkodliwe, niskocząsteczkowe składniki tworzyw sztucznych, nitrozoaminy

Substancje dodatkowe do żywności – substancje normalnie nie spożywane jako żywność, niebędące typowymi składnikami żywności, posiadające lub nieposiadające wartości odżywczych, których celowe użycie spowoduje konkretne rezultaty w środku spożywczym lub jego komponencie. Substancje te możemy podzielić w następujący sposób:

1. **Food constituent** – jest to składnik produktu żywnościowego, który występuje w jego pierwotnym (naturalnym) składzie – składnik naturalny, np. skrobia (składnik ziemniaka).
2. **Food ingredient** – jest to substancja wprowadzona do żywności, która staje się składową produktu – dodatek uzupełniający, np. mączka (skrobia) ziemniaczana dodana do wyrobu pieczywa, żelatyna.
3. **Food additive** – jest to substancja, którą wprowadza się do żywności w celach technologicznych, w tym organoleptycznych – dodatek technologiczno-funkcjonalny, sama nie jest spożywana i nie stosowana jako jej składnik (oznaczone zostały symbolami E).

Substancje dodatkowe można dodawać do żywności w celu:

- poprawienie cech funkcjonalnych produktów, np. przedłużenie ich trwałości, zapewnienia bezpieczeństwa spożycia przez ograniczenie i zapobieganie niekorzystnym zmianom jakościowym wywoływanym przez drobnoustroje, enzymy tkankowe, utlenianie, itp.;

- zapobieganie niekorzystnym zmianom organoleptycznym – barwy, smaku, zapachu, konsystencji;
- zamiany składników droższych lub trudno dostępnych na tańsze;
- podniesienie atrakcyjności konsumenckiej;
- zastąpienie składników niepożądanych;
- ułatwianie produkcji, zwiększenie jej efektywności, np. zmniejszenie ubytków;
- uzyskania korzyści zdrowotnych (produkcja nowych produktów specjalnego przeznaczenia o działaniu prozdrowotnym);
- istnieje uzasadniona i możliwa do wykazania technologiczna potrzeba użycia, a zamierzonego celu nie można osiągnąć innymi ekonomicznymi i technologicznie stosowanymi środkami;
- nie stanowią one żadnego zagrożenia dla zdrowia konsumenta przy proponowanym dawkowaniu;
- użycie substancji dodanej do żywności nie wprowadza w błąd konsumenta co do jakości stosowanego środka spożywczego;
- spełniają one zatwierdzone wymagania dotyczące kryteriów ich czystości;

Dopuszczalną zawartość substancji niebezpiecznych w żywności opisuje wskaźnik **ADI** (ang. *Acceptable Daily Intake*), czyli maksymalna ilość substancji, która zgodnie z aktualnym stanem wiedzy może być przez człowieka pobierana codziennie z żywnością przez całe życie prawdopodobnie bez negatywnych skutków dla zdrowia. Wskaźnik ADI jest określany m.in. dla większości dodatków do żywności, pozostałości pestycydów i leków weterynaryjnych. Wskaźnik ADI jest najczęściej podawany w miligramach na kilogram masy ciała (mg/kg) na 1 dzień i dotyczy łącznego pobrania substancji różnymi drogami (z żywnością, powietrzem, lekami, kosmetykami, itp.).

Cele zastosowania ADI:

- ADI służy ochronie zdrowia konsumentów i ułatwia międzynarodowy handel żywnością.
- ADI jest praktycznym podejściem, określającym bezpieczeństwo dodatków do żywności i jest sposobem osiągnięcia pewnej harmonizacji w zakresie kontroli.
- korzyścią regulacji i doradztwa wartości ADI dla dodatków do żywności jest to, że mają one uniwersalne zastosowanie w różnych krajach i wszystkich sektorach populacji.

Każda substancja dodatkowa jest opatrzona numerem identyfikacyjnym według systemu międzynarodowego:

1. Barwniki: E-100 – E-199 (Tabela 12.2),
2. Substancje konserwujące: E-200 – E-299 (Tabela 12.3),
3. Przeciwtleniacze i synergenty: E-300 – E-399 (Tabela 12.4),
4. Substancje stabilizujące, zagęszczające, emulgujące, stosowane na powierzchnię wyrobów, wypełniające: E-400 – E-499 (Tabela 12.5),
5. Środki pomocnicze: E-500 – E-599 (Tabela 12.6),
6. Wzmacniacze smaku: E-600 – E-699 (Tabela 12.7),
7. Środki słodzące, nablyszczające i inne: E-900 – E-999 (Tabela 12.8),
8. Stabilizatory, konserwanty, zagęstniki i inne: E-1000 – E-1999 (Tabela 12.9).

Tabela 12.2. Wykaz wybranych barwników dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr	ADI (mg/kg m.c.)
1. Barwniki organiczne naturalne		
Kurkumina	E 100	0-3
Koszenila (kwas karminowy)	E 120	0-5
Chlorofile i chlorofiliny	E 140	Brak limitu
Karmel	E 150a	Brak limitu
Węgiel roślinny	E 153	?
Karoteny	E 160a	0-5
Annato	E 160b	0-0,65
Ekstrakt z papryki (kapsantyna, kapsorubina)	E 160c	?
Ekstrakt z pomidorów (likopen)	E 160d	?
2. Barwniki identyczne z naturalnymi		
Ryboflawina i ryboflawiny-5'-fosforan	E 101	0-0,5
Karmel siarczynowy	E 150b	?
Karmel amoniakalny	E 150c	0-200
Karmel amoniakalno-siarczynowy	E 150d	0-200
Beta-apo-8'-karotenal	E 160e	0-56
Ester etylowy kwasu beta-apo-8'-karotenowego	E 160f	0-5
3. Barwniki organiczne syntetyczne		
Tartrazyna	E 102	0-7,5

cd. Tabela 12.2.

Nazwa substancji	Nr	ADI (mg/kg m.c.)
Żółcień chinolinowa	E 104	0-10
Żółcień pomarańczowa S	E 110	0-2,5
Azorubina	E 122	0-4
Amarant	E 123	0-0,5
Czerwień koszenilowa	E 124	0-4
Erytrozyna	E 127	0-0,1
Czerwień 2G	E 128	0-0,1
Błękit patentowy	E 131	0-2,5
4. Barwniki nieorganiczne		
Węglany wapnia	E 170	Brak limitu
Dwutlenek tytanu	E 171	Brak limitu
Tlenki i wodorotlenki żelaza	E 172	0-0,5
Aluminium	E 173	7
Srebro	E 174	?
Złoto	E 175	?

Tabela 12.3. Wykaz wybranych substancji konserwujących dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr	ADI (mg/kg m.c.)
Kwas sorbowy	E 200	0-25
Kwas benzoesowy	E 210	0-5
Benzoesan sodu	E-211	0-5
Azotan potasu	E-252	0-3,7
Kwas mlekowy	E-270	Brak limitu

Tabela 12.4. Wykaz wybranych przeciwutleniaczy i synergentów dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr	ADI (mg/kg m.c.)
Mieszanka tokoferoli	E 306	0-2
Galusan propylu	E 310	0-2,5
Butylohydroksyanizol (BHA)	E 320	0-0,5
Kwas L-askorbinowy	E 300	Brak limitu
Lecytyna	E 322	Brak limitu
Kwas cytrynowy	E 330	Brak limitu

cd. Tabela 12.4.

Nazwa substancji	Nr	ADI (mg/kg m.c.)
Kwas winowy	E 334	?
Jabłczan sodu	E 350	0-100
Kwas mlekowy	E 270	Brak limitu

Tabela 12.5. Wykaz wybranych substancji stabilizujących, zagęszczających, emulgujących, stosowanych na powierzchnię wyrobów, wypełniających, które zostały dopuszczone do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr
Kwas alginowy	E 400
Alginian sodu	E 401
Alginian potasu	E 402
Alginian amonu	E 403
Alginian wapnia	E 404
Alginian propylenowo-glikolowy	E 405
Agar, agar-agar, isinglass	E 406
Karagen	E 407
Mączka chleba świętojańskiego, Carob, Carubin, Arobon	E 410
Guma guar, guaran	E 412
Tragant (tragakant)	E 413
Guma arabska	E 414
Ksantan	E 415
Sorbitol, syrop sorbitolowy	E 420
Mannitol	E 421
Glicerol, 1,2,3-propanotriol, gliceryna	E 422
Estry polioksyetylenów sorbitanowych i kwasów tłuszczowych: laurynowego, oleinowego, palmitynowego, mono- i tristearynowego	E 432-436
Pektyna	E 440a
Pektyna amoniakalna	E 440b
Fosforany i polifosforany sodu i potasu	E 450-452
Celuloza	E 460
Metyloceluloza	E 461
Hydroksypropylometyloceluloza	E 464
Metyloetyloceluloza	E 465
Sól sodowa karboksymetylocelulozy, CMC	E 466
Kazeinian sodu	E 469
Grupa soli sodowych, potasowych i wapniowych kwasów tłuszczowych o podobnych właściwościach	E 470

Tabela 12.6. Wykaz wybranych środków pomocniczych dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr
Węglany sodu: węglan sodu, wodorowęglan sodu, wodoro-diwęglan trisodu	E500
Kwas chlorowodorowy (kwas solny)	E507
Chlorek potasu	E508
Kwas siarkowy	E513
Siarczany sodu: siarczan sodu, wodorosiarczan sodu	E514
Wodorotlenek sodu	E524
Woda amoniakalna	E527
Tlenek wapnia	E529
Żelazocyjanek sodu	E535
Krzemian wapnia	E552
Talk	E553b
Krzemian glinu sodu	E554
Kwasy tłuszczowe	E570
Kwas glukonowy	E574
Mleczan żelaza(II)	E585
4-Heksylorzecynol	E586

Tabela 12.7. Wykaz wybranych wzmacniaczy smaku dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr
Kwas glutaminowy	E620
Glutaminian sodu	E621
Kwas guanylowy	E626
Guanylan disodowy	E627
Guanylan dipotasu	E628
Guanylan wapnia	E629
Kwas inozynowy	E630
Inozynian disodowy	E631
5'-Rybonukleotydy disodu	E635
Glicyna i jej sól sodowa	E640
Octan cynku	E650

Tabela 12.8. Wykaz wybranych wzmacniaczy smaku dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr
Dimetylopolisiloksan	E900
Wosk pszczeli, biały i żółty	E901
Wosk candelilla	E902
Wosk carnauba	E903
L-Cysteina	E920
Karbamid	E927b
Argon	E938
Hel	E939
Azot	E941
Tlenek diazotu	E942
Butan	E943a
Propan	E944
Tlen	E948
Wodór	E949
Acesulfam K	E950
Aspartam	E951
Cyklaminiany	E952
Izomalt	E953
Sacharyna	E954
Sukraloza	E955
Taumatyna	E957
Neohesperydyna DC	E959
Neotam	E961
Sól aspartamu i acesulfamu	E962
Maltitole: maltitol, syrop maltitolowy	E965
Laktitol	E966
Ksylitol	E967
Erytrytol	E968
Ekstrakt Quillaia	E999

Tabela 12.9. Wykaz wybranych stabilizatorów, konserwantów, zagęstników i innych substancji, które zostały dopuszczone do stosowania w Polsce

Nazwa substancji	Nr
Inwertaza	E1103
Lizozym	E1105
Polidekstroza	E1200
Poliwinylopirolidon	E1201
Poliwinylopirolidonon	E1202
Alkohol poliwinylowy (PVA)	E1203
Pullulan	E1204
Zasadowy kopolimer metakrylanu	E1205
Skrobia utleniona	E1404
Fosforan monoskrobiowy	E1410
Fosforan diskrobiowy	E1412
Fosforanowany fosforan diskrobiowy	E1413
Acetylowany fosforan diskrobiowy	E1414
Skrobia acetylowana	E1420
Acetylowany adypinian diskrobiowy	E1422
Hydroksypropyloskrobia	E1440
Hydroksypropylofosforan diskrobiowy	E1442
Sól sodowa oktenylobursztynianu skrobiowego	E1450
Acetylowana skrobia utleniona	E1451
Sól glinowa oktenylobursztynianu skrobiowego	E1452
Cytrynian trietylu	E1505
Diocetan glicerolu (diacetyna)	E1517
Triocetan glicerolu (triacetyna)	E1518
Alkohol benzylowy	E1519
Propano-1,2-diol (glikol propylenowy)	E1520
Glikol polietylenowy	E1521

12.1. Naturalne substancje żywności o potencjalnym działaniu toksycznym

Substancjami naturalnymi znajdującymi się w żywności, które wykazują działanie szkodliwe na organizm człowieka, są:

- **glikozydy cyjanogenne** (np. **amygdalina**, występująca w nasionach migdałów, brzoskwiń, moreli, śliw i wiśni oraz **sambunigryna** występująca w bzie czarnym), które powodują duszność, utratę przytomności, porażenie ośrodkowego oddechowego oraz czynności serca;
- **glikozydy saponinowe** występujące w kukułku, wykazujące działanie hemolityczne,
- **solanina** (występująca w niedojrzałych ziemniakach) oraz **tomatyna** (występująca w niedojrzałych pomidorach), które działają drażniąco na przewód pokarmowy;
- **alkaloidy sporyszu** zanieczyszczające zboże i ryż, które mogą być przyczyną halucynacji, przykurczów mięśni, prowadzących z powodu niedokrwienia do martwicy tkanek (w szczególności kończyn);
- **alkaloidy obecne w używkach** (kawie i herbacie), których nadużywanie jest szkodliwe.

Powyższe związki zostały szerzej omówione w rozdziale 8 (*Wybrane substancje toksyczne pochodzenia roślinnego*). Do naturalnych substancji antyodżywczych znajdujących się w pokarmach zaliczamy także **szczawiany** oraz **goitrogeny**.

12.1.1. Szczawiany

Kwas szczawiowy to dwukarboksylowy kwas organiczny, który jest dobrze rozpuszczalny w wodzie i dobrze dysocjuje. Jego sole sodowe i potasowe są również rozpuszczalne w wodzie, natomiast sole wapniowe, magnezowe i sole metali ciężkich są bardzo trudno rozpuszczalne w wodzie. Szczawian wapnia jest praktycznie tylko rozpuszczalny w stężonych kwasach. Kwas szczawiowy głównie występuje u roślin w postaci rozpuszczalnych soli potasu i sodu oraz w formie wolnej. Naj-

bogatszym źródłem tego związku są: rabarbar, szpinak, szczaw, kawa, herbata, kakao (Tabela 12.10).

Tabela 12.10. Zawartość kwasu szczawiowego w wybranych produktach spożywczych

Warzywa		Owoce		Użytki	
Produkt	Zawartość kwasu szczawiowego (mg/100 g)	Produkt	Zawartość kwasu szczawiowego (mg/100 g)	Produkt	Zawartość kwasu szczawiowego (mg/100 g)
Buraki, liście	300-920	Jabłka	0-30	Herbata	300-2000
Buraki korzeń	121-450	Mandarynki	20-30	Kakao	500-900
Rabarbar	275-1336	Pomarańcze	20-30	Kawa	50-150
Szczaw	270-730	Porzeczki	2-90		
Szpinak	320-1260	Truskawki	2-47		

Antyodżywcze działanie kwasu szczawiowego polega na tym, że tworzy nierozpuszczalne sole z metalami di- i triwartościowymi, co powoduje zmniejszenie ich wykorzystania z pożywienia. Sporadyczne spożycie pożywienia zawierającego szczawiany nie wpływa na stan zdrowia. Natomiast kwas szczawiowy, obecny stale w dużych ilościach w diecie ludzi, przy niedostatecznej podaży wapnia i witaminy D może wywierać ujemny wpływ na wchłanianie i retencję wapnia, a w konsekwencji na bilans wapnia w ustroju.

Zatrucie kwasem szczawiovym polega na wiązaniu jonów wapniowych w płynach ustrojowych w nierozpuszczalny szczawian wapnia, co prowadzi do hipokalcemii, której objawem są tężyczka (skurcz mięśni) oraz demineralizacja tkanki kostnej (krzywica, rozmiękanie kości). Początkowe ostre zatrucia objawiają się zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi (nudności, wymioty, biegunka), później dołączają się zaburzenia układu nerwowego (tężyczka, szcękocisk, ślinotok) oraz moczowego (zmniejszenie diurezy, ostra niewydolność nerek). Mocz staje się ciemny, zawiera różne białka (m.in. hemoglobinę) oraz wałeczki i kryształki

szczawianu wapnia. Wydalany w moczu krystaliczny szczawian wapnia może zaczołpować kanaliki nerkowe, co w efekcie prowadzi do bezmoczności. Następują również zaburzenia krążenia krwi (zwolnienie czynności serca, spadek ciśnienia krwi). Kwas szczawiowy jest inhibitorem dehydrogenazy mleczanowej oraz zakłóca metabolizm glukozy.

Spożywanie nadmiernej ilości produktów bogatych w szczawiany nie jest wskazane, szczególnie w warunkach nieprawidłowego funkcjonowania nerek, wątroby, trzustki i gruczołów wydzielania wewnętrznego. Ochronę organizmu przed stratami składników mineralnych, zwłaszcza wapnia, spowodowanych częstym spożywaniem produktów zawierających kwas szczawiowy można zapewnić przez:

- ograniczenie produktów zawierających duże ilości kwasu szczawiowego lub eliminowanie ich z diety (szczególnie u osób z kamicią nerkową oraz chorobami jelit);
- uzupełnienie diety w wapń poprzez spożywanie dodatkowej ilości produktów bogatych w ten pierwiastek (np. kawa, herbata z mlekiem, zupa szczawiowa zabieleną mlekiem lub śmietaną, szpinak ze śmietaną lub dodatkiem mleka).

12.1.1.1. Oznaczanie zawartości szczawianów rozpuszczalnych w wybranych produktach spożywczych

Celem ćwiczenia jest zapoznanie z ilościową metodą oznaczania rozpuszczalnego kwasu szczawiowego w wybranych używkach oraz określenie stopnia wiązania wapnia przez kwas szczawiowy. Szczawiany rozpuszczalne wymywane są z produktu wodą na gorąco, a szczawiany ogółem – roztworem kwasu solnego. Oznaczanie polega na:

- wytrąceniu nierozpuszczalnego szczawianu wapnia (osadu) buforowym 5% roztworem CaCl_2 (aceton i niska temperatura przyspieszają uformowanie osadu);
- rozpuszczeniu na gorąco szczawianu wapnia w 10% roztworze kwasu siarkowego;
- miareczkowaniu na gorąco 0,02 M KMnO_4 .

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 5% roztwór chlorku wapnia (CaCl_2);
2. aceton cz.d.a.;
3. 10% roztwór kwasu siarkowego (H_2SO_4);
4. 0,02 M roztwór nadmanganianu potasu (KMnO_4);
5. waga analityczna, próbki wirówkowe o pojemności 100 cm^3 , pipety, cylindry miarowe, zlewki, wirówka, lodówka, łaźnia wodna, biurety, kolby stożkowe o pojemności 200 cm^3 .

WYKONANIE OZNACZENIA:

Odważyć na wadze analitycznej łyżeczkę (około 3 g) kawy lub herbaty, zalać 100 cm^3 wrzącej wody destylowanej i odczekać 5 minut. Z przyrządzonego naparzu przenieść (po ewentualnym przesączeniu) 10 cm^3 do próbki wirówkowej o pojemności 100 cm^3 . Dodać 5 cm^3 5% roztworu CaCl_2 i 5 cm^3 acetonu. Wstawić do lodówki na 15 minut. Powstały osad szczawianu wapnia odwirować przez 10 minut przy 3000 obr./min. Płyn z nad osadu wylać. Osad przenieść do kolbki stożkowej za pomocą 5 cm^3 10% kwasu siarkowego i rozpuścić na gorąco w łaźni wodnej. Miareczkować natychmiast 0,02 M roztworem nadmanganianu potasowego do uzyskania barwy różowej, utrzymującej się około 1 minuty. Na podstawie uzyskanych wyników:

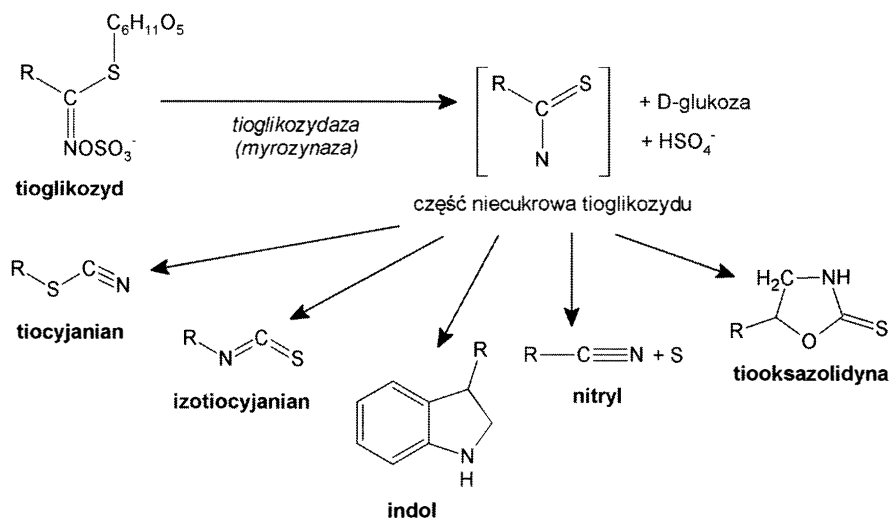
- obliczyć ilość rozpuszczonego kwasu szczawowego w 100 g produktu, przyjmując, że 1 cm^3 0,02 M KMnO_4 odpowiada 0,9 mg szczawianu;
- podać, jak ilość wapnia jest wiązana przez rozpuszczalny kwas szczawowy zawarty w naparzu przygotowanym z 3 g herbaty lub kawy, wiedząc, że 90 mg kwasu szczawowego wiąże 40 mg wapnia;
- podać, ile mleka należy dodać do naparzu sporządzonego z 3 g kawy lub herbaty, aby wapń zawarty w mleku związał rozpuszczalny kwas szczawowy z naparzu (w 100 g mleka jest 120 mg wapnia);
- zwrócić uwagę na różnice zawartości kwasu szczawowego w produktach spożywczych.

12.1.2. Goitrogeny

Goitrogeny (substancje wolotwórcze) zaburzają metabolizm jodu w organizmie, co w konsekwencji prowadzi do spadku syntezy tyroksyny oraz przerostu tarczycy. Do naturalnych substancji wolotwórczych zaliczamy: tioglikozydy, glikozydy cyjanogenne, polifenole oraz hemaglutyniny.

Tioglikozydy występują głównie w roślinach krzyżowych takich, jak: kapusta biała, rzeżucha, brokuły, kalafior, rzepa, rzodkiewka. Są to związki posiadające wiązanie S-glikozydowe. Pod wpływem tioglikozydazy (myrozynazy) tioglikozydy (Rycina 12.1) ulegają hydrolizie i powstają z nich: tiocyjaniany, izotiocyjaniany, związki indolowe, nitryle oraz tiooksazolidyny. Myrozynaza występuje w komórkach roślin krzyżowych, a jej działanie jest możliwe dopiero po zmiążdżeniu tkanek i uwolnieniu się soku komórkowego. W związku z tym enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma miejsce w czasie żucia w jamie ustnej, a także przy rozdrabnianiu warzyw podczas przygotowywania potraw. Dopiero jednak ekstrakcja wodą oraz gotowanie uwalnia większość aktywnych związków (tzn. tiocyjaniany, izotiocyjaniany, związki indolowe, nitryle oraz tiooksazolidyny). Większość uwalnianych podczas hydrolizy substancji jest lotna i ulatnia się z parą wodną, natomiast w temperaturze 90 °C, enzym myrozynaza ulega denaturacji. Zaburzenie metabolizmu tarczycy można wywołać nie tylko przez spożywanie roślin krzyżowych, ale także manioku, soi, czosnku i cebuli. Aktywność goitrogenowa poszczególnych związków nie jest identyczna.

Tiocyjaniany (SCN⁻) z łatwością przenikają przez błony komórkowe i konkurując z jonami jodu, powodują hamowanie ich transportu do tarczycy. Tiocyjaniany ponadto przyspieszają wydalanie jodu przez nerki, inaktywują peroksydazę tarczycową odpowiedzialną za utlenianie anionu jodu, tzw. organifikację jodu (konwersja jodu nieorganicznego w organiczny) i sprzęganie jodotyrozyn. Powoduje to spadek stężenia jodu w tarczycy, utrudnione jodowanie tarczycy, gromadzenie się mono- i diiodotyrozyny, co powoduje wzrost masy gruczołu.



Rycina 12.1. Enzymatyczna hydroliza tioglikozydów

Izotiocyjaniany (NSC^-) występują w olejkach gorczycznych i są głównymi toksycznymi produktami hydrolizy tioglikozydów. Hamują aktywność peroksydazy tarczycowej, co powoduje spadek poziomu hormonów tarczycy. Silnie drażnią błony śluzowe oraz powodują przekrwienie skóry. Ponadto działają żółciopędnie i żółciotwórczo, przeciwzapalnie oraz bakterio- i fungistatycznie. Wykazują właściwości antynowotworowe, chronią przed rakiem piersi, płuc, okrężnicy, żołądka, prostaty. Wykazano, że stymulują apoptozę komórek nowotworowych.

Nitryle są najbardziej toksycznymi produktami rozpadu tioglikozydów, które działają szkodliwie na nerki. Natomiast **tiookasazolidyny** hamują syntezę tyroksyny i jej sekrecję do krwi. Przedstawicielem tych związków jest progoitryna, która w dużych ilościach występuje w nasionach żółtej rzepy i rzepaku.

Glikozydy cyjanogenne są źródłem cyjanków, które są bardzo silną trucizną. Blokują one aktywność oksydazy cytochromowej oraz są przyczyną zaburzeń ze strony układu nerwowego. Wolotwórcze działanie glikozydów cyjanogennych polega na tworzeniu się jonów tiocyjanianowych (SCN^-) w czasie detoksykacji cyjanków w organizmie.

Bogatym źródłem glikozydów cyjanogennych jest maniok, stanowiący jeden z głównych produktów spożywczych w Nigerii, Zairze i Kamerunie. Spożywanie dużej ilości manioku w tych krajach jest przyczyną występowania wola endemicznego (zjawisko często obserwowane na terenach oddalonych od morza, przy niedostatecznej ilości jodu w powietrzu i pożywieniu).

Polifenole wchodzą w reakcje z jodem, hamując w ten sposób jodowanie i syntezę tyrozyny. Do naturalnych polifenoli należą: kwercytyna, hesperetyna, antocyjanidyny, które występują w połączeniach z cukrami jako glikozydy (np. rutyna, hesperydyna, antocyjaniny). Ich bogatym źródłem jest czerwona kapusta.

Hemaglutyniny występują w soi i fasoli. Na skutek powinowactwa do błon komórkowych obniżają możliwość absorpcji jelitowej jodu oraz reabsorpcji tyroksyny wydzielanej z żółcią do światła jelita.

12.1.2.1. Oznaczanie zawartości izotiocyjanianów w wybranych roślinach

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości izotiocyjanianów w wybranych roślinach uprawnych oraz wykazanie wpływu wysokiej temperatury na ich poziom w produkcie. Metoda polega na ekstrakcji izotiocyjanianów z badanej próby kwasem trichlorooctowym i ich reakcji barwnej z jonami żelaza.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 5% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA);
2. roztwór azotanu żelaza (II) (80g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 250 cm³ 2 M HNO_3 , uzupełnić do 500 cm³ wodą);
3. wzorzec rodanku amonowego (przygotować roztwór podstawowy jonów SCN^- , rozpuszczając 16,7 mg rodanku potasowego w 100 cm³ 5% TCA. Następnie 10 cm³ tego roztworu rozcieńczyć tym samym kwasem do 100 cm³, co pozwoli na uzyskanie roztworu wzorcowego, którego 1 cm³ zawiera 10 µg jonów SCN^-);
4. waga analityczna, próbówki wirówkowe, wirówka, cylindry miarowe, bagietki, sprzęt do rozdrabniania warzyw (tarki), łaźnia wodna, zlewki, sączki, lejki, pipety, moździerz porcelanowe, wirówka, spektrofotometr;
5. warzywa: czosnek, cebula, chrzan, kapusta, brokuły, kalafior, por, pietruszka, rzepa, rzeżucha, rzodkiew, seler.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Z jednorodnej rozdrobnionej próby badanego materiału przygotować dwie naważki po 1 g. Jedną z nich przenieść do zlewki na 100 cm³, dodać 10 cm³ wody i ogrzewać w łaźni wodnej, utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 minut.

Następnie surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał rozetrzeć dokładnie w moździerzu porcelanowym, przenieść ilościowo do próbki, używając 9 cm³ 5% TCA i wytrząsać przez 10 minut. Po tym czasie próby odwirować przy 3000 obr./min. przez 10 minut i sączyć przez twardy sączek.

Z przesączu gotowanego i surowego (po dokładnym wymieszaniu) pobrać po 2 cm³ do dwóch nowych próbek. Jednocześnie należy przygotować próbę ślepą (2 cm³ wody destylowanej) i próbę wzorcową (2 cm³ roztworu rodanku amonowego). Do wszystkich próbek należy dodać 2 cm³ roztworu azotanu żelaza (II). Następnie należy zmierzyć absorbancję prób badanych wobec próby ślepej przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 minut od dodania azotanu żelazowego.

Stężenie izotiocyanianów w badanych próbach (w przeliczeniu na naważkę) należy policzyć ze wzoru:

$$C_i = \left(\frac{A_p \cdot S_w}{A_w} \cdot 9 \right) \div M ,$$

gdzie:

C_i – stężenie izotiocyanianów;

A_w – wartość absorbancji dla długości fali = 470 nm;

S_w – stężenie wzorca (10 µg/cm³);

9 – rozcieńczenie;

A_p – wartość absorbancji poszczególnych prób badanych;

M – naważka w g.

Otrzymane wyniki zestawić w Tabeli 12.11.

Tabela 12.11. Zawartość izotiocyanianów w wybranych warzywach w temperaturze pokojowej i pod wpływem gotowania

Rodzaj produktu	Zawartość izotiocyanianów [µg/g]							...
	czosnek	cebula	chrzan	pietruszka	por	seler	rzodkiew	
Surowy								
Gotowany								

Na podstawie uzyskanych wyników:

- porównaj zawartość izotiocyanianów w różnych gatunkach roślin jadalnych;
- określ wpływ wysokiej temperatury na zawartość tych związków w warzywach.

12.2. Substancje działające szkodliwie po celowym dodaniu do żywności

Do tej grupy związków można zaliczyć substancje chemiczne przedłużające trwałość żywności. Ich celem jest ograniczenie lub zapobieganie niekorzystnym zmianom powodowanym przez drobnoustroje, enzymy tkankowe oraz abiotyczne procesy degradacyjne, np. utlenianie. Dodatki, które zapobiegają psuciu się żywności można podzielić na dwie zasadnicze grupy o zupełnie innym charakterze działania, a mianowicie na substancje, które zapobiegają zmianom powodowanym przez:

- drobnoustroje, czyli konserwanty (substancje przeciwbakteryjne);
- tlen z powietrza, czyli przeciwutleniacze (antyoksydanty).

12.2.1. Substancje konserwujące

12.2.1.1. Właściwości i toksyczność

Nazwa substancji	Kwas benzoesowy
Właściwości	Białe kryształy, bez zapachu, słabo rozpuszczalny w wodzie, dobrze w etanolu i eterze; w środowisku kwaśnym (pH 3-4,5) hamuje rozwój drożdży i pleśni, mniej skuteczny w stosunku do bakterii; działanie jego wspomaga obecność ditlenku siarki, soli, cukru oraz kwasu sorbowego i jego soli.
Działanie na organizm	W przewodzie pokarmowym wchłania się szybko i jest wydalany z moczem, głównie w postaci kwasu hipurowego lub benzoiloglukuronidu, a częściowo w postaci wolnej. W większych dawkach może wywołać objawy zatrucia (wymioty, bóle głowy, alergie, uczucie drapania w gardle, podrażnienie nabłonka, zakwaszenie organizmu).
ADI (mg/kg m.c.)	0-5

Nazwa substancji **Kwas salicylowy i jego sól sodowa****Właściwości**

Tworzą lekkie, białe krystaliczne igły, bezzapachowe o ostrym słodko-kwaśnym smaku.

Działanie na organizm

Są stosowane w ograniczonym zakresie, ponieważ wyniki badań wskazują na szkodliwe działanie na organizm człowieka.

ADI (mg/kg m.c.)

Nie jest dopuszczony w Polsce.

Nazwa substancji **Kwas sorbowy****Właściwości**

Bezbarwne kryształy lub biały proszek o słabym zapachu i lekko kwaśnym smaku; dobrze rozpuszczalny w gorącej wodzie, etanolu i oleju; hamuje rozwój pleśni i drożdży (pH 3-6); obecność soli kuchennej, cukru, kwasu propionowego, nizyny i fosforanów zwiększa jego działanie konserwujące.

Działanie na organizm

W organizmie człowieka ulega procesowi β -oksydacji, typowej dla kwasów tłuszczowych. Jeden z bezpieczniejszych środków konserwujących, uznany za nietoksyczny dla organizmu człowieka.

ADI (mg/kg m.c.)

0-25

Nazwa substancji **Kwas mrówkowy****Właściwości**

To bezbarwna, przezroczysta ciecz o ostrym, drażniącym zapachu. Jest stosowany do konserwowania żywności i jako składnik kompozycji zapachowych.

Działanie na organizm

Ze względu na brak pełnych badań toksykologicznych jego stosowanie jest ograniczone. W organizmie człowieka szybko utlenia się do ditlenku węgla.

ADI (mg/kg m.c.)

0-3

Nazwa substancji **Kwas octowy****Właściwości**

To bezbarwna ciecz o ostrym, drażniącym zapachu. Stosowany jest jako środek konserwujący w postaci 6% lub 10% roztworu wodnego. Występuje naturalnie w żywności w wyniku fermentacji octowej.

Działanie na organizm

Występuje w organizmie jako składnik fizjologiczny. Przemiana kwasu octowego prowadzi do ditlenku węgla i wody.

ADI (mg/kg m.c.)

Nie określono.

Nazwa substancji Estry kwasu p-hydroksybenzoesowego: etylowy, propylowy**Właściwości**

Kryształy lub biały proszek, bez zapachu, trudno rozpuszczalne w wodzie, dobrze w etanolu; hamują rozwój pleśni, bakterii i drożdży (pH 3-6); odporne na działanie tlenu z powietrza oraz niskie i wysokie temperatury stosowane w przetwórstwie.

Działanie na organizm

Wchłaniają się szybko, ulegają hydrolizie w jelicie cienkim i są wydalane z moczem w postaci niezmienionej lub w połączeniu z kwasem glukuronowym. Mogą powodować miejscowe znieczulenie błony śluzowej jamy ustnej.

ADI (mg/kg m.c.) 0-10**Nazwa substancji** Formaldehyd**Właściwości**

W postaci par lub roztworów jest stosowany do dezynfekcji.

Działanie na organizm

Prawdopodobne działanie rakotwórcze.

ADI (mg/kg m.c.) Nie jest dopuszczony w Polsce.**Nazwa substancji** Dinitlenek siarki**Właściwości**

Bezbarwny, drażniący gaz, rozpuszczalny w wodzie i etanolu; skutecznie działa na bakterie i pleśnie, słabiej na drożdże (pH 1-6); posiada właściwości odkażające, wybielające, hamuje aktywność enzymów oksydoredukcyjnych (stabilizacja witaminy C); zapobiega enzymatycznemu i nieenzymatycznemu brunatnieniu oraz tworzeniu się nitrozoamin.

Działanie na organizm

Może powodować podrażnienia przewodu pokarmowego oraz reakcje alergiczne; długotrwałe przyjmowanie, nawet w małych dawkach, obniża odporność organizmu.

ADI (mg/kg m.c.) 0-0,7**Nazwa substancji** Nadtlenek wodoru**Właściwości**

Bezbarwna ciecz o właściwościach kwasowych. Jest jedną z reaktywnych form tlenu. Środek konserwujący mleko.

Działanie na organizm

Inicjuje peroksydację lipidów w organizmie człowieka.

ADI (mg/kg m.c.) Wartości nie przydzielono.

Nazwa substancji	Nizyna
Właściwości	Antybiotyk o charakterze polipeptydu, wytwarzany przez szczepy bakterii kwasu mlekowego; nie jest stosowana w lecznictwie; jest skuteczna tylko wobec bakterii Gram-dodatnich; przeciwdziała fermentacji masłowej w serach.
Działanie na organizm	Jest całkowicie rozkładana przez trypsynę. Jest bezpiecznym związkiem; w badaniach na zwierzętach nie stwierdzono wpływu na mikroflorę przewodu pokarmowego i działania alergicznego.
ADI (mg/kg m.c.)	0-33 tys. jednostek/kg m.c.

Nazwa substancji	Azotany (III), Azotany (V)
Właściwości	Białe lub żółtawe kryształy, dobrze rozpuszczalne w wodzie; w połączeniu z solą i cukrem stanowią składnik mieszanek peklujących. Azotany (III) zapobiegają rozwojowi bakterii beztlenowych, a w szczególności laseczek zgorzeli (<i>Clostridium perfringens</i>) oraz <i>Clostridium botulinum</i> , wytwarzającego silną toksynę – jad kiełbasiany; działanie antybakteryjne azotanów (V) jest słabe i występuje dopiero po ich redukcji do azotanów (III).
Działanie na organizm	W przewodzie pokarmowym azotany (III) mogą powodować nitrozowanie, dając <i>N</i> -nitrozozwiązki o silnym działaniu rakotwórczym; przenikają przez barierę krew-łożysko i wykazują działanie teratogenne. Azotany (III) powodują utlenianie Fe (II) hemoglobiny do formy Fe (III), tworząc methemoglobinę. Związek ten nie ma zdolności do wiązania tlenu i nie może brać udziału w procesach oddechowych organizmu (ciężka choroba – methemoglobinemia).
ADI (mg/kg m.c.)	Azotany (III): 5 Azotany (V): 0,2

12.2.1.2. Reakcje charakterystyczne

Celem ćwiczenia jest wykrycie obecności kwasu benzoowego, salicylowego i konserwantów siarkowych w przetworach owocowo-warzywnych oraz ocena informacji na etykietach wybranych produktów spożywczych pod kątem ich zgodności z obowiązującym rozporządzeniem.

12.2.1.2.1. Wykrywanie kwasu benzoowego oraz salicylowego w produktach owocowo-warzywnych

Odważyć w zlewce 5 g produktu (dżem, przecier owocowy), dodać 20 cm³ wody destylowanej, dokładnie wymieszać. Roztwór podgrzać i przesączyć. Parę kropli przesączu przenieść do probówki i dodać jedną kroplę 1% FeCl₃. Pojawienie się brudnopomarańczowego zabarwienia będzie świadczyło o obecności kwasu benzoowego, natomiast pojawienie się barwy fioletowej oznaczać będzie obecność kwasu salicylowego – substancji niedopuszczonej w Polsce do utrwalania żywności.

12.2.1.2.2. Wykrywanie obecności związków siarkowych w produktach owocowo-warzywnych

Odważyć w zlewce 10 g produktu (dżem, przecier owocowy), dodać 50 cm³ wody destylowanej. Dokładnie wymieszać. Mieszaninę przenieść do kolby stożkowej na szlif, dodać 5 cm³ 10% HCl i kolbę natychmiast zamknąć korkiem z paskiem bibuły nasyconej 10% roztworem KIO₃ i 1% roztworem skrobi. W ciągu kilku minut należy obserwować wygląd paska bibuły: niebieskie zabarwienie bibuły świadczy o obecności SO₂.

12.2.1.2.3. Oznaczanie zawartości kwasu benzoowego w sokach owocowych

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości kwasu benzoowego w napoju bezalkoholowym. Metoda polega na ekstrakcji chloroformem kwasu benzoowego zawartego w próbce, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i miareczkowaniu alkoholowego roztworu kwasu benzoowego 0,05 M roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika.

ODCZYNNIKI I MATERIAŁY:

1. 95% roztwór alkoholu etylowego;
2. krystaliczny NaCl;
3. roztwór nasycony NaCl;
4. chloroform cz.d.a.;
5. 1% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny;
6. 10% roztwór HCl;

7. 0,005 M roztwór NaOH;
8. 10% NaOH;
9. wyparka rotacyjna, biureta o pojemności 25 cm³, rozdzielacz o pojemności 250 cm³, cylindry miarowe, kolba „sercówka” o pojemności 250 cm³, kolba stożkowa o pojemności 250 cm³, kolba miarowa o pojemności 250 cm³, kolby stożkowe o pojemności 50 cm³, pipety, pipety Pasteura, lejki.

WYKONANIE OZNACZENIA:

Pobrać pipetą 25 cm³ próbki napoju i przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 cm³, dodać 30 g krystalicznego chlorku sodu i po wymieszaniu lekko zalkalizować roztwór 10% roztworem NaOH, uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku sodu, wymieszać i odstawić na 45 minut, mieszając od czasu do czasu. Następnie zawartość kolby przesączyć przez karbowany sączek do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³. 150 cm³ przesączu przenieść do rozdzielacza, zubożyć 10% roztworem kwasu solnego wobec papierka lakmusowego, a następnie dodać jeszcze 5 cm³ 10% roztworu kwasu solnego. Do zakwaszonego roztworu w rozdzielaczu dodać 30 cm³ chloroformu i wstrząsać. Klarowną, dokładnie oddzieloną warstwę chloroformową przenieść do kolby „sercówki”. Procedurę ekstrakcji wykonać jeszcze dwukrotnie, Używając każdorazowo po 30 cm³ chloroformu. Z połączonych ekstraktów chloroformowych oddestylować chloroform na wyparce rotacyjnej w temperaturze 40 °C. Suchą pozostałość rozpuścić w 15 cm³ etanolu, dodać 15 cm³ wody dejonizowanej i dobrze wymieszać. Do 3 kolbek stożkowych o pojemności 50 cm³ przenieść pipetą po 10 cm³ etanolowego roztworu kwasu benzoowego, dodać po 2 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,005 M roztworem NaOH do pojawienia się różowego zabarwienia, utrzymując go się, co najmniej 30 sekund.

Na podstawie ilości wodorotlenku sodu zużytego do miareczkowania kwasu zawartego w próbce obliczyć zawartość kwasu benzoowego w mg na 1 dm³ napoju bezalkoholowego. Za wynik końcowy oznaczenia przyjąć średnią arytmetyczną z trzech równoległych oznaczeń, jeżeli różnica między nimi nie przekracza 5%. Uzyskany wynik odnieść do norm.

12.2.2. Przeciwtleniacze w żywności

12.2.2.1. Właściwości i toksyczność

Nazwa substancji	Butylohydroksytoluen (BHT)
Właściwości	Syntetyczny przeciwutleniacz stosowany w tłuszczach i produktach tłuszczowych, aby zapobiec jętczeniu.
Działanie na organizm	Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, gromadzi się w tkance tłuszczowej. BHT spożywany w dużych ilościach może spowodować raka wątroby; obserwowano również symptomy pseudoalergiczne. U osób z dziedzicznym izomerem specyficznego enzymu wątrobowego może wywoływać migrenę. Z powodu efektów ubocznych, UE ograniczyła stosowanie BHT. Liczba produktów zawierających ten związek spadnie w ciągu najbliższych lat.
ADI (mg/kg m.c.)	0-0,5

Nazwa substancji	Butylohydroksyanizol (BHA)
Właściwości	Syntetyczny przeciwutleniacz. Zapobiega jętczeniu tłuszczów oraz utlenianiu witamin. Wpływa hamująco na działanie niektórych pleśni i bakterii. Działa synergistycznie z innymi przeciwutleniaczami, szczególnie galusanami, kwasem cytrynowym.
Działanie na organizm	Wykazuje działanie kancerogenne, ulega przekształceniu w pochodne chinonowe. Może wywierać toksyczny wpływ na nerki, wywoływać wysypkę, pokrzywkę, rzadko duszność. W wysokim stężeniu wywołuje nowotwory u zwierząt laboratoryjnych. Jednak z innych badań wynika, że może hamować działanie innych związków rakotwórczych. W wielu krajach jest niedozwolony w produktach dla dzieci.
ADI (mg/kg m.c.)	0-0,5

Nazwa substancji	Trzecziorzędowy butylohydrochinon (TBHQ)
Właściwości	Jest jednym z najbardziej skutecznych syntetycznych antyutleniaczy dla tłuszczów i olejów.
Działanie na organizm	Wykazuje działanie uboczne w postaci wymiotów oraz nudności, a w dawce powyżej 5 g działa śmiertelnie.
ADI (mg/kg m.c.)	0-0,5

Nazwa substancji Estry kwasu galusowego	
Właściwości	Są stosowane w przemyśle jako przeciwutleniacze przeciwdziałające jętczeniu tłuszczów jadalnych.
Działanie na organizm	Związki te hamują wzrost zwierząt, wywołują bezpłodność i zakłócają liczne procesy biochemiczne.
ADI (mg/kg m.c.)	0,02

12.2.2.2. Reakcje charakterystyczne

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z wykazem i zakresem stosowania przeciwutleniaczy i synergentów (związków wspomagających i przedłużających działanie przeciwutleniaczy) w żywności, podanymi w aktualnie obowiązującym Rozporządzeniu Ministra Zdrowia oraz wykrywanie i szczegółowa identyfikacja przeciwutleniaczy występujących w tłuszczach spożywczych.

12.2.2.2.1. Wstępne wykrywanie obecności środka przeciwutleniającego w tłuszczach

1 cm³ lub 1 g tłuszczu rozpuścić w probówce w 2 cm³ metanolu, ogrzać na łaźni wodnej do otrzymania jednolitego roztworu, po ostudzeniu dodawać kroplami (0,1-1 cm³) roztwór rodanku żelazowego do otrzymania trwałego czerwonego zabarwienia. Obserwować zmiany barwy.

W obecności środka przeciwutleniającego rodanek żelazowy znacznie odbarwiać się po 2-3 minutach (w przypadku galusanów powstanie niebieskoszare zabarwienie). W przypadku czystych tłuszczów i olejów już dodatek 0,1 cm³ wskaźnika powoduje powstanie czerwonej barwy, utrzymującej się przez kilka godzin.

12.2.2.2.2. Wykrywanie obecności galusanów w tłuszczach

1 cm³ lub 1 g tłuszczu rozpuścić w probówce w 2 cm³ metanolu, ogrzać na łaźni wodnej do otrzymania jednolitego roztworu, po ostudzeniu dodać 0,5-1 cm³ stężonego amoniaku, silnie wstrząsnąć. Różowe zabarwienie świadczy o obecności galusanów. Barwa znika po 10-15 minutach.

12.2.2.2.3. Wykrywanie obecności hydrochinonu w tłuszczach

Zasada metody polega na reakcji hydrochinonu (naturalny antyoksydant) z heksacyjanożelazianem (II) potasu w kwaśnym środowisku. Powstający w wyniku utleniania hydrochinonu chinon może dawać przejściowo zabarwienie żółte, natomiast w wyniku redukcji heksacyjanożelazianem (II) potasu powstaje żelazocyjanek, który z jonami Cu^{2+} daje czerwono-brunatny osad sześciocyjanożelazynu miedziowego.

1 cm^3 lub 1 g tłuszczu zmieszać w probówce z 2 cm^3 wody, dodać 3 cm^3 5% kwasu octowego, a następnie 3 krople 1% roztworu heksacyjanożelazianem (II) potasu i 0,5 cm^3 0,1 M roztworu siarczanu miedziowego. Czerwono-brunatne zabarwienie lub płatkowaty osad wskazują na obecność hydrochinonu.

12.3. Substancje toksyczne zanieczyszczające żywność

12.3.1. Nawozy sztuczne

Spośród nawozów sztucznych największe znaczenie toksykologiczne mają nawozy azotowe. Niekorzystne dla środowiska jest nagromadzenie w glebie dużej ilości azotu mineralnego, zwłaszcza azotanów (V). Na zawartość azotanów (V) w roślinach i w wodach decydujący wpływ ma poziom nawożenia azotem. Nawożenie w dawkach optymalnych nie powoduje zmian w środowisku glebowym, natomiast stosowanie dużych dawek nawozów azotowych wpływa na skażenie roślin i wód azotanami. Po zastosowaniu wysokich dawek nawozów azotowych dochodzi do nagromadzenia się nadmiernych ilości azotanów w roślinie i glebie, przy czym ta forma azotu nie pozostaje w glebie długo, lecz ulega wymyciu w głąb gleby i przenika do wód gruntowych. Nadmierne ilości azotanów w wodach pitnych oraz w pożywieniu lub w paszy mogą działać bardzo szkodliwie na zwierzęta i ludzi. Szkodliwość azotanów (NO_3^-) i powstających z ich redukcji azotynów (NO_2^-) polega na tym, że z hemoglobiny tworzy się methemoglobina, która nie jest zdolna do przenoszenia tlenu w organizmie, co może prowadzić do śmierci organizmu przez uduszenie wewnętrzne. Poza tym azotany przyczyniają się do powstania w glebie i roślinie toksycznych związków zwanych nitro-

zoaminami, które mogą wywoływać groźne choroby u ludzi i zwierząt (np. choroby nowotworowe).

12.3.2. Pestycydy

Poważnym problemem dotyczącym stosowania pestycydów, jest ujemny wpływ, mogący prowadzić do immunizacji patogenów oraz narastania szkodliwej mikroflory i entofauny, hamowania wzrostu, rozwoju i plonowania roślin, zaburzeń o charakterze następczym w metabolizmie roślin, a także systematycznego pogłębiania spadku ich żywotności. Objawy, jakie towarzyszą stosowaniu pestycydów w rolnictwie dotyczą przede wszystkim ich oddziaływania na człowieka i jego środowisko. Prowadzone są w związku z tym szeroko zakrojone badania własności toksykologicznych, ich metabolitów oraz produktów degradacji, a także skuteczności biologicznej w określonych warunkach klimatycznych. Wprowadzenie czułych metod analitycznych pozwala na śledzenie szybkości zanikania pestycydów zastosowanych w kontrolowanych warunkach doświadczeń polowych i wyznaczenie w zależności od przebiegu tego procesu odpowiednich okresów karencji dla poszczególnych upraw. Taki tryb postępowania powinien zapewnić uzyskanie surowców żywnościowych niezawierających pozostałości pestycydów lub mieszczących się w granicach tolerancji. Stąd też pozostałości pestycydów w żywności muszą być możliwie jak najniższe i dopuszczalne pod względem toksykologicznym. Do obliczania najwyższych dopuszczalnych (tolerowanych) pozostałości pestycydów w produktach spożywczych wykorzystuje się następujące czynniki:

- ADI;
- wielkość spożycia produktu lub grupy produktów.

Na podstawie danych oblicza się teoretyczną maksymalną granicę pozostałości (MGP) pestycydu w produkcie wykorzystując następujący wzór:

$$\text{MGP} = \frac{\text{ADI} \cdot \text{smc}}{\text{WS}},$$

gdzie:

ADI – dopuszczalne dzienne pobranie danego pestycydu (mg/kg masy ciała);

smc – średnia masa ciała (kg);

WS – współczynnik spożycia danego produktu lub grupy produktów (kg produktu/dzień).

12.3.2.1. Zadania

Celem zadań jest wyliczenie dopuszczalnych poziomów granicznych dla środków ochrony roślin.

Zadanie 1. Oblicz MGP dla pestycydu stosowanego w uprawie ziemniaków, na podstawie następujących danych: $WS = 400$ g/dzień; $ADI = 0,01$ mg/kg m.c./dzień; $smc = 60$ kg.

Zadanie 2. Oblicz MGP dla pestycydu stosowanego w uprawie zbóż, na podstawie następujących danych: $WS = 500$ g/dzień; $ADI = 0,5$ mg/kg m.c./dzień; $smc = 75$ kg.

Zadanie 3. Stwierdzono, że przestrzegając zasad dobrej praktyki rolniczej nie można uzyskać mniejszej pozostałości pestycydu w pewnej grupie warzyw niż:

a) 1,2 mg/kg;

b) 2,0 mg/kg.

Wskaż, który z tych poziomów jest bezpieczny toksykologicznie, uwzględniając następujące dane: $WS = 350$ g/dzień; $ADI = 0,01$ mg/kg m.c./dzień; $smc = 60$ kg.

12.3.3. Pierwiastki śladowe

Do żywności przenikają głównie z powietrza atmosferycznego, gleby i wody. Warzywa optymalnie zaopatrzone w składniki pokarmowe gromadzą mniej szkodliwych pierwiastków. Regularne wapnowanie, utrzymanie stabilnego odczynu (pH 6,5-7) oraz nawożenie organiczne, są efektywnymi i prostymi zabiegami agrotechnicznymi, ograniczającymi pobieranie tych pierwiastków. Ważną rolę odgrywa także termin uprawy i długość okresu wegetacji. Bardziej skażone są gatunki i odmiany o krótkim okresie wegetacji, zwłaszcza uprawiane wczesną wiosną. Warzywa różnią się między sobą pod względem skłonności do akumulowania tych pierwiastków w tkankach. Metale osadzające się na powierzchni liści wraz z pyłami, tylko w niewielkim stopniu przemieszczają się w głąb tkanek i są łatwe do usunięcia przez dokładne mycie. Źródłem skażenia żywności tymi pierwiastkami mogą

być także procesy technologiczne. Zanieczyszczenia mogą pochodzić także ze środków pomocniczych stosowanych przy produkcji żywności, aparatury, naczyń i opakowań. Spośród metali największe zagrożenie dla zdrowia człowieka stwarzają: kadm, ołów oraz rtęć, które posiadają zdolność do kumulacji w organizmie ludzkim i długi okres biologicznego półtrwania. Zatrucia ostre metalami ciężkimi zdarzają się bardzo rzadko, w przypadku przyjęcia ich w dużych dawkach. Pobieranie tylko tych pierwiastków prowadzi do zaburzeń przewlekłych (toksyczność chroniczna). Do podstawowych negatywnych oddziaływań metali ciężkich należą uszkodzenia w układzie pokarmowym, oddechowym, nerwowym, krążenia, krwiotwórczym i wydalniczym, a w przypadku niektórych – działanie rakotwórcze. Głównymi miejscami kumulacji są kości, mózg, gruczoł krokowy, wątroba, włosy, nerki i mięśnie.

12.3.4. Mikotoksyny

Są to metabolity mikroskopijnych grzybów, do których należą: aflatoksyny, ochratoksyny, zearalenon, trichoteceny, fumonizyny, patulina. Dopuszczalną ilość mikotoksyn w pożywieniu opisuje wskaźnik **PTDI** – tymczasowe tolerowane dzienne pobranie (*ang. Provisional Tolerable Daily Intake*).

Nazwa substancji	Aflatoksyny
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nominus</i>
Objawy toksyczności	Są przyczyną chorób – aflatoksykoz występujących zarówno u zwierząt hodowlanych, domowych jak i ludzi. Wykazują działanie kancerogenne (rak okrężnicy, żołądka, nerek, gruczołów łzowych, języka, tchawicy) i hepatotoksyczne (zmiany patologiczne wątroby). Ich działanie rakotwórcze jest związane z występowaniem wirusa HBV i HCV. Powodują zaburzenia wzrostu, działają immunotoksycznie i alergicznie.
PTDI (µg/kg m.c.)	Nie ustalono ze względu na działanie rakotwórcze.

Nazwa substancji	
Ochratoksyna	
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus</i>
Objawy toksyczności	Jest potencjalnie kancerogenna dla ludzi. Prawdopodobnie ma słabe działanie mutagenne, spowodowane przez wywoływanie uszkodzeń oksydacyjnych w strukturze DNA. Działa nefrotoksycznie, teratogennie, immunotoksycznie, neurotoksycznie. Wywołuje nowotwory dróg moczowych i tzw. endemiczną nefropatię bałkańską.
PTDI (µg/kg m.c.)	0,005

Nazwa substancji	
Patulina	
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Penicillium expansum, Aspergillus clavatus, Bassochlamys nivea</i>
Objawy toksyczności	Jest związkem bardzo reaktywnym, łączy się z białkami i kwasami nukleinowymi. Powoduje przekrwienia, krwotoki i owrzodzenia przewodu pokarmowego. Posiada właściwości kancerogenne i teratogenne.
PTDI (µg/kg m.c.)	0,4

Nazwa substancji	
Fumonizyny	
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Fusarium moniliforme, F. proliferatum</i>
Objawy toksyczności	Wzrost poziomu tych toksyn w paszach dla zwierząt objawia się np. zwiększeniem zachorowalności koni na leukodystroficzne rozmiękanie mózgu, występowaniem obrzęku płuc u świń. Stwierdzono, że mają działanie hepatotoksyczne, nefrotoksyczne oraz aktywują nowotwory wątroby u szczurów. U człowieka mogą być przyczyną raka przełyku.
PTDI (µg/kg m.c.)	2,0

Nazwa substancji	
Trichoteceny: niwalenol, toksyna T-2+HT-2	
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. equiseti</i>
Objawy toksyczności	Powoduje chorobę nazywaną toksyczną aleukemią żywieniową (objawy: plamy na skórze, martwiczka angina, zmniejszenie liczby leukocytów we krwi, rozległe krwotoki, zanik szpiku kostnego, zaburzenia żołądkowo-jelitowe).
PTDI (µg/kg m.c.)	Niwalenol: 0,7 toksyna T-2+HT-2: 0,06

Nazwa substancji	
Zealarenon	
Gatunki grzybów wytwarzających mikotoksyny	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. crookwellensei</i>
Objawy toksyczności	U zwierząt wykazuje działanie estrogenne. Powoduje bezpłodność u zwierząt żywionych paszami zawierającymi zealarenon (zaburzenia rozrodu utrudniające zapłodnienie, owulację, implantację zarodków i ich prawidłowy rozwój, osłabienie żywotności nowo narodzonych zwierząt). Jak dotąd, nie stwierdzono niekorzystnych objawów spowodowanych przez zealarenon u człowieka.
PTDI (µg/kg m.c.)	0,2

12.3.5. Nitrozaminy

Są to *N*-nitrozowe pochodne amin. Powstają one w organizmach żywych z azotanów (III) i azotanów (V) w obecności amin i amidów, a także IV-rzędowych zasad amoniowych występujących w żywności. Ich powstawaniu w przewodzie pokarmowym człowieka sprzyja pozostałość pestycydów karbaminianowych oraz niektórych leków. Nitrozoaminy tworzą się również podczas termicznej obróbki żywności (np. peklowanego mięsa) oraz samoistnie w trakcie przechowywania jedzenia. Wiele nitrozoamin wykazuje właściwości rakotwórcze (guzy w przełyku, żołądku, wątrobie, nerkach, płucach i pęcherzu moczowym). Działanie rakotwórcze dla zwierząt zostało udowodnione, natomiast ze względu na bardzo niskie typowe wchłanianie nitrozoamin

przez człowieka z żywności, rzędu 0,1-1 mg/dobę, określenie zagrożenia jest bardzo utrudnione. Ponadto nitrozoaminy mogą działać, mutagenie, teratogennie i embriotoksycznie.

12.3.6. Leki

Wiele leków jest podawanych zwierzętom w celu nie tylko leczniczym, ale również do pobudzania ich wzrostu i rozwoju. Skutkiem tego jest występowanie leków w mięsie, mleku i jajach. Spośród antybiotyków w żywności stwierdza się występowanie: penicyliny, chloramfenikolu oraz nizyny. Oprócz antybiotyków w medycynie weterynaryjnej stosuje się sulfonamidy, kokcydiostatyki, substancje przeciw pasożytnicze, co może powodować zanieczyszczenie żywności substancjami macierzystymi lub ich metabolitami. Związki te mogą powodować u ludzi alergie, a rozpowszechnienie związków przeciwbakteryjnych powoduje wzrost odporności drobnoustrojów chorobotwórczych i sprzyja wzrostowi grzybic.

12.3.7. Bezpieczeństwo żywności

Zapewnienie odpowiedniej jakości zdrowej żywności, zależnej od zawartości składników odżywczych i nieodżywczych, w tym stwarzających ryzyko dla zdrowia człowieka oraz potencjalnej obecności czynników zagrażających zdrowiu, na różnych etapach łańcucha żywnościowego, jest przedmiotem strategii bezpieczeństwa żywności opracowywanej przez:

1. Organizacje międzynarodowe:

- Komisja Kodeksu Żywnościowego (ogólnoświatowa) (Codex Alimentarius, 140 państw);
- Komitety Ekspertów FAO/WHO (Joint Expert Committee on Food Additives);
- Joint Meeting on Pesticide Residues.

2. Organizacje europejskie:

- Komisja Unii Europejskiej oraz Dyrekcja Generalna ds. Zdrowia i Ochrony Konsumentów (DG SANCO);

- Komitet Naukowy ds. Żywienia Zwierząt;
- Komitet Naukowy ds. Zdrowia i Dobrostanu Zwierząt;
- Komitet Naukowy ds. Produktów Kosmetycznych i Produktów Nieżywnościowych Przeznaczonych dla Konsumentów;
- Komitet Naukowy ds. Produktów Leczniczych i Wyrobów Medycznych;
- Komitet Naukowy ds. Toksyczności, Ekotoksyczności oraz Środowiska;
- Komitet Naukowy ds. Roślin;
- Komitet Naukowy ds. Żywności;
- Komitet Naukowy ds. Środków Weterynaryjnych Dotyczących Zdrowia Publicznego;
- Europejski Urząd Bezpieczeństwa Żywnościowego (EFSA) utworzony w 2002 roku na mocy Rozporządzenia 178/2002/WE, którego zadaniem jest zapewnianie niezależnego doradztwa naukowego oraz wsparcia naukowo-technicznego w zakresie prawodawstwa i polityki Wspólnoty we wszystkich dziedzinach, które wywierają bezpośredni lub pośredni wpływ na bezpieczeństwo żywności i pasz. Urząd zbiera i analizuje dane, które umożliwiają przygotowanie charakterystyk i monitorowanie zagrożeń, wywierających bezpośredni lub pośredni wpływ na bezpieczeństwo żywności i pasz. Funkcjonowanie EFSA ma zapewnić rzetelną informację w sprawach istniejących i pojawiających się zagrożeń bezpieczeństwa żywności, przyczynić się do wysokiego poziomu ochrony zdrowia i życia ludzkiego, zdrowia zwierząt i odpowiednich warunków ich hodowli, zdrowia roślin i ochrony środowiska naturalnego w kontekście funkcjonowania rynku wewnętrznego.

3. Organizacje krajowe prowadzące urzędową kontrolę żywności:

- Państwowa Inspekcja Sanitarna;
- Państwowa Inspekcja Weterynaryjna;
- Państwowa Inspekcja Handlowa;
- Inspekcja Jakości Handlowej Produktów Rolno-Spożywczych;
- Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa we współdziałaniu z Ministerstwami: Zdrowia, Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Finansów oraz Urzędem Ochrony Konkurencji i Konsumentów.

- Adomas B., Murawa D., *Ćwiczenia z toksykologii środowiska*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn 2009.
- Alloway B.J., Ayres D.C., *Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- Biziuk M. (pod red.), *Pestycydy. Występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- Brzozowska A. (pod red.), *Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004.
- Dojlido J. (pod red.), *Fizykochemiczne badanie wody i ścieków*. Wydawnictwo Arkady, Warszawa 1999.
- Dojlido J., Zerbe J., *Instrumentalne metody badania wody i ścieków*. Wydawnictwo Arkady, Warszawa 1997.
- Dutkiewicz T. (pod red.), *Ćwiczenia z toksykologii*. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Łodzi, Łódź 1969.
- Gadzała-Kopciuch R., Buszewski B. (pod 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. (pod 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, Poznań 1995.

- Klaassen C. D., Watkins III J. B., Casarett&Doull, *Podstawy toksykologii*. MedPharm Polska, Wrocław 2014.
- Kołodziejczyk A., *Naturalne związki organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Krechniak J. (pod red.), *Materiały do ćwiczeń z toksykologii*. Wydawnictwo Akademii Medycznej w Gdańsku, Gdańsk 1996.
- Laskowski R., Migula P., *Ekotoksykologia od komórki do ekosystemu*. Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2004.
- Manahan S. E., *Toksykologia środowiska. Aspekty chemiczne i biochemiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Ruth P., Schaefer-Korting M., *Farmakologia i toksykologia Mutschlera*. MedPharm Polska, Wrocław 2010.
- OECD, Guidance Document On Acute Oral Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24, 2000.
- Piotrowski J. K. (pod red.), *Podstawy toksykologii. Kompendium dla studentów szkół wyższych*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (wraz ze zmianami).
- 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 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 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (Dz. U. z 2002 r. nr 165, poz. 1359).
- 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).
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pa-

- kowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006. Dz. Urz. UE L 351 z 31.12.2008 r., str. 1355).
- Seńczuk W. (pod red.), *Toksykologia współczesna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2012.
- Siemiński M., *Środowiskowe zagrożenia zdrowia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- Statham B., *E213: Tabele dodatków i składników chemicznych*. Wydawnictwo RM, Warszawa 2006.
- Stetkiewicz J., *Toksyczność ostra – nowe testy alternatywne*. Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi. http://old.imp.lodz.pl/vitryna/vitryna03/2.%203R_%20Toksycznosc%20ostra.htm
- Timbrell J., *Paradoks trucizn*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.
- 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.
- Wytyczne dotyczące oznakowania i pakowania na podstawie rozporządzenia (WE) nr 1272/2008. Europejska Agencja Chemikaliów, 2011.
- Zakrzewski S. F., *Podstawy toksykologii środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.