

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**УО «ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»**

*Кафедра физиологии и
биохимии животных*

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО
ВЕТЕРИНАРНОЙ ТОКСИКОЛОГИИ**

(для студентов факультета ветеринарной медицины)

Гродно 2005

ТЕМА: Химико-токсикологический анализ.**ПРАВИЛА ОТБОРА, УПАКОВКИ И ПЕРЕСЫЛКИ ПРОБ БИОМАТЕРИАЛА И КОРМОВ В ЛАБОРАТОРИЮ.**

1. При подозрении на отравление животных в лабораторию направляют материал от трупов павших животных для химического и гистологического исследований. Одновременно с целью определения источника отравления посылают все корма (по 1 кг каждого вида корма), которые скармливали животному.

Кроме этого, обязательно посылают остатки кормов из кормушки.

2. Для химического исследования в лабораторию посылают в отдельных банках или полиэтиленовых пакетах следующий материал:

а) часть пищевода, пораженную часть желудка и содержимое (в количестве 0,5 кг), а от крупного и мелкого рогатого скота - часть пищевода, сычуга и небольшое количество содержимого из разных мест сычуга и рубца.

Желудок и его содержимое берут в следующем порядке. При вскрытии трупа после осмотра внутренних органов перевязывают лигатурами пищевод и двенадцатиперстную кишку вблизи стенки желудка (в двух местах по две перевязки) и перерезают между перевязками. Желудок извлекают и кладут в чистую посуду (от крупных животных на чистое место), затем вскрывают его по передней стенке. Содержимое желудка предварительно (не выбирая из желудка) перемешивают, после чего осторожно, чтобы не загрязнить, берут часть его. Для перемешивания нельзя использовать металлический инструментарий;

б) отрезок тонкого отдела кишечника (длиной до 0,5 м) из наиболее пораженной части вместе с содержимым (до 0,5 кг);

в) отрезок толстого отдела кишечника (длиной до 0,4 м) из наиболее пораженной части вместе с содержимым (до 0,5 кг);

г) часть печени (0,5 -1 кг) с желчным пузырем (от крупных животных, а от мелких животных печень целиком);

д) одну почку;

е) мочу в количестве 0,5 л;

ж) скелетную мускулатуру в количестве 0,5 кг.

Кроме этого, в зависимости от особенностей предполагаемого отравления дополнительно посылают: при подозрении на отравление через кожу (путем инъекции) - часть кожи, подкожной клетчатки и мышцы из места предполагаемого введения яда; при подозрении на отравление газами (синильной кислотой, сероуглеродом и т.д.) - наиболее полнокровную часть легкого (в количестве 0,5 кг), трахею, часть сердца, 200 мл крови, часть селезенки и головного мозга.

Трупы мелких животных отправляют целиком.

От эксгумированного трупа животного берут сохранившиеся внутренние органы в количестве до 1 кг, скелетную мускулатуру до 1 кг, а также землю из под трупа - 0,5 кг из 2-3 мест.

3. Для гистологического исследования посылают небольшие кусочки, размером 1х3х5 см, следующих органов: печени, почек (обязательно с наличием коркового и мозгового слоев), сердца, легкого, селезенки, языка, пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, скелетной мускулатуры, лимфоузлов, головного мозга.

Кусочки должны быть взяты из различных участков органов на границе пораженной и не пораженной части ткани и тотчас же помещены в 10% р-р формалина из расчета 1 часть патологического материала и 15 частей формалина.

От больных животных при подозрении на отравление посылают: рвотные массы (желательно первые порции), мочу - все количество, которое удалось получить, кал - в количестве 0,5 кг, содержимое желудка полученное через пищеводный зонд, корма и вещества, которые могли явиться причиной отравления.

При подозрении на фитотоксикозы берут для ботанического анализа пробы растений в следующем порядке: деревянную рамку с внутренним размером в 1 м² накладывают на травостой луга или пастбища и все оказавшиеся внутри рамки растения срезают под корень. Если травостой однотипный, пробу с 1 га, луга или пастбища берут в 3-5 местах, а если травостой разнотипный, количество проб увеличивают с целью большого охвата различных растений и посылают среднюю пробу.

Если пробу трав, взятых для исследования, можно доставить в лабораторию в течение нескольких часов, то траву посылают в сыром виде, при длительной пересылке - сушат и доставляют пробы в сухом виде. Пересылают пробы трав в коробках или плетеных корзинах.

Материал, взятый для химического исследования, нельзя обмывать и держать вместе с металлическими предметами, его отправляют в не консервированном виде. Консервировать материал животного происхождения можно только в том случае, если он будет доставлен в лабораторию не ранее чем через 3-4 дня после взятия. Консервировать такой материал можно только спиртом-ректификатом в соотношении 1:2 (1 часть спирта и 2 части материала). Одновременно посылают и пробу спирта (не менее 50 мл), которым законсервирован материал. Применять другие консервирующие вещества нельзя, так как они сами являются ядами (хлороформ) или разрушают некоторые яды (формалин).

Упаковывают материал в чистые, широкогорлые стеклянные банки, плотно закрывающиеся или в новые полиэтиленовые пакеты.

Поверх пробки банку обертывают чистой бумагой, обвязывают прочным шпагатом, к которому крепят этикетку. Концы шпагата припечатывают сургучной печатью. Пакеты также этикетируют и опечатывают.

На этикетке указывают, какие органы и в каком количестве (по массе) помещены в банку или пакет, вид животного, дату падежа и вскрытия трупа.

Отобранный материал должен был» отправлен в лабораторию немедленно с нарочным.

ОБРАЗЕЦ СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ

В Витебскую областную ветеринарную лабораторию, химико-токсикологический отдел.

Адрес: г. Витебск, ул. Свердловская 15.

При этом направляются для токсикологического анализа–патологический материал (перечислить какой) в полиэтиленовых пакетах:

№1 – часть печени с желчным пузырем (вес брутто-0,5 кг);

№2 – часть тонкого отдела кишечника с содержимым (вес брутто-0,9 кг);

№3 – одна почка (вес брутто-0,5 кг);

№4 – остатки корма из кормушки (вес брутто-1 кг);

От трупа бычка, в возрасте 12 месяцев, принадлежащего колхозу

(вид, возраст животного)

«МИР», отделение

«Заполье»

(название хозяйства, фермы, отделения, фамилия владельца животного)

Дата заболевания 22.10.03
года

Дата падежа 24.10.03
года

Клиническая картина прилагается на двух страницах машинописи

Данные патологоанатомического вскрытия прилагается протокол вскрытия 1
стр.

Предположительный диагноз отравление неоцидолом

Дата отправки материала 24.10.03 года

Заключение просим выслать по адресу: Витебский район, д. Заполье

Главный ветврач колхоза «МИР»

Сидоров И.И.
(должность)

(подпись)

ТЕМА: Отравление животных растениями содержащих алкалоиды

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ В РАСТЕНИЯХ

В колбу помещают 1 г сухих измельченных растений, добавляют 10 мл 1%-ного раствора уксусной или виннокаменной кислоты. Смесь в колбе ставят в кипящую водяную баню на 20-25 минут или нагревают до кипения и кипятят течение 15 минут и фильтруют через вату. На три часовых или предметных стекла наносят 1-2 капли полученного фильтрата и прибавляют к ним на первом стекле 1-2 капли 5%-ного раствора танина, на втором - реактива Бушарда, на третьем стекле (для контроля) - дистиллированную воду. При наличии алкалоидов в исследуемом фильтрате выпадают осадки, при отсутствии - жидкость остается прозрачной.

Р е а к т и в ы:

- а) 1 %-ный раствор уксусной или виннокаменной кислоты;
- б) 5%-ный раствор танина;
- в) реактив Бушарда, состоящий из 1,3 г кристаллического йода, 2 г калия йодида в 100 мл дистиллированной воды. Перед реакцией этот реактив разводят 1:10.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ В СЕМЕНАХ ЛЮПИНА

Исследуемые семена превращают в муку, заливают водой и оставляют на несколько минут. Затем каплю испытуемого раствора наносят на висмутовую индикаторную бумагу. При наличии алкалоидов образуется розовое пятно; при небольшом количестве алкалоидов - розовое кольцо.

Чувствительность метода - не менее 0,03% алкалоидов в люпине.

Индикаторная висмутовая бумага готовится следующим образом: полоски фильтровальной бумаги шириной 6-8 см и длиной 10 см пропитывают следующим реактивом.

П р и г о т о в л е н и е р е а к т и в а:

- 1) 0,42 г висмута ацетата растворяют в 25 мл дистиллированной воды (или висмута нитрата растворяют в 25 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты);
- 2) 1 г калия йодида растворяют в 25 мл дистиллированной воды;
- 3) 75 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты. Все три раствора смешивают (после полного их растворения) и этой смесью пропитывают фильтровальную бумагу. Подсушивают и хранят ее в темном месте.

ДЕМОНСТРАЦИОННОЕ ОТРАВЛЕНИЕ МОРСКОЙ СВИНКИ АТРОПИНА СУЛЬФАТОМ С ПОСЛЕДУЮЩИМ АНАЛИЗОМ КЛИНИЧЕСКИХ СИМПТОМОВ ОТРАВЛЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЕМ (введение янтидота)

Морскую свинку фиксируют в спинном положении. Готовят инъекционное поле. Кожу животного захватывают в складку в области брюшной стенки тремя пальцами и прокалывают иглой шприца. Вводят подкожно 1 %-ный раствор атропина сульфата в количестве 15 мл на животное (300 мг/кг).

Через 1-2 минуты наблюдают острое отравление морской свинки, которое проявляется возбуждением, сильной реакцией на раздражители, усилением дыхания, тремором, расширением зрачка. Через 5 минут наступает торможение с последующим угнетением, развитием судорог и параличами (отсутствие реакции на внешние раздражители).

После этого морской свинке вводят подкожно 10 мл 0,5%-ного раствора прозерина - в область живота с противоположной стороны.

Через 2-3 минуты у свинки нормализуется дыхание, снижается угнетение, мышечный тонус приходит в норму.

Студенты наблюдают за опытом, производят записи в тетрадях и делают выводы:

атропиноподобные алкалоиды обладают М-холинолитическим действием, что способствует возбуждению ЦНС и холинэргической иннервации. В качестве антидотных средств применяют антихолинэстеразные вещества, в частности функциональным антидотом является прозерин, который ослабляет холинолитическое действие атропина.

ТЕМА: Отравление животных растениями, содержащими циангликозиды, тиогликозиды, сапонингликозиды

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНИЛЬНОЙ КИСЛОТЫ В ОТВАРЕ СЕМЕНИ ЛЬНА (проба с пикриновой бумагой).

В колбу помещают 10 - 15 мл отвара семени льна или содержимого желудка, доводят дистиллированной водой до кашицеобразной консистенции и туда же добавляют 2-3 мл 10%-ного раствора виннокаменной кислоты. Колбу немедленно закрывают пробкой или часовым стеклом, зажимая между стенками реактивную бумагу и ставят в термостат на 1-2 часа. При наличии в исследуемом содержимом синильной кислоты реактивная бумага окрашивается в оранжево-красный цвет различных оттенков.

Р е а к т и в ы:

- а) 1%-ный раствор пикриновой кислоты;
- б) 5-10%-ный раствор виннокаменной кислоты;
- г) 5%-ный раствор натрия гидроокиси;
- д) реактивная пикриновая бумага, которая готовится следующим образом: полоски фильтровальной бумаги шириной 1 см и длиной 4-5 см пропитывают 1%-ным водным раствором пикриновой кислоты, высушивают, после чего пропитывают 5%-ным раствором натрия гидрокарбоната и снова высушивают (бумага имеет лимонно-желтую окраску); хранят ее в сухом месте.

ТЕМА: Кормовые токсикозы

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЛАНИНА В КАРТОФЕЛЕ

С клубня картофеля сделать несколько срезов толщиной около миллиметра:

- а) от верхушки до основания по оси, делящей клубень на две равные половины;
- б) поперечные - у основания и верхушки клубня;
- в) с боков клубня;
- г) с участков вокруг глазков.

Положить срезы в фарфоровую чашку или на часовое стекло и последовательно по каплям нанести уксусную кислоту (80-90%), концентрированную серную кислоту (плотность 1,84) и несколько капель 5%-ного раствора перекиси водорода.

При наличии соланина в местах среза появляется интенсивное темно-малиновое или красное окрашивание.

Р е а к т и в ы:

- а) 80-90%-ный раствор уксусной кислоты ;
- б) серная кислота (плотность 1,84);
- в) 5%-ный раствор перекиси водорода.

МИКРОХИМИЧЕСКИЙ (СЕРНОКИСЛОТНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ГОССИПОЛА В ХЛОПЧАТНИКОВОМ ЖМЫХЕ

Метод основан на способности госсипола под действием серной кислоты окрашиваться в ало-красный цвет. Для исследования берут небольшие кусочки жмыха (около 200 г) из разных мест нескольких плиток и измельчают в ступке в мелкий порошок. Из равномерно перемешанной массы жмыхового порошка отвешивают навеску 20 мг и помещают на стекло. Все комочки измельчают, а шелуху семян отбрасывают. Навеску жмыха равными частями распределяют на 20-30 предметных стеклах, смачивают 1-2 каплями концентрированной серной кислоты, перемешивают и накрывают покровным стеклом.

Приготовленный препарат рассматривают под микроскопом при малом увеличении. В каждом препарате подсчитывают круглые или овальные черные железки, из которых вытекает красная жидкость или вокруг которых видна ярко-красная окраска, а также круглые ярко- красные пятна с едва заметными остатками оболочек клеток.

Подсчитывают количество окрашенных в красный цвет точек во всех препаратах (20-30), после этого процент госсипола в жмыхе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A}{20} * 0,085, \text{ где}$$

X-содержание госсипола в жмыхе;

A- количество подсчитанных алых пятен на предметных стеклах;

20 - навеска жмыха (в мг);

0,085 - постоянный коэффициент госсипола.

Р е а к т и в: концентрированная серная кислота.

ТЕМА: Отравление животных нитратами и нитритами

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРАТОВ

Для освобождения исследуемого материала от нитритов полученную вытяжку подкисляют серной кислотой и прибавляют щепотку мочевины, через 10-12 часов нитриты в исследуемом материале полностью разрушаются.

В фарфоровую чашечку или часовое стекло наливают 10-15 капель концентрированной серной кислоты и опускают небольшой кристаллик дифениламина и растирают его стеклянной палочкой или смешивают встряхиванием, после чего прибавляют 1-2 капли приготовленной исследуемой вытяжки. При наличии нитратов жидкость окрашивается в синий или темно-синий цвет. Чувствительность метода - 0,005 г нитратов в 1 литре вытяжки.

Р е а к т и в ы: концентрированная серная кислота, дифениламин.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТОВ

К 1 мл исследуемой вытяжки прибавляют 1 мл раствора реактива Грисса, который готовят перед постановкой реакции (1 г сухого реактива Грисса растворяют в 10 мл дистиллированной воды). При наличии в вытяжке нитритов жидкость окрасится в розовый цвет различных оттенков. Чувствительность реакции - 0,01 мг нитритов в 1 литре вытяжки.

Приготовление р е а к т и в а Грисса:

- а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты;
- б) 0,1 г альфанафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты.

Оба раствора хранят в склянках из темного стекла на холоде в течение 2 месяцев. Перед употреблением оба раствора смешивают в равных объемах.

ДЕМОНСТРАЦИОННОЕ ОТРАВЛЕНИЕ МОРСКОЙ СВИНКИ НАТРИЯ НИТРИТОМ

Под руководством преподавателя студенты производят затравку морской свинки натрия нитритом. Производят анализ клинических симптомов отравления. Результаты исследований записывают в тетради.

Морской свинке массой 500 г вводят внутрь через зонд 2,5 мл 1% раствора натрия нитрита. Следят за развитием токсикоза.

ТЕМА: Отравление животных натрия хлоридом

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЯ ХЛОРИДА В КОМБИКОРМАХ (ПО МЕТОДУ ФОЛЬГАРДА)

Навеску комбикорма 2 г помещают в колбу емкостью 200 мл, наливают 20 мл 10%-ного раствора азотной кислоты, встряхивают и приливают 100-120

мл дистиллированной воды, взбалтывают в течение 5 минут, после чего снова доливают дистиллированной воды до метки и перемешивают. Раствору дают отстояться не менее 1 минуты, затем пипеткой отбирают 5 мл раствора, выливают в коническую колбу емкостью 250 мл. К раствору приливают 2 мл насыщенного раствора железоммонийных квасцов и из бюретки добавляют 5 или 10 мл титрованного 0,05н раствора серебра нитрата. Избыток серебра нитрата оттитровывают 0,05н раствором аммония роданида до слабо-оранжевого цвета, не исчезающего в течение 10-15 секунд.

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{(A \cdot T - C \cdot T) \cdot 0,002922 \cdot 100 \cdot V}{B \cdot H}$$

где:

X - процентное содержание натрия хлорида в комбикорме;

A - количество 0,05н серебра нитрата в мл, введенного в исследуемый раствор;

T1 - поправка к титру для 0,05н раствора серебра нитрата;

C - количество 0,05н раствора аммония роданида в мл, израсходованное на титрование 0,05н раствора серебра нитрата;

T2 - поправка к титру для 0,05н раствора аммония роданида;

0,002922 - количество натрия хлорида в граммах, эквивалентное 1 мл 0,05н раствора серебра нитрата;

V - объем жидкости в мерной колбе, в мл;

B - количество раствора (вытяжки) в мл, взятое для титрования;

H - навеска корма, в граммах.

За результат принимается среднее арифметическое двух параллельных определений.

Р е а к т и в ы:

а) 0,05н раствор серебра нитрата;

б) 0,05н раствор аммония роданида;

в) 10%-ный раствор азотной кислоты;

г) насыщенный раствор железоммонийных квасцов (готовят следующим образом: берут 500г измельченных квасцов, растворяют в 1000 мл кипящей дистиллированной воды. Раствор охлаждают. Выкристаллизованные квасцы отделяют фильтрованием. К полученному раствору при помешивании приливают небольшими порциями концентрированную азотную кислоту (около 40 мл, пока раствор больше не просветляется).

ТЕМА: Отравление животных соединениями фтора и бария

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФТОРА В БИОМАТЕРИАЛЕ

Берут 100 г исследуемого мелко измельченного патматериала (содержимое желудка или часть пораженной слизистой желудка, часть кишечника, кусочки печени или корма), помещают в фарфоровую чашку, подщелачивают 10%-ным раствором натрия гидроокиси до щелочной реакции по лакмусу, подсушивают на водяной бане до сухого состояния и сжигают в муфельной печи до золы серо-белого цвета (обычно в течение 2-3 часов).

Полученную золу делят на 4 части. Одну часть золы помещают на фильтровальную бумагу в воронке и промывают горячей дистиллированной водой (примерно 1 л). Полученный фильтрат испаряют до 100 мл и подкисляют 10%-ным раствором уксусной кислоты, после чего прибавляют такое же количество 50%-ного раствора кальция хлорида и оставляют стоять 12 часов-

При взаимодействии входящих препаратов раствор мутнеет. Его фильтруют через бумажный складчатый фильтр и высушивают осадок вместе с фильтровальной бумагой. После чего фильтрат измельчают и помещают в фарфоровый тигелек, куда прибавляют 2-3 мл концентрированной серной кислоты, быстро закрывают стеклом, предварительно покрытым парафином с нанесенной надписью и оставляют на сутки. В результате взаимодействия фтора с серной кислотой образуется фтористоводородная (плавиковая) кислота, которая "травит" незащищенные парафином участки стекла.

Через сутки стекло снимают и очищают от парафина горячей водой, а затем спирт-эфиром. Если на стекле осталась "вытравленная надпись", то в исследуемом материале имеется фтор. Чувствительность метода - 0,003 г/кг.

Р е а к т и в ы:

- а) 10%-ный раствор натрия гидроокиси;
- б) 10%-ный раствор уксусной кислоты;
- в) 50%-ный раствор кальция хлорида;
- г) концентрированная серная кислота, спирт, эфир.

ЗАТРАВКА МОРСКОЙ СВИНКИ НАТРИЯ ФТОРИДОМ

Морской свинке массой 500г подкожно в области боковой стенки живота вводят 5 мл 1%-ного раствора натрия фторида. Следят за развитием клинической картины отравления.

ТЕМА: Отравление животных соединениями тяжелых металлов (ртути, свинца, цинка)

МЕТОДЫ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ПАТМАТЕРИАЛА

Минерализация патматериаласерной кислотой и пергидролем.

Берут 25 -50г измельченного патматериала, помещают в колбу Къельдаля объемом 500 мл, заливают 12,5-25 мл пергидроля, 1-2 минуты перемешивают и осторожно прибавляют 10-20 мл концентрированной серной кислоты при постоянном перемешивании. Содержимое колбы разогревается, и может наступить бурная реакция. Когда реакция прекратится, колбу осторожно

нагревают, периодически прибавляют пергидроль по 1-2 мл до тех пор, пока жидкость не делается прозрачной, слегка желтоватой и дальнейшее ее нагревание до появления белых паров серного ангидрида не будет вызывать потемнения жидкости. В процессе сжигания иногда требуется прибавить 4-5 мл концентрированной серной кислоты. Для полного сжигания 25-50г патматериала обычно требуется 1,5-2 часа.

Преподаватель знакомит студентов с другими кислотными методами минерализации и сухим методом озоления биоматериала.

Обнаружение цинка.

1-2 мл минерализата разбавляют 1:1 дистиллированной водой, берут 2-3 капли и нейтрализуют концентрированным раствором аммиака (по лакмусу). Одну каплю нейтрализованного раствора наносят на полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной раствором тиомочевины и высушенной, держат 1 минуту над горлом склянки с концентрированным раствором аммиака, высушивают на воздухе и опрыскивают из пульверизатора раствором дитизона в бензоле (5 мг дитизона растворяют в 10 мл бензола, раствор годен 1 день). При наличии цинка на бумаге появляется пятно розового или красно-малинового цвета. Параллельно проводят контрольный опыт с дистиллированной водой и продельывают все операции основного опыта (пятно на бумаге не должно окрашиваться в розовый или красно-малиновый цвет).

Обнаружение ртути.

На беззольную фильтровальную бумагу наносят каплю взвеси меди йодида, выдерживают 2-3 минуты и наносят на это место каплю минерализата. В присутствии ртути появляется красное или красно-оранжевое окрашивание. Чувствительность реакции - 0,25 мкг ртути в одной капле.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

1. Фильтровальная бумага, пропитанная раствором тиомочевины. Полоски фильтровальной бумаги размером 5 x 30 см пропитывают 4%-ным раствором тиомочевины и сушат на воздухе. Такие полоски бумаги хранят в плотно закрытой банке. Срок хранения 3 месяца.

2. Взвесь меди йодида. 5,3г калия йодида растворяют в 10-15 мл дистиллированной воды и к полученному раствору прибавляют 40 мл 10%-ного раствора меди сульфата. Образуется осадок, который отфильтровывают и промывают дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод. Фильтр с осадком прокалывают иглой, смывают осадок дистиллированной водой в колбу и доводят объем до 50 мл. Взвесь меди йодида пригодна для работы в течение 6 месяцев.

ТЕМА: Отравление животных соединениями меди, молибдена, кадмия и таллия.

ОБНАРУЖЕНИЕ МЕДИ.

2-3 капли минерализата нейтрализуют концентрированным раствором аммиака, каплю нейтрализованного раствора наносят на полоску фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной раствором натрия-силикофлюорида и высушенной, держат над горлом склянки с концентрированным раствором аммиака, подсушивают и опрыскивают из пульверизатора раствором рубеановодородной кислоты. В присутствии меди пятно окрашивается в темно-зеленый цвет.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА РУБЕАНОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЫ

0,1 г рубеановодородной кислоты растворяют в 10 мл этилового спирта. Раствор годен для работы в течение 5 дней.

ТЕМА: Отравление животных соединениями мышьяка, селена, серы и сурьмы

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЫШЬЯКА В ПАТМАТЕРИАЛЕ ПО СПОСОБУ РЕЙНША

Метод основан на способности катиона мышьяка осаждаться в кислой среде на медной пластинке и образовывать меди арсенат.

В колбу объемом 100 мл помещают 20 -25г исследуемого материала (корм, содержимое желудка и др.), добавляют 50 мл 18%-ного раствора хлористоводородной кислоты и тщательно смешивают. Туда же помещают 2-3 свежеччищенные медные пластинки. Колбу нагревают в течение 60 минут на водяной бане.

При содержании мышьяка в исследуемом материале медные пластинки покрываются серым налетом, который иногда простым глазом бывает незаметен. Пластинки извлекают из колбы, промывают водой, спиртом и высушивают фильтровальной бумагой, затем помещают на дно узкой стеклянной пробирки (запаянная пастеровская пипетка) и нагревают на спиртовке. Выше нагреваемого места на расстоянии 2-3 см от дна пробирки производят охлаждение ее жгутом ваты, смоченной водой. При наличии в исследуемом материале мышьяка на холодных частях пробирки появится белый налет в виде кольца.

При микроскопическом исследовании видно, что этот налет состоит из блестящих кристаллов в форме октаэдров (4-8 гранные формы с алмазным блеском), характерных для мышьяка.

Чувствительность метода - 0,05 мкг мышьяковистого ангидрида в 20г патматериала.

Р е а к т и в ы:

18%-ный раствор хлористоводородной кислоты, дистиллированная вода, спирт этиловый.

ТЕМА: Отравление животных фосфорорганическими пестицидами

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЗАТРАВКА МОРСКОЙ СВИНКИ

Морской свинке подкожно вводят водный раствор хлорофоса (0,5) Следят за развивающейся клинической картиной отравления. Затем подкожно вводят 0,2-0,5 мл 1%-ного раствора атропина сульфата.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОП В ВОДЕ

Гидроперекисная реакция (реакция Шанемана) основана на способности ФОП увеличивать скорость окисления бензидина и других окислительно-восстановительных индикаторов. Механизм этой реакции сводится к тому, что при действии перекиси водорода на ФОП образуется гидроперекись этого соединения, а в щелочной среде (что обеспечивается наличием натрия цитрата) происходит окисление бензидина, что проявляется появлением желто-оранжевого окрашивания.

В пробирку к 5 мл исследуемой воды добавляют 0,5 мл 0,2%-ного водно-спиртового раствора бензидина гидрохлорида и 0,5 мл 2%-ного раствора перекиси водорода и после тщательного перемешивания вносят 1 мл 10%-ного раствора натрия цитрата. Пробирку помещают в водяную баню при температуре 75-80° на 5 минут. Окрашивание содержимого пробирки в желтоватый или желтовато-оранжевый цвет указывает на присутствие ФОП.

Одновременно проводят контрольное определение.

Чувствительность реакции - 10-100 мг в 1 литре.

Р е а к т и в ы:

- а) 0,2%-ный водно-спиртовой раствор бензидина гидрохлоридв;
- б) 2%-ный раствор перекиси водорода;
- в) 10%-ный раствор натрия цитрата;
- г) активированный уголь;
- д) толуол;

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОП В КОРМАХ

В колбу помещают 10 г измельченного корма, добавляют 15 мл этилового спирта, плотно закрывают пробкой и энергично перемешивают в течение 25 минут. Полученную массу фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом. Для обесцвечивания фильтрат в количестве 5мл помещают в пробирку и добавляют в него 1г порошка активированного угля, смешивают и нагревают на водяной бане в течение 2-5 минут, периодически помешивая. Горячую взвесь фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом.

Обесцвеченный фильтрат в количестве 3 мл наливают в чистую пробирку и прибавляют 2 мл дистиллированной воды, а затем добавляют те же реактивы и в таком же количестве, что и при определении ФОП в воде, все тщательно перемешивают и нагревают в течение 5 минут на водяной бане при температуре 75-80°С. При наличии ФОП раствор окрашивается в желто-оранжевый цвет.

Во всех случаях, как при определении ФОП в воде, так и в кормах, когда окраска бывает слабо выраженной, к содержимому пробирки добавляют 0,5 мл

толуола и тщательно перемешивают. При наличии ФОП отстоявшийся слой толуола приобретает желтоватый или желтовато-оранжевый цвет.

Чувствительность реакции -10-100 мг в 1 кг.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОП МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ В ТОНКОМ СЛОЕ

Метод основан на извлечении ФОС из органов и тканей хлороформом. очистке экстрактов путем перераспределения пестицидов в воде, а затем - в **хлороформе**. Концентрированные экстракты хроматографируют в тонком слое силикагеля КСХ В качестве подвижной фазы используют Н-гексан - ацетон в соотношении 1:1. Проявление ФОС проводят смесью резорцина с карбонатом натрия и последующей обработкой раствором щелочи.

Пестициды проявляются в виде малиновых пятен на белом фоне пластинки. Количественное определение препаратов проводят путем визуального сравнения интенсивности окраски и размера пятен проб с пятнами стандартных растворов ФОС.

Чувствительность метода - 0,5 мг/кг, точность определения 88-95% при содержании пестицидов в пробе от 10 до 20 мкг.

Растворы и реактивы: хлороформ х.ч., ацетон х.ч., Н-гексан, натрия или калия гидроокись, силикагель марки КС К, натрия сульфат безводный, гипс, хлорофос, ДДВФ-60%, резорцин, натрия карбонат, 90% спирт.

Проявители:

- а) 2%-ный водный раствор резорцина и 10%-ный раствор натрия карбоната. Растворы смешивают перед опрыскиванием в соотношении 2:3;
- б) 5%-ный раствор натрия или калия гидроокиси.

Приготовление пластинок с тонким слоем сорбента.

Стеклянные пластинки размером 9х 12 см моют хромовой смесью, затем водопроводной и дистиллированной водой и сушат. Сухие пластинки протирают спиртом или эфиром. Для приготовления сорбционной массы в фарфоровую ступку вносят 35г силикагеля, просеянного через сито с отверстиями 0,04 мм, 2г гипса и содержимое тщательно перемешивают, приливают 50 мл дистиллированной воды, растирают. Приготовленную массу в количестве 10г (2 чайные ложки) наносят на пластинку, равномерно распределяют по поверхности. Пластинки сушат в течение 16-20 часов при комнатной температуре в горизонтальном положении. Готовые пластинки хранят в эксикаторе.

Ход определения.

Исследуемую пробу патматериала весом 20г измельчают ножницами, помещают в коническую колбу, заливают 40 мл хлороформа на ночь. Экстракт отделяют фильтрованием через бумагу в фарфоровую выпарительную чашку и концентрируют выпариванием досуха на водяной бане при температуре не выше 40. Для извлечения хлорофоса и ДДВФ из сухого остатка экстрагирование проводят дистиллированной водой трижды порциями по 5мл, тщательно растирая остаток стеклянной палочкой. Экстракты собирают через бумажный фильтр и делительную воронку, объединяют и для извлечения

пестицидов из водного раствора проводят экстрагирование хлороформом дважды порциями по 15 мл, встряхивая в течение минуты. Хлороформные экстракты сливают в фарфоровую выпарительную чашку через бумажный фильтр, заполненный безводным натрия сульфатом, предварительно промытым хлороформом. Экстракты объединяют и выпаривают досуха без нагрева в вытяжном шкафу.

Сухой остаток растворяют в 0,2 мл хлороформа, который с помощью шприца наносят на пластинку со слоем сорбента. Эту процедуру выполняют трижды.

Для идентификации пестицидов и их количественного определения на ту же пластинку на расстоянии 1,5-2 см друг от друга наносят стандартные растворы хлорофоса и ДДВФ, содержащие от 5 до 20 мкг действующего вещества и помещают в хроматографическую камеру под углом 45 градусов с подвижной системой растворителей: гексан-ацетон в соотношении 1:1. Камеру предварительно выдерживают в закрытом состоянии с подвижной фазой в течение часа. После подъема фронта подвижной фазы на 10 см от линии старта, пластинку вынимают и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до испарения растворителей.

Для проявления хроматограмм, пластинку опрыскивают из пульверизатора до насыщения слоя сорбента смесью 2%-ного раствора резорцина и 10%-ного раствора натрия карбоната в соотношении 2:3, соответственно и помещают в сушильный шкаф на 5-8 минут при температуре 100°C.

На белом фоне пластинки хлорофос и ДДВФ проявляется в виде слабозаметных пятен малинового цвета. После охлаждения пластинку опрыскивают до насыщения 5%-ным раствором натрия или калия гидроокиси и опять помещают в сушильный шкаф. Через 2-3 минуты интенсивность окраски ДДВФ усиливается.

Количественное определение пестицидов проводят путем визуального сравнения интенсивности малиновой окраски пятен пробы и их величины с пятнами стандартных растворов.

Содержание пестицидов в мг/кг (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A}{B}$$

A - количество пестицида, найденное в пробе путем сравнения со стандартом, мкг;

B - вес исследуемой пробы, г.

ТЕМА: Отравление животных хлорорганическими соединениями

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДДТ В ПАТМАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С 0-ТОЛИДИНОМ

Приготовление пластинок для хроматографии.

Стеклянные пластинки тщательно моют хромовой смесью, высушивают и покрывают сорбционной массой: 1г о-толидина растворяют в 50 мл этилового спирта и фильтруют в банку с притертой пробкой. Затем 10 г селикагеля марки КСК хорошо перемешивают в ступке с 2г гипса или окиси алюминия, переносят в банку с раствором о-толидина, встряхивают в течение 5 минут, наносят 10г на пластинку и равномерно распределяют по поверхности. Пластинки сушат на воздухе в течение 1,5 часа и при необходимости хранят в эксикаторе.

Подготовка хроматографических колонок.

На нижнюю часть хроматографической колонки помещают небольшой тампон гигроскопической ваты (предварительно промытой в нормальном гексане и высушенной), затем засыпают в нее селикагель марки КСК и промывают 30-40 мл гексана.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

Для исследования берут пробы печени, почек, мозга, сердца, мышц или зернофуража. Исследуемую пробу в количестве 5г измельчают и экстрагируют дважды по 40 минут н-гексаном порциями по 15-20 мл при встряхивании.

Оба экстракта пропускают через колонку, заполненную селикагелем марки КСК, затем ее промывают 110 мл элюирующей смеси бензола и петролейного эфира в объемном отношении 30:80. Экстракт и элюирующую смесь пропускают через колонку небольшими порциями (около 20мл). После очистки растворитель испаряют в вакуумном ротационном испарителе при температуре 50° или на воздухе без нагревания,

Сухой остаток смывают 2 мл н-гексана, испаряют на воздухе, снова смывают дважды н-гексаном (по 0,2 мл) и при помощи шприца или микропипеткой наносят пробу на пластинку на расстоянии 1,5-2 см от края. Слева и справа от пробы наносят стандартные растворы, содержащие близкие к определяемому количеству пестициды. Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру для хроматографирования, в которую за полчаса до анализа наливают н-гексан. Пластинку погружают в растворитель не более 0,5 см. После того, как фронт поднимется на 10 см пластинку вынимают и несколько минут подсушивают на воздухе, затем выдерживают в УФ-свете 5-10 минут. В случае наличия в пробах ДДТ и гамма-изомера ГХЦГ на слабо-желтом фоне появляется сине-зеленые пятна, характерные для хлорированных пестицидов.

При данных условиях в слое селикагеля технический препарат ДДТ обнаруживается в виде одного пятна, в котором суммируется 4,4 и 2,4 -изомер ДДТ. Методика дает возможность определить как сам препарат ДДТ, так и его метаболиты 4,4 - ДДЭ и 4,4 - ДДТ. Значения ДДЭ - 0,6 ; ДДТ - 0,25-0,27. Чувствительность определения - 0,5 мкг.

Количественную оценку производят по формуле:

$$X = \frac{A}{B} \quad \text{или} \quad X = \frac{A1 \cdot C1}{C2 \cdot B}$$

X - содержание препарата в пробе, в мг/кг или мг/л;

A - количество препарата, найденное путем визуального сравнения со стандартным раствором, в мкг;

B - навеска исследуемой пробы, в г или мл;

A 1- содержание препарата в стандартном растворе, в мкг;

C 1 - площадь пятна стандартного раствора, мм²;

C2 - площадь пятна пробы, мм².

Площадь пятен проб и стандартных растворов измеряют на миллиметровой бумаге и при сравнении учитывают окраску их пятен. Метод можно использовать в ветеринарных и агрохимических лабораториях для оценки качества кормов, продуктов питания растительного и животного происхождения, для диагностики отравлений животных.

ТЕМА: Отравление животных карбаматами

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕТРАМЕТИЛТИУРАМДИСУЛЬФИДА (ТМТД) В КОРМАХ

Принцип метода основан на:

- а) отделении от экстракта красящих растительных пигментов под воздействием водного раствора щелочи;
- б) последующем извлечении препарата н-гексаном;
- в) взаимодействии извлеченного препарата пестицида с реактивным силикагелем, импрегнированным меди сульфатом, в результате чего последний, вследствие образования меди тиурамата, окрашивается в зеленый цвет.

Р е а к т и в ы:

- а) 0,5% -ный раствор натрия гидроокиси;
- б) н-гексан;
- в) силикагель марки КСМ;
- г) хлористоводородная кислота;
- д) 1%-ный раствор меди сульфата;
- е) фильтровальная бумага;
- ж) азотная кислота.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВНОГО СИЛИКАГЛЯ.

Силикагель марки КСМ заливают на 18-20 часов хлористоводородной кислотой, разбавленной 1:1, затем кислоту сливают, силикагель промывают дистиллированной водой и кипятят в течение 2-3 часов разбавленной 1:1 азотной кислотой. Дают силикагелю отстояться, сливают азотную кислоту и промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод и сушат в сушильном шкафу при температуре 130° в течение 4-6 часов. После этого силикагель измельчают, просеивают через сито с отверстиями 0,2 мм, а затем через сито с отверстиями 0,04 мм. Просеянный силикагель заливают на 1 час 1%-ным раствором меди сульфата. Жидкость сливают, силикагель

подсушивают на фильтровальной бумаге, а затем в сушильном шкафу при температуре 100°. Хранят силикагель в плотно закрытых склянках.

Ход определения.

10 г исследуемого растительного материала заливают 10-20 мл 0,5%-ного раствора натрия гидроксида (зерно – 10 мл; сено, комбикорм – 20мл), периодически встряхивают в течение 15 минут. Затем добавляют 10 мл н-гексана и встряхивают в течение 30 минут. При исследовании гороха и комбикорма не следует встряхивать, так как образуется стойкая эмульсия.

После того, как слои хорошо разделяются, экстракт гексана декантируют (отделяют), фильтруют через двойной бумажный фильтр и к фильтрату прибавляют 0,2 г реактивного силикагеля и встряхивают в течение 30-60 секунд. В присутствии ТМТД силикагель окрашивается в зеленый (нежно-салатовый) цвет.

Чувствительность метода: 150 мкг в пробе или 15 мг на 1 кг исследуемого корма, что составляет 1 /66 минимальной нормы протравливания – 2 кг на одну т 50% ТМТД. Данная методика дает возможность эффективно контролировать остатки ТМТД в кормах и других объектах растительного происхождения, в том числе дающих значительную окраску экстрактов (зеленое сено, горох, овес, комбикорм и т.д.).

ТЕМА:Отравление животных карбамидом и зооцидами

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЗАТРАВКА МОРСКОЙ СВИНКИ ЦИНКА
ФОСФИДОМ**

Студент фиксирует морскую свинку в руках, удерживая ее головой вверх и прижимая спину животного к столу. Другой студент набирает в шприц 5мл 0,2% взвеси цинка фосфида на крахмальном клейстере и вводит в желудок через желудочный зонд. После чего животное помещают в стеклянный виварий. Через 10 минут у животного отмечают признаки отравления.

ТЕМА: Микотоксикозы

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОЛОВНЕВЫХ ГОЛОВНЕВЫХ ГРИБОВ В ЗЕРНЕ.

На аналитических весах взвешивают 10 г зерна, освобожденного от мешочков головни и посторонних примесей, осторожно перетирают его между листками фильтровальной бумаги. Споры головни остаются на бумаге, окрашивая ее в серый цвет. Очищенное зерно взвешивают вновь и по разности между первым и вторым взвешиванием зерна находят вес распыленной головни.

Допустимое количество головни в зерне – не более 0,06%

**МЕТОДИКА КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СПОРЫШЬИ В РАЗМОЛОТОМ КОРМЕ (СПОСОБ ЗИНИНА)**

В стеклянный цилиндр всыпают 4 г исследуемого корма, приливают 12-13 мл 90% этилового спирта, взбалтывают 5-6 минут, затем добавляют 10-15 капель 20%-ного раствора серной кислоты, после чего оставляют стоять на 5 минут. При наличии спорыньи вытяжка окрашивается в розовый цвет, а при добавлении к ней насыщенного раствора натрия гидрокарбоната розовый цвет переходит в фиолетовый .

Допустимое содержание спорыньи в корм ах- не более 0,1%.