

Лекция № 1.

Группа веществ, изолируемых из биологического материала минерализацией.

Экология окружающей среды и распространенность отравлений соединениями тяжелых металлов и мышьяком. Методы выделения соединений тяжелых металлов.

Несмотря на широкое распространение d-элементов в природе (в рудах, почве, воде и воздухе), их содержание в тканях и органах человека в норме не превышает $10^{-2}\%$ массы тела.

С точки зрения токсического воздействия металлов на организм наибольшую опасность представляет постоянно возрастающее антропогенное загрязнение окружающей среды.

Органические и неорганические соединения металлов широко применяются в промышленности (тяжелая и цветная металлургия), сельском хозяйстве (пестициды) и медицине (компоненты лекарственных средств и биологически активные добавки).

В организме человека в настоящее время обнаружен 81 элемент Периодической системы элементов Д.И. Менделеева.

Элементы-органогены (C, H, O, N, P, S), основные компоненты тканей организма, по массе составляют 97,4%. Их содержание в организме, как и содержание ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Cl^- , превышает 10^{-2} %. Это макроэлементы.

Содержание микроэлементов в различных органах и тканях организма колеблется на уровне 10^{-5} - 10^{-20} %. Если содержание элемента в организме ниже 10^{-5} %, он относится к ультрамикроэлементам.

К необходимым (эссенциальным, незаменимым)

микроэлементам относятся металлы d-блока Периодической системы элементов: медь, цинк, железо, кобальт, молибден, марганец. Эти биогенные элементы называют жизненно необходимыми микроэлементами, которые присутствуют в организме человека в постоянных концентрациях (химический гомеостаз), снижение их содержания изменяет элементный профиль в целом и приводит к появлению характерных симптомов недостаточности.

Некоторые металлы (V, Ni, Cr) присутствуют в организме в микро- или ультрамикроколичествах, но их биологическая роль до конца не выяснена, поэтому их называют условно необходимыми

Элементы с неизвестной биологической ролью, но постоянно присутствующие в организме, называются примесными. Их уровень может колебаться в пределах нескольких порядков. Для этих элементов достоверно установлена токсичность.

Неорганические соединения различных элементов имеют широкий спектр биологической активности. И дефицит, и избыток жизненно необходимого элемента наносят вред организму



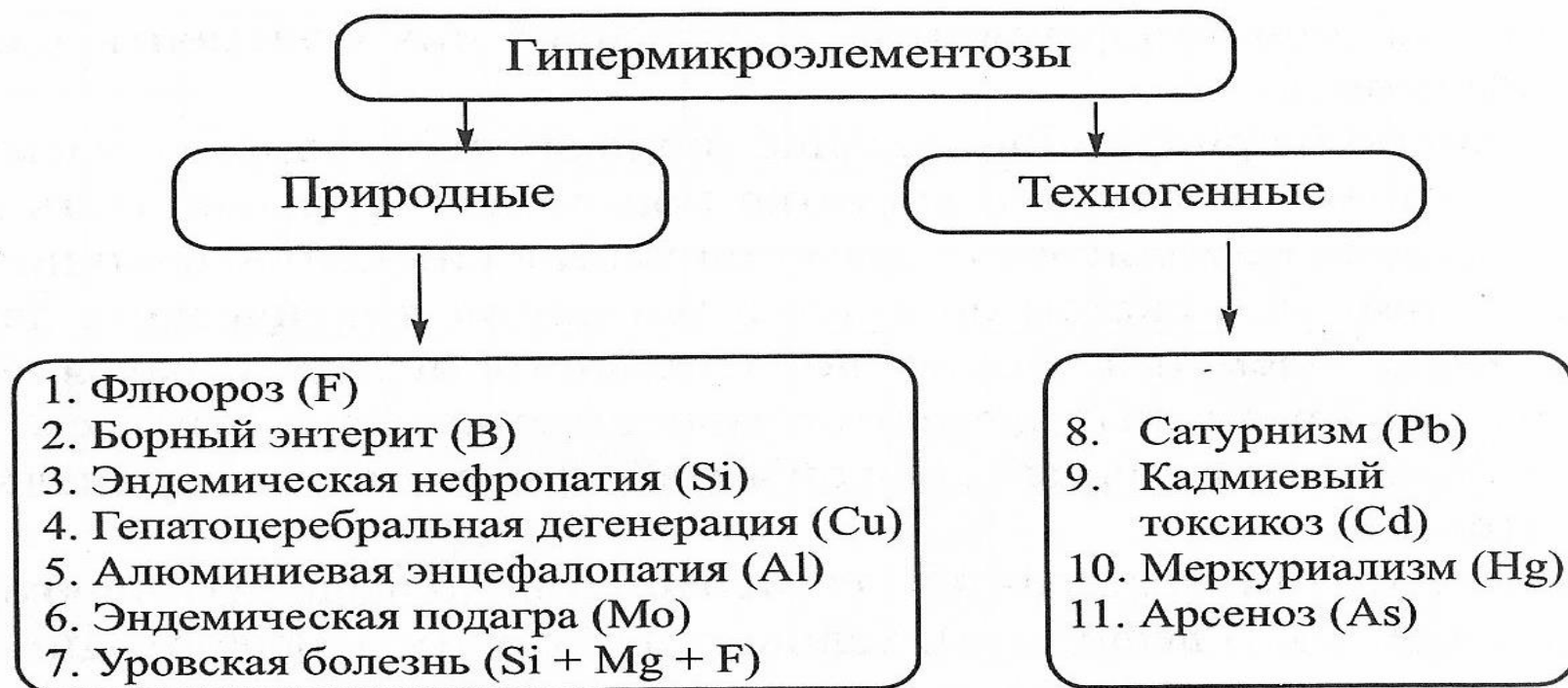
Зависимость доза – ответ.

а – для необходимых элементов; б – для примесных (токсичных) элементов.

При дефиците необходимого элемента организму наносится существенный ущерб, например, из-за снижения активности ферментов, содержащих микроэлементы в качестве кофакторов.

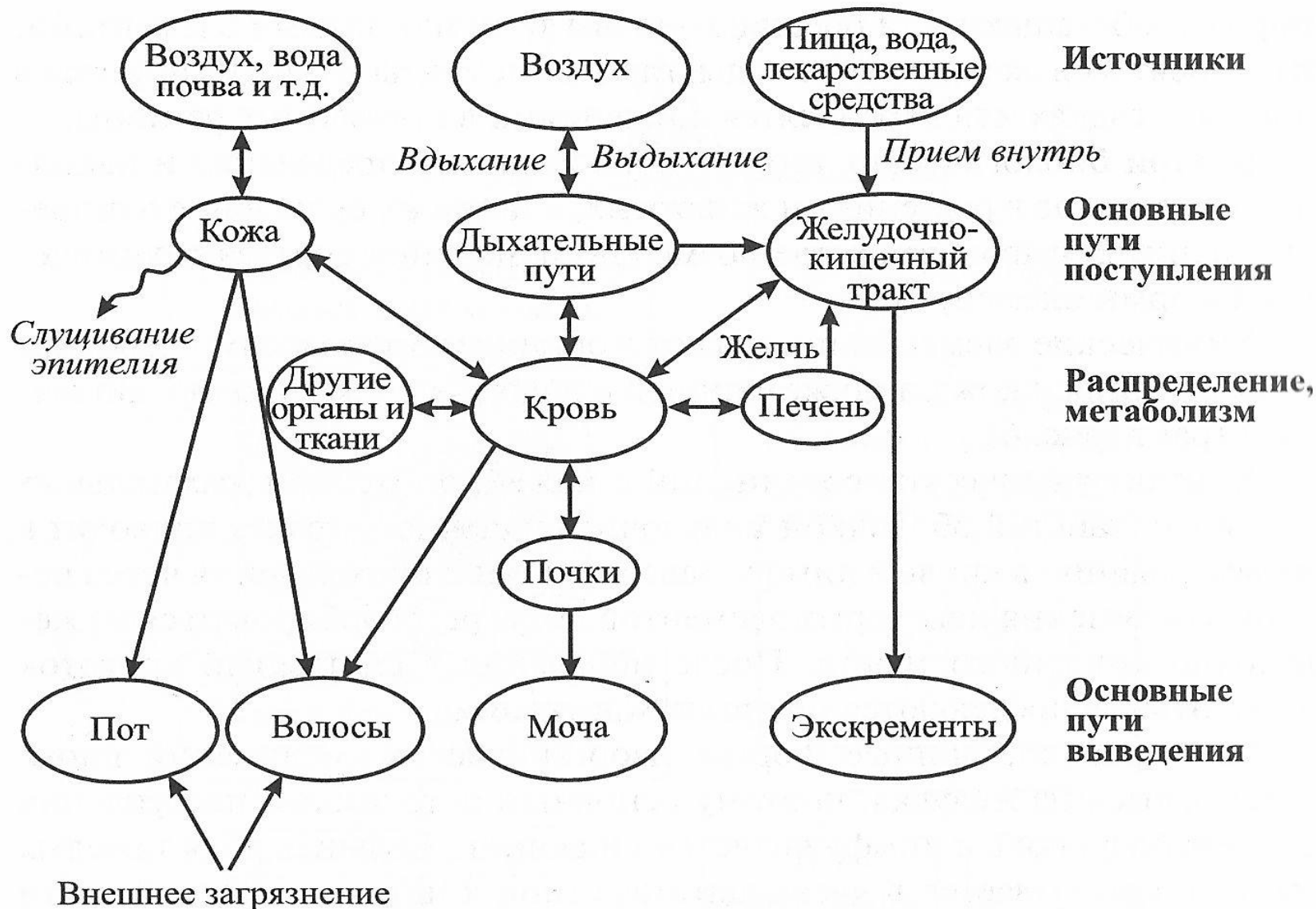
При повышении дозы необходимого элемента ответ организма возрастает, достигая нормы (центральная часть кривой). Дальнейшее увеличение дозы приводит к снижению функционирования органов и систем организма вследствие токсического действия избытка элемента вплоть до летального исхода (правая ветвь кривой).

Накопление металлов в организме может быть вызвано природными факторами (эндемические провинции) или техногенными загрязнениями



При этом возникают заболевания, называемые гипермикроэлементозами, обусловленные избыточным содержанием в организме того или иного элемента.

Поступление металлических ядов в организм, их распределение, метаболизм и выведение



Механизмы токсичности металлов

на молекулярном уровне:

- ингибирование ферментов,
- необратимые конформационные изменения макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) и как следствие изменение скорости биосинтеза, биотрансформации, а также возникновение мутаций.

Действие неорганических ядов на молекулярном уровне вызывает изменения на клеточном уровне:

- дефицит жизненно важных метаболитов
- нарушении структуры и проницаемости клеточных мембран.

Нарушение нормальной жизнедеятельности клеток обуславливает дисфункцию органов:

- появление новообразований
- признаки отравления неорганическими веществами (замедление роста, смещение физиологических параметров, ослабление репродуктивной функции и увеличение смертности потомства)

Механизмы токсичности ионов металлов в биосредах во многом определяются их:

- химической формой (степень окисления)
- способностью комплексообразованию

Виды взаимодействия металла с белком

- Белок как мишень для токсического воздействия тяжелых металлов (взаимодействие с ферментами.)
- Токсичные металлы могут замещать необходимые элементы в качестве кофакторов ферментов.
- Конкурирующие реакции с участием ионов токсичных элементов (свинец препятствует кальций зависимому высвобождению нейромедиаторов).
- Белки-защитники, снижают токсичность металла. (Низкомолекулярные *металлотионеины* имеют высокое сродство к жизненно необходимым и токсичным металлам)
- Специфические белки, связывающие металлы и участвующие во внеклеточном и внутриклеточном транспорте металлов (трансферрин, ферритин, церулоплазмин).

Связывание «металлических ядов» биологическим материалом

- с белками
- с аминокислотами
- с пептидами
- рядом других жизненно важных веществ (птеридины (в том числе фолиевая кислота), пурины, рибофлавин, нуклеиновые кислоты и др).

Прочность образовавшихся при этом соединений (комплексов) зависит от природы металлов, наличия соответствующих функциональных групп в молекулах веществ ($-SH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$), связывающихся с металлами, природы связи в образовавшихся соединениях или комплексах и т. д.

В большинстве случаев ионы металлов образуют прочные ковалентные связи и внутрикомплексные соединения.

Типы отравлений «металлическими ядами»

- 1) острые и хронические,
- 2) бытовые, производственные – случайные
- 3) суицидальные – преднамеренные.

Степени отравлений «металлическими ядами»

- лёгкая степень: быстро стихающие диспепсические расстройства, ожог слизистой полости рта и глотки.
- средняя степень: желудочные кровотечения, гемолиз, анемия, поражения почек.
- тяжёлая степень: поражение ЦНС, почечно-печёночная недостаточность, желудочно-кишечные расстройства и кровотечения, причина смерти - экзотоксический шок.

Объекты исследования:

- Кровь
- желудок, кишечник, печень, почки
- органы депонирования «металлических ядов» - головной мозг, костная ткань, волосы и т.д.

Минерализация - окисление
органического вещества,
составляющего объект исследования
для освобождения искомым
неорганических соединений из их
комплексов с белками

Виды минерализации:

- 1. Сухая минерализация:
 - 1а) метод сухого озоления
 - 1б) метод сплавления
- 2. Мокрая минерализация (метод мокрого озоления)

1.Метод сухого озоления

основан на нагревании органических веществ до высокой температуры при доступе воздуха. Сухое озоление производят в фарфоровых, кварцевых или платиновых тиглях. При разрушении органических веществ с помощью этого метода на исследование берут относительно небольшие навески (1 - 10 г) исследуемых объектов (пищевые продукты, биологический материал и др.) и нагревают их в тигле до 300-400 °С. Увеличение навесок исследуемых объектов является нежелательным, так как это значительно увеличивает время озоления.

Метод применяется тогда, когда имеется специальное задание исследовать объекты биологического происхождения на наличие марганца, меди и некоторых других металлов.



1.2. Метод сплавления органических веществ с нитратами щелочных металлов.

Биологический материал или другие органические вещества нагревают с расплавленными нитратами щелочных металлов. С повышением температуры окислительные свойства нитратов усиливаются.

Метод применяется при специальных заданиях исследовать соответствующие объекты (пилюли, органические соединения, содержащие металлы, остатки после выпаривания мочи, волосы, ногти и др.) на наличие мышьяка, серебра и некоторых других металлов.

Достоинства сухой минерализации:

1. Относительно небольшая навеска объекта
2. Направленное исследование

Недостатки метода сухой минерализации:

1. Улетучивание некоторых металлов и их соединений в процессе нагревания (Hg, Tl);
2. Взаимодействие отдельных металлов с материалом тиглей;
3. Невозможность контролировать температуру в тиглях.

Для минерализации органических веществ методом мокрого озоления применяют кислоты-окислители (азотную, серную и хлорную кислоты), хлорат калия и пергидроль.

При помощи этих окислителей происходит разрушение биологического материала с образованием более простых химических соединений. Применяемые окислители разрушают связи между металлами и белками, пептидами, аминокислотами и некоторыми другими соединениями. При минерализации биологического материала, содержащего металлы, связанные в организме со многими жизненно важными органическими соединениями, образуются соли этих металлов, которые можно обнаружить в минерализатах при помощи соответствующих реакций и методов.

Достоинства минерализации концентрированными кислотами:

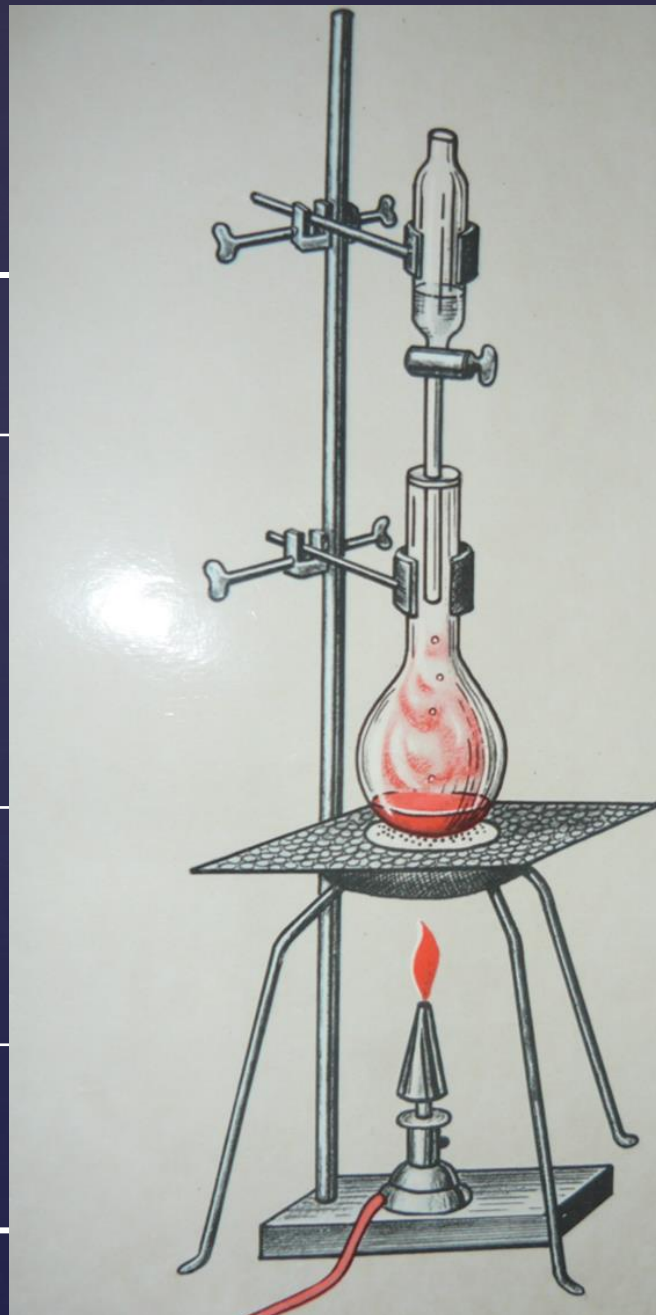
- 1) быстрая разрушения органических веществ;
- 2) высокая чувствительность;

Недостатки:

- 1) значительные потери Hg,
- 2) использование концентрированных растворов.

Этапы выделения «металлических ядов» из биообъектов общим методом

1	Подготовка объекта (100 г)
2	Деструкция: окислители: $\text{HNO}_3(\text{к})$, $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{к})$, капельно - $\text{HNO}_3(\text{к})$, нагревание до 40 минут
3	Глубокое окисление: нагревание от 4 до 8 часов.
4	Денитрация



Денитрация - процесс освобождения, минерализатов от азотной, азотистой, нитрозилсерной кислот и оксидов азота.

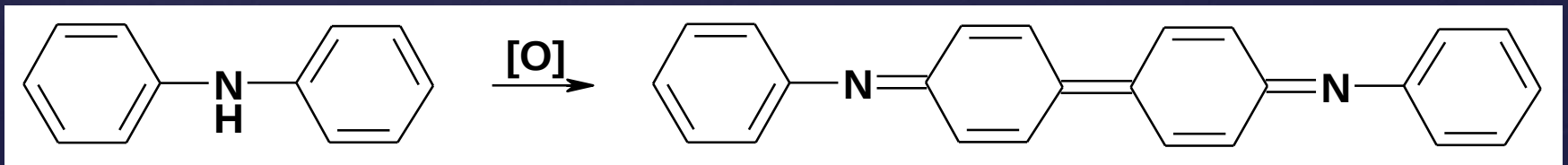
Окислители, мешают проведению ХТА, что требует их удаления из минерализата.

Денитрацию проводят с помощью:

- Формальдегида
- Мочевины
- Сульфита натрия

Протекает гидролиз нитрозилсерной кислоты и восстановление азотистой кислоты до легко удаляемых окиси азота NO и газообразного азота.

Проверку полноты денитрации проводят реакцией с раствором дифениламина



Метод денитрации минерализатов формальдегидом.

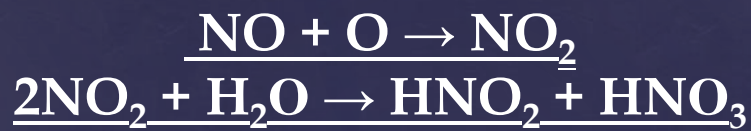
При взаимодействии формальдегида с азотной кислотой, выделяется азот:



В результате взаимодействия азотистой кислоты с формальдегидом выделяются азот, оксид азота (II), оксид углерода (IV) и вода:



Оксид азота (II) окисляется кислородом воздуха до оксида азота (IV), который при взаимодействии с водой дает азотную и азотистую кислоты:



Образовавшиеся при этом азотная и азотистая кислоты реагируют с формальдегидом. Нитрозилсерная кислота при нагревании с водой разлагается. Образовавшаяся при этом азотистая кислота реагирует с формальдегидом.

Для денитрации минерализатов к ним прибавляют 10-15 мл воды. В эту жидкость, нагретую до 110-130 °С, осторожно по каплям прибавляют формалин (40 %-й раствор формальдегида). При этом наблюдается обильное выделение пузырьков газа (N_2 и NO), иногда имеющего оранжево-бурую окраску (NO_2). Процесс денитрации минерализатов формалином заканчивается за 1-2 мин. Избыток формальдегида, не вступившего в реакцию с азотной и азотистой кислотами, удаляют нагреванием жидкости в течение 5-10 мин.

На озоление приходится большая часть ошибок анализа.

Наилучших результатов достигают при минерализации в закрытой системе СВЧ-печей под воздействием микроволнового излучения с помощью специальных герметических тefлоновых и стальных камер-бомб в присутствии реагента окислителя - азотной кислоты, где содержатся биологические пробы.



Спасибо за внимание!