

«Металлические» яды. Химико-токсикологический анализ и характеристика группы веществ, изолируемых минерализацией. Подготовка образцов. Методы изолирования. Техника минерализации. Денитрация минерализата.

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЯДОВ**

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, включая биоту. 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).

1. Макро- и микроэлементы.

В организме человека в настоящее время обнаружен 81 элемент Периодической системы элементов Д.И. Менделеева (рис. 1).

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 металлами жизни, или жизненно необходимыми микроэлементами.

Жизненно необходимые элементы 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*. Например, установлено, что хром (III) как компонент фактора толерантности к глюкозе [координационные соединения Cr (III) с никотиновой, изоникотиновой кислотами, никотинамидом и некоторыми аминокислотами] влияет на метаболизм углеводов. Однако для хрома, как и для других условно необходимых металлов (никель, ванадий), не удалось воспроизвести симптомы недостаточности в эксперименте с дефицитной диетой.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IA	IIA	IIIB	IVB	VB	VIB	VII B	VIIIB	VIIIB	VIIIB	IB	IIB	IIIA	IVA	VA	VIA	VIIA	
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga*	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Hf	Nb	Mo	Tc*	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In*	Sn	Sb	Te	I*	Xe
Cs	Ba	La	Zr	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	

 — жизненно необходимые макроэлементы, входящие в состав лекарственных средств;
 — жизненно необходимые микроэлементы, входящие в состав лекарственных средств;
 — входящие в состав лекарственных средств, необходимость которых не доказана.

Рисунок 1. Элементы Периодической системы элементов Д.И.Менделеева, обнаруженные в организме человека и /или используемые в качестве лекарственных средств.

Элементы с неизвестной биологической ролью, но постоянно присутствующие в организме, называются *примесными*. Уровень примесных элементов может колебаться в пределах нескольких порядков. Для этих элементов, как правило, достоверно установлена токсичность.

Деление элементов на необходимые и примесные в определенной мере условно. Это объясняется прежде всего тем, что неорганические соединения различных элементов имеют широкий спектр биологической активности. И дефицит, и избыток жизненно необходимого элемента наносят вред организму (рис. 2).

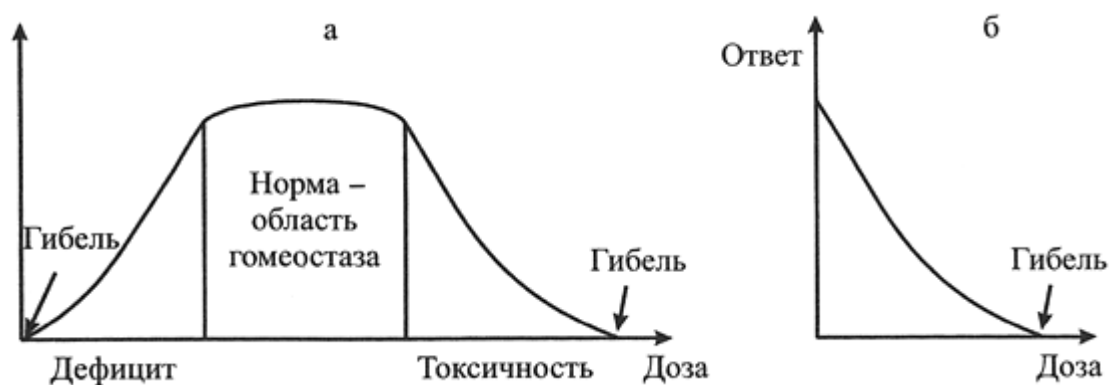


Рисунок 2. Зависимость доза – ответ.

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). Для примесных элементов зависимость доза - ответ (см. рис. 2) имеет вид, аналогичный правой ветви кривой для эссенциальных элементов.

Таким образом, среди d- и p-элементов можно выделить необходимые (по данным о дефиците), условно необходимые (необходимость окончательно не доказана), примесные (достоверно известны только токсические свойства) микроэлементы.

В первой половине XX в. акад. В.И. Вернадский указал на эссенциальное участие *всех элементов* в жизнедеятельности клетки. С каждым последующим десятилетием группа эссенциальных элементов все больше расширяется за счет элементов, которые раньше считали только токсичными. Это объясняется совершенствованием методов анализа, позволяющих достичь все более низких пределов обнаружения элементов в биологических материалах.

Оценка нормы содержания элементов, необходимость которых пока не доказана, возможна при определении примесных элементов в организме сельских жителей, меньше подвергающихся антропогенным влияниям окружающей среды. Полученные результаты используют как нормативные и сравнивают с ними токсическую нагрузку на организм в промышленных

регионах. Например, были обнаружены близкие уровни свинца, бария, кадмия, стронция, мышьяка в костной ткани (эпифиз бедренной кости) жителей разного возраста и обоего пола, проживающих в одном из регионов Подмосковья.

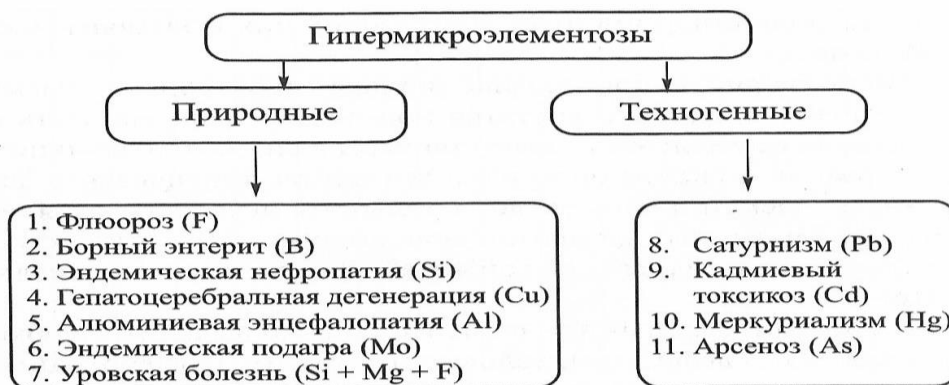


Рисунок 3. Примеры гипермикроэлементозов.

У жителей промышленных регионов с возрастом увеличивается содержание некоторых примесных элементов, особенно у рабочих крупных металлургических и гальванических предприятий. Например, содержание кадмия, бария, свинца и стронция в образцах костной ткани более чем у 3000 человек, проживавших в разных районах Российской Федерации, различалось в сотни раз. Наименьшие колебания и самый низкий уровень этих элементов отмечены у жителей сельской местности.

Накопление металлов в организме может быть вызвано природными факторами (эндемические провинции) или техногенными загрязнениями (рис. 3).

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

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

В окружающей среде металлы распределяются естественным образом в соответствии с биогеохимическими циклами (рис. 4).

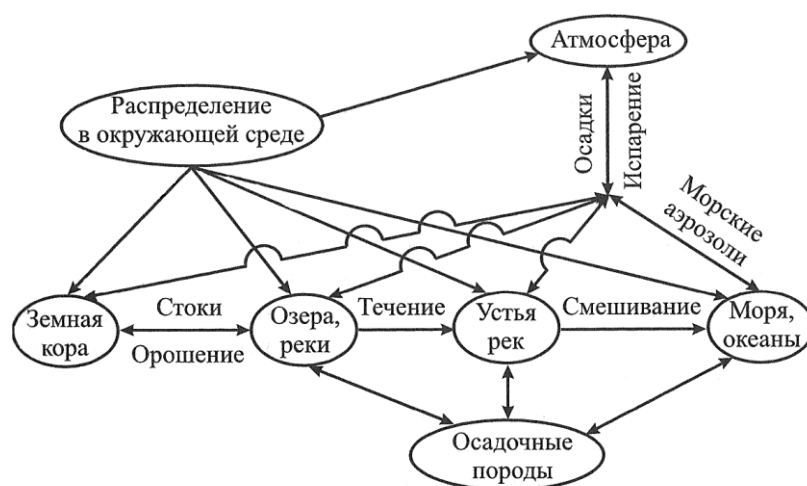


Рисунок 4. Распределение металлов в окружающей среде

Применение металлов в промышленности и быту обуславливает их появление в воздухе, воде, почве, организме животных и растениях. Дожди разрушают горные породы, обогащают или обедняют почвы теми или иными элементами, переносят их в океанические воды, где эти элементы концентрируются в донных осадках или переносятся с течениями в отдаленные регионы.

Внутри биологических циклов происходят распределение и накопление металлов в растениях и животных, а также их включение в пищевые цепи. В живом веществе возможно изменение состава и химической формы элементов.

Химические элементы поступают в организм с аэрозолями через органы дыхания и кожу, а также с пищей и водой через желудочно-кишечный тракт (рис. 5). Контакт химических соединений с кожей, эпителием дыхательных путей и слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта приводит к их всасыванию в кровь и лимфу. Завершив цикл прохождения через печень, соединения некоторых элементов могут реабсорбироваться из желудочно-кишечного тракта. После попадания в системный кровоток элементы распределяются по органам и тканям.

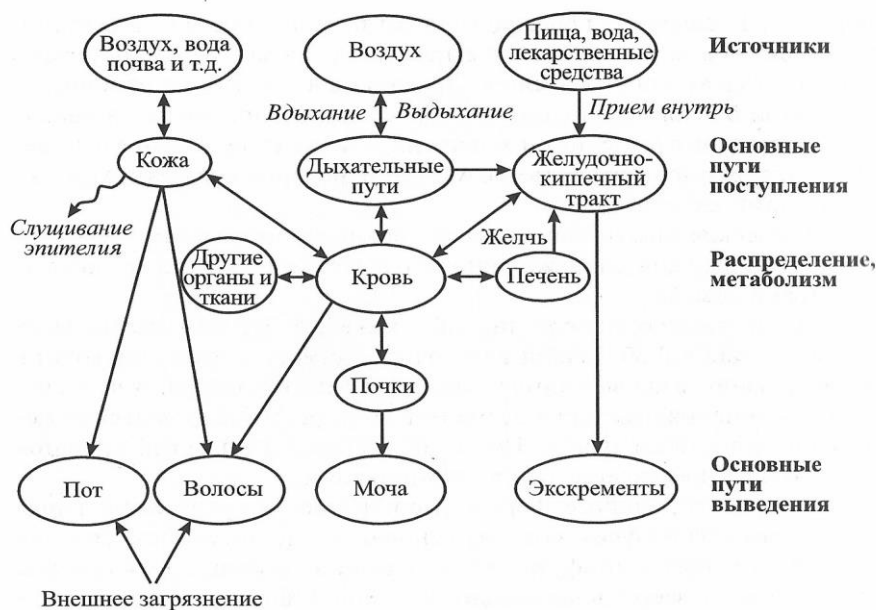


Рисунок 5. Распределение металлических ядов после поступления в организм

Как правило, ионные формы неорганических соединений плохо всасываются из желудка, поэтому основным источником поступления элементов в кровь и лимфу является кишечник. Большая доля тяжелых металлов всасывается в двенадцатиперстной кишке и в средней части тонкой кишки, pH содержимого которых не превышает рК равновесных процессов образования основных солей и гидроксидов. В толстой кишке (pH~8,0) образуются малорастворимые гидроксиды и основные соли, всасывание которых затруднено; они подвергаются кишечной экскреции. Например, при попадании внутрь растворимой соли сурьмы (SbO_3) в содержимом кишечника можно обнаружить соли стибила SbOX (X - однозарядный анион) и гидроксид Sb(OH)_3 .

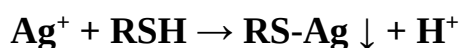
Основными механизмами переноса различных химических форм элементов через слой эпителиальных клеток кишечника - энтероцитов являются диффузия и активный транспорт. В качестве регуляторов транспорта и переносчиков выступают различные белки.

Неорганические соединения могут поступать в организм через дыхательные пути в молекулярной [летучие карбонилы Ni(CO)_4 и оксиды SeO_2 , OSO_4 , Tl_2O] или атомарной (пары металлов Hg, Zn, Pb) форме. Микрочастицы размером от 5 нм до 50 мкм малорастворимых оксидов, солей, гидроксидов поступают в организм в виде аэрозолей вместе с вдыхаемым воздухом. Токсичные вещества могут всасываться практически на любом участке эпителия дыхательных путей. Доля вещества, поступившего в кровь и лимфу,

возрастает с ростом периода задержки в органах дыхания. Многие металлы поглощаются легкими в десятки раз эффективнее, чем кишечником. Это вполне объяснимо, поскольку общая площадь внутренней поверхности легких составляет около 60 м².

Часть микрочастиц, осевших в альвеолах, захватывается макрофагами. Значительная доля микрочастиц поступает в желудок через носоглотку. Вещества, поступившие в желудочно-кишечный тракт, при всасывании попадают в печень через портальную венозную систему, а затем выделяются с желчью в кишечник или достигают системного кровотока.

Поступление неорганических веществ в организм при абсорбции через кожу происходит при случайных контактах с ядами, а иногда при использовании лекарственных средств. Так, например, чрезвычайно опасно пребывание в помещении с высоким содержанием паров металлической ртути Hg⁰, которая легко абсорбируется через кожу. При длительном применении препаратов серебра (протаргола, колларгола, раствора AgNO₃) для лечения язв, трещин, эрозий возникает *аргирия* («посиневший» больной), обусловленная образованием металлического серебра и тиолатов (протеинатов), придающих коже темно-синее окрашивание:



Абсорбция токсикантов осуществляется через эпидермис, сальные железы и волосяные фолликулы. Эффективность кожной абсорбции в значительной мере определяется физико-химическими свойствами токсичного агента: размером молекул, растворимостью в воде и липидах, степенью ионизации, способностью гидролизаться. На абсорбцию существенно влияют кислотность (pH) эпидермиса и дермы, температура, скорость кровотока.

При накожной аппликации происходит абсорбция солей меди, золота, серебра, бериллия, цинка, ртути, таллия, мышьяка, хрома, никеля. Некоторые неорганические соединения этих элементов вызывают аллергические реакции и дерматиты.

Гораздо более подробно изучена роль кожи как органа выделения. Некоторые токсичные элементы, например мышьяк, удаляются при слущивании эпидермиса. Через потовые железы эффективно экскретируются соединения меди, кадмия, цинка, свинца.

Особенно велика опасность токсического воздействия металлов на детский организм. У детей соединения металлов, например свинца, всасываются из желудочно-кишечного тракта более интенсивно. Активный рост и быстрое деление клеток в организме ребенка создают условия для генотоксических воздействий металлов.

Специфика накопления токсичного металла в тканях и органах отражает как недавнее воздействие, так и отдаленное или длительное воздействие на организм.

Обычно для обнаружения и оценки интенсивности токсического воздействия металла используют кровь, мочу, волосы. При остром воздействии металл обнаруживают в крови и моче. При хронических отравлениях для определения токсичных элементов, например мышьяка или таллия, используют волосы.

Выявление химической формы токсичных металлов (металлом) пока не нашло широкого применения в химико-токсикологическом и судебно-химическом анализе, но со временем будет использовано для диагностики. Например, обнаруженный в плазме или моче металлотионеинат кадмия имеет большее токсикологическое значение, чем общее содержание кадмия в тканях. Действительно, присутствие в организме комплексов металла с металлотионеином свидетельствует о длительном пребывании ионов Cd^{2+} в организме и его депонировании в почках. Именно в почках и печени происходит активный синтез лигандов - металлотионеинов $\text{MT}(\text{SH})_x$, обеспечивающих естественную детоксикацию:



Токсичность металлов зависит от их химической формы, конкурирующих взаимодействий с биогенными металлами, устойчивости металлопротеиновых комплексов, а также возраста, образа жизни и иммунного статуса человека.

Курение и прием алкоголя могут напрямую или косвенно влиять на биологическую активность металлов. Дым сигарет содержит токсичные металлы, попадающие при курении в легкие. При чрезмерном приеме алкоголя уменьшаются потребление основных питательных веществ с пищей и абсорбция необходимых микроэлементов.

3. Механизмы токсичности металлов

Токсическое воздействие неорганических веществ проявляется как общими неспецифическими, так и специфическими признаками.

Имеется много общего в механизмах токсичности разнообразных металлических токсикантов. Прежде всего, это касается механизмов транспорта металлов. Для проявления токсических свойств ион металла должен пересечь биологическую мембрану и проникнуть внутрь клетки.

Если элемент находится в химической форме, растворимой в липидах (например, мышьяк или ртуть в виде алкильных производных), то диффузия через липидные слои клеточной мембраны происходит беспрепятственно. При связывании металла с белком, например кадмия с металлотионеином, металл попадает в клетку путем эндоцитоза, включающего пиноцитоз и фагоцитоз.

Некоторые ионы могут транспортироваться в свободной форме (например, ионы свинца) через кальциевые каналы (рис. 6).

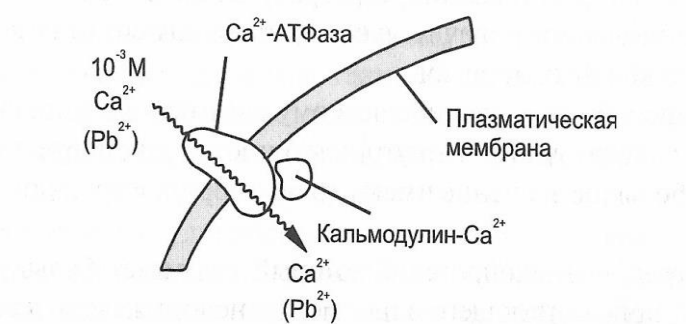


Рисунок 6. Использование кальциевых каналов для транспорта ионов Pb^{2+}

Транспорт ионов может осуществляться в виде комплексов с эндогенными лигандами по специфическим транспортным системам, предназначенным непосредственно для их переноса. Известно множество белков-переносчиков, которые осуществляют транспорт металлов через мембраны клеток и внутриклеточных органелл. Для переноса через плазматические мембраны ванадаты VO_4^{3-} и арсенаты AsO_4^{3-} , структурно подобные фосфату PO_4^{3-} , используют фосфатные транспортные системы, тогда как хроматы CrO_4^{2-} , молибдаты MoO_4^{2-} и селенаты SeO_4^{2-} используют транспортные механизмы изоморфного сульфата SO_4^{2-} .

Токсичные элементы, как и избыточные количества необходимых элементов, могут вызывать необратимые смещения динамических равновесий в биологических системах, приводящие к развитию патологии или к смерти. Повреждающее действие химического агента проявляется на различных структурных уровнях, начиная с молекулярного. Наиболее важными аномальными эффектами неорганических веществ на молекулярном уровне являются 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, которые выражаются в дефиците жизненно важных метаболитов, нарушении структуры и проницаемости клеточных мембран. Нарушение нормальной жизнедеятельности клеток обуславливает дисфункцию органов, а в ряде случаев появление новообразований.

Аномальное изменение функционирования органов определяет у всех млекопитающих и человека признаки отравления неорганическими веществами на организменном уровне: замедление роста, смещение физиологических параметров, ослабление репродуктивной функции и увеличение смертности потомства, появление новообразований, преждевременную смерть.

Механизмы токсичности ионов металлов в биосредах во многом определяются их химической формой, в которой токсичный элемент имеет характерную степень окисления.

Механизмы токсичности ионов металлов определяются также процессами комплексообразования. Существует несколько видов взаимодействия металла с белком. Белок может быть мишенью для токсического воздействия, при этом наиболее ощутимо взаимодействие с ферментами. Токсичные металлы могут замещать необходимые элементы в качестве кофакторов ферментов. Конкурирующие реакции с участием ионов токсичных элементов при метаболизме отражают основные механизмы токсичности. Например, свинец препятствует кальций зависимому высвобождению нейромедиаторов.

Белки могут играть защитную роль, снижая токсичность металла. Наиболее исследованы в этом плане металлотионеины. Низкомолекулярные металлотионеины (~ 6000 г/моль) имеют высокое сродство к жизненно необходимым и токсичным металлам, в первую очередь ионам меди, цинка, ртути, кадмия, серебра. Интенсивность синтеза металлотионеинов в значительной степени зависит от поступления в организм токсичных металлов.

Белки, способные к специфическому связыванию металлов, участвуют во внеклеточном и внутриклеточном транспорте металлов. Среди них большое значение имеют трансферрин, ферритин, церулоплазмин.

Трансферрин - гликопротеин, который связывает большую часть железа (III), присутствующего в плазме. Транспорт железа через мембраны клеток происходит посредством рецепторного эндоцитоза трансферрина и железа (III) (рис.7). Трансферрин участвует также в транспорте Al^{3+} и Mn^{2+} .

Ферритин - является основным белком, содержащим железо в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костей. Ферритин может играть роль общего детоксиканта металлов, поскольку связывает различные токсичные металлы, включая ионы Cd^{2+} , Zn^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+} .

Церулоплазмин - гликопротеиновая оксидаза плазмы, содержащая медь, катализирующая окисление $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$, теряет активность при замещении меди в активном центре токсичными ионами.

Неспецифическое связывание с белками, например с сывороточным альбумином и гемоглобином, также играет значительную роль в транспорте ионов металлов и распределении их кровотоком. При воздействии Pb^{2+} , Bi^{3+} , Hg^{2+} , SeO_3^{2-} и других токсичных неорганических ионов образующиеся металлопротеиновые комплексы представляют собой морфологически заметные внутриклеточные включения.

Роль переносчиков играют также аминокислоты и пептиды, образующие комплексные соединения с ионами металлов. Например, клеточный транспорт меди или цинка может происходить в комплексах с гистидином, метилртути - в виде координационных соединений с цистеином или глутатионом.

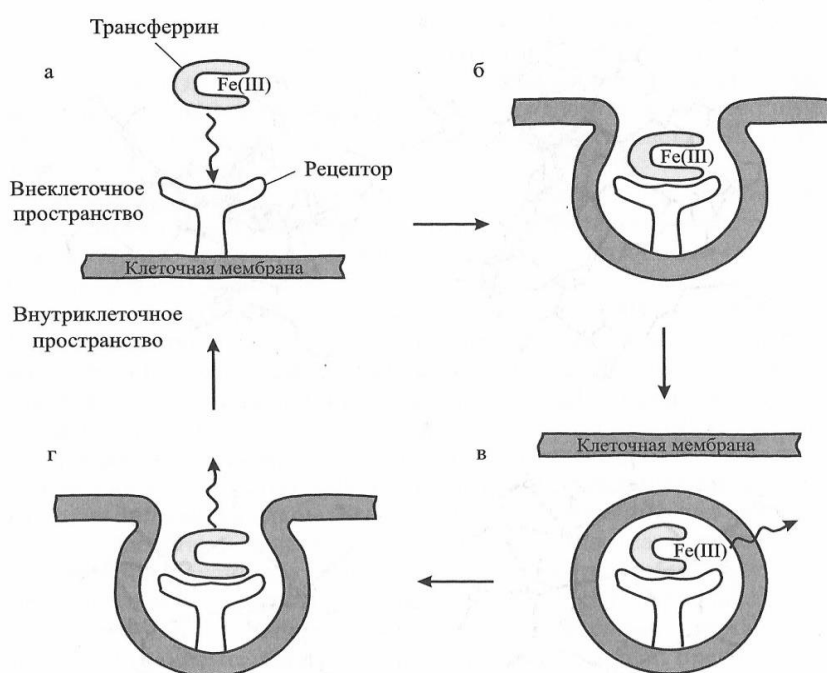


Рисунок 7. Стадии переноса Fe (III) через клеточную мембрану.

а – взаимодействие комплекса трансферрина с Fe (III) и рецептора клеточной мембраны;

б,г – последовательные стадии эндоцитоза, в – высвобождение иона металла в цитоплазме.

Человеческий геном содержит около 9000 генов, кодирующих транспортные белки, из которых 2000 участвуют в транспорте лекарственных веществ и других ксенобиотиков. Однако накопленных знаний недостаточно, чтобы оценить возможный полиморфизм отдельных транспортных белков при переносе токсичных неорганических ионов.

4. Связывание «металлических ядов» биологическим материалом

В организме ионы металлов связываются не только с белковыми веществами, но и с аминокислотами, пептидами и рядом других жизненно важных веществ. Прочность образовавшихся при этом соединений (комплексов) зависит от природы металлов, наличия соответствующих функциональных групп в молекулах веществ, связывающихся с металлами, природы связи в образовавшихся соединениях или комплексах и т. д.

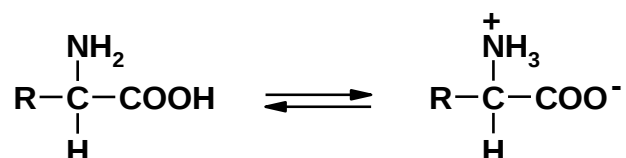
Связывание ионов металлов аминокислотами.

Аминокислоты являются структурными элементами, из которых построены белки и которые определяют многие важные свойства этих белков. В настоящее время известно значительное число аминокислот. Однако в состав белков входит только около двадцати α -аминокислот. Все аминокислоты (кроме пролина), входящие в состав белков, содержат свободную карбоксильную группу и свободную незамещенную аминогруппу у α -углеродного атома. Пролин имеет замещенную α -аминогруппу и представляет собой α -имино-кислоту.

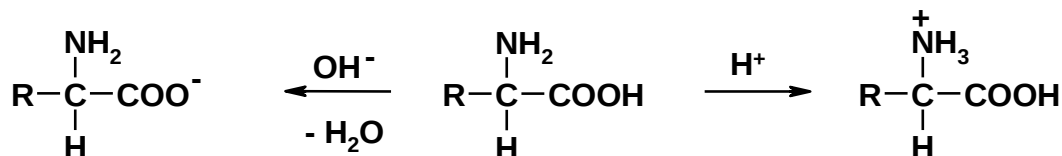
Способность ионов металлов взаимодействовать с аминокислотами зависит от наличия в их составе определенных атомов и функциональных групп. С ионами металлов могут взаимодействовать концевые амино- и карбоксильные группы аминокислот. Большая роль в образовании связей между ионами металлов и аминокислотами принадлежит и боковым функциональным группам аминокислот. К числу боковых функциональных групп в аминокислотах относятся: спиртовые группы в молекулах серина и треонина, фенильная группа в тирозине, сульфгидрильная группа в цистеине, дисульфидная группа в цистине, вторые карбоксильные группы в аспарагиновой и глутаминовой кислотах, вторые азотсодержащие группы в аргинине и гистидине. Метионин содержит атомы серы в углеродной цепи.

В зависимости от наличия определенных групп атомов в молекулах аминокислот, природы и химических свойств металлов при взаимодействии между ними могут образовываться связи различной прочности.

Аминокислоты в водных растворах и в кристаллическом состоянии находятся в виде биполярных ионов:



Аминокислоты являются амфотерными соединениями. Диссоциация их на ионы зависит от pH среды. В кислой среде аминокислоты диссоциируют как основания, в щелочной - как кислоты:



Катионы металлов взаимодействуют с анионами аминокислот. В аминогруппах аминокислот содержатся атомы азота, имеющие неподеленную пару электронов, за счет которой образуется координационная связь между катионом металла и атомом азота. Эту связь следует рассматривать как один из видов ковалентной связи. При образовании координационной связи между катионом металла и атомом азота донором обоих связывающих электронов является атом азота аминогруппы.

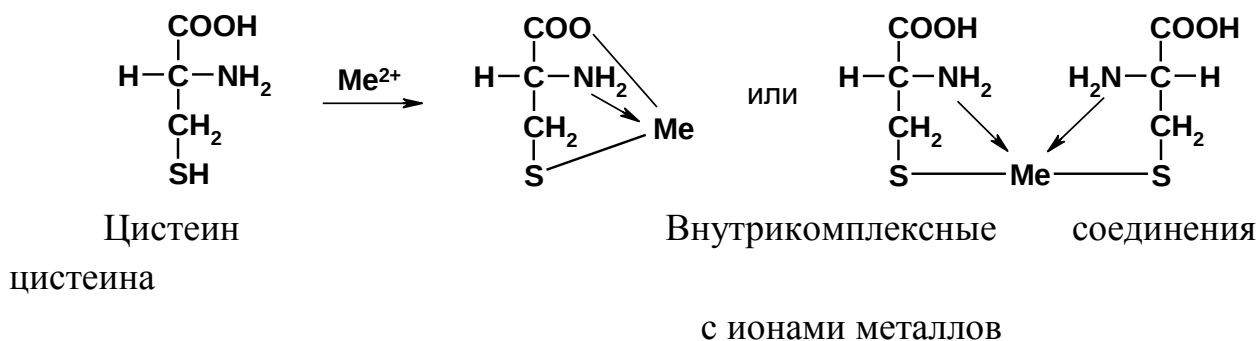
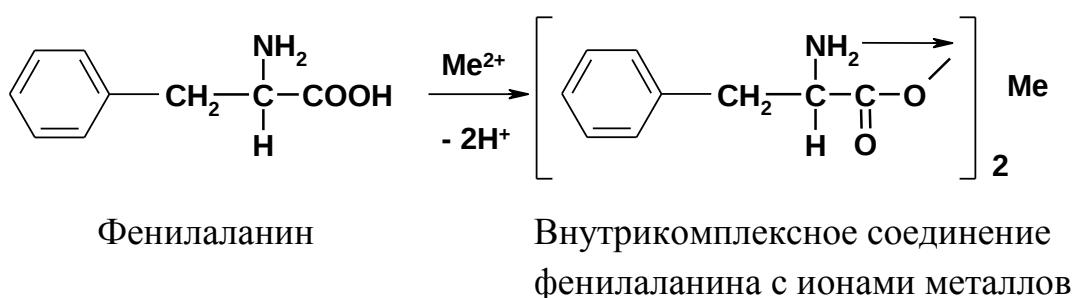
Один атом кислорода в карбоксильной группе аминокислоты после ее диссоциации имеет отрицательный заряд. За счет этого атома кислорода катионы металлов с аминокислотой могут образовывать как ионные, так и ковалентные связи. Характер этих связей зависит от природы катионов. При взаимодействии отрицательно заряженных атомов кислорода в карбоксильных группах с катионами щелочных металлов возникают ионные связи (образуются соли), а с катионами тяжелых металлов - ковалентные связи.

Катионы металлов, являющиеся комплексообразователями, с аминокислотами образуют внутрикомплексные соединения (*хелаты*). При этом положительные заряды катионов нейтрализуются отрицательными зарядами атомов кислорода в карбоксильных группах, а незаряженные атомы

азота аминогрупп с катионами металлов образуют координационные связи.

Катионы металлов также могут связываться с боковыми реакционноспособными функциональными группами (-SH, -NH₂, -COOH) аминокислот с образованием внутрикомплексных соединений. Из аминокислот большой способностью связывать металлы обладают гистидин, содержащий в молекуле имидазольное кольцо, и цистеин, в молекуле которого имеется сульфгидрильная группа.

Образование внутрикомплексных соединений катионов металлов с аминокислотами можно показать на примере фенилаланина и цистеина;



Связывание металлов пептидами.

Пептиды представляют собой продукты конденсации аминокислот, связанные между собой пептидными (амидными) связями (-NH-CO-). Приставки ди-, три-, тетра- и т.д. соответствуют числу остатков аминокислот в молекулах пептидов. Пептиды включающие 20 и больше остатков аминокислот, называют полипептидами. Молекулярная масса их достигает 5000. Полипептиды с большей массой называют белками.

Ди- и трипептиды могут связывать катионы металлов за счет образования связей с концевыми карбоксильными и аминными группами металлами указанными концевыми группами. Пептиды, представляющие

собой продукты конденсации большого числа молекул аминокислот, не могут связываться с металлами указанными концевыми группами, так как эти группы значительно удалены друг от друга. Такие пептиды связываются с катионами металлов за счет образования связей с боковыми функциональными группами или с концевой карбоксильной группой и с атомом азота амидной группы, близко расположенной к карбоксильной группе. Координационная связь металла с атомом азота амидной группы менее прочная, чем связь металла с азотом иминной группы, т.к. электронодонорные свойства атома азота амидной (пептидной) группы выражены значительно слабее, чем у азота аминной группы.

При образовании связей между ионами металлов и пептидами-донорами электронов могут быть не только атомы азота, но и атомы серы, находящихся в дисульфидных мостиках.

Связывание металлов белками.

Белки занимают центральное место в структуре живой материи и играют первостепенную роль в ее функционировании. В количественном отношении белки представляют собой основной материал тканей живых организмов. Белки составляют до 75 % сухой массы клеток.

Белки представляют собой макромолекулы с молекулярными массами от 5000 до нескольких миллионов. Они состоят из α -аминокислот, связанных между собой пептидными (амидными) связями, образованными карбоксильными и аминными группами соседних аминокислотных остатков.

В образовании связей с металлами могут принимать участие концевые amino- и карбоксильные группы белковых молекул. Однако число концевых групп в молекулах белков незначительное. Каждая молекула белка, представляющая длинную полипептидную цепь, содержит только две значительно удаленные друг от друга концевые ($-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$) группы и большое число боковых функциональных групп. Поэтому образование связей между ионами металлов и белками происходит в основном за счет боковых функциональных групп ($-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$). Полагают, что металлы связываются с белками главным образом через остатки гистидина, содержащего имидазольное кольцо, и цистеина, имеющего боковую сульфгидрильную группу.

Выше приведены сведения о связывании ионов металлов с аминокислотами, пептидами и белками в организме. Однако металлы могут связываться в организме и с другими соединениями, играющими важную роль во всех живых клетках. К таким соединениям относятся птеридины (в том

числе фолиевая кислота), пурины, рибофлавин, нуклеиновые кислоты и многие др. В большинстве случаев ионы металлов с перечисленными выше соединениями образуют прочные ковалентные связи.

5. Мишени токсического воздействия металлов

Токсичность металлов проявляется при их взаимодействии с клеточными мишенями. Такими мишенями чаще всего являются молекулярные структуры, участвующие в специфических биохимических превращениях, и мембраны субклеточных структур.

Ионы токсичных элементов конкурируют с катионами эссенциальных элементов во всех метаболических процессах, в первую очередь в реакциях комплексообразования. Основная мишень токсического воздействия металлов - ферменты, взаимодействие с которыми сопровождается, как правило, их ингибированием, а не активацией. Известны два основных механизма такого взаимодействия: химическая реакция иона металла с тиоловой (сульфгидрильной) группой фермента и замещение нативного металлического кофактора фермента токсичным металлом.

В соответствии с теорией жестких и мягких кислот и оснований Пирсона токсичные ионы большого радиуса - Cd^{2+} , Hg^{2+} и Pb^{2+} , проявляя свойства мягких кислот, образуют прочные связи с мягкими биогенными основаниями, в первую очередь с SH-группами. Их антагонисты - необходимые макроэлементы Mg^{2+} и Ca^{2+} того же ионного заряда, но меньшего радиуса (жесткие кислоты) - с тиоловыми группами не взаимодействуют.

Ион свинца может заместить цинк в дегидратазе δ -аминолевулиновой кислоты, ингибируя синтез гема - компонента гемоглобина и гемсодержащих ферментов типа цитохромов.

Токсичные металлы могут разрушать структуру и функцию ряда органелл. Например, они могут ингибировать ферменты, связанные с эндоплазматическим ретикулумом, дыхательные ферменты в митохондриях, накапливаться в лизосомах и проникать в ядро клетки.

Многие металлы канцерогенны для людей и животных. Различные химические формы мышьяка, соединения хрома (VI), никеля (II) известны как канцерогены человека; соединения бериллия, кадмия, платины - возможные канцерогены. Канцерогенность может быть связана с процессами взаимодействия иона металла с ДНК клеток.

Токсичность металлов может проявляться нарушением функций органов и систем. Например, действие ионов кадмия связано с повреждением

почечной ткани. Неорганические соединения ртути, растворимые в воде, также проявляют нефротоксичность.

Нервная система является мишенью практически для всех токсичных металлов, особенно для органических производных металлов. В частности, метилртуть как липофильное вещество легко проникает через гематоэнцефалический барьер и концентрируется в нервной ткани.

Есть данные, свидетельствующие о токсическом действии металлов на репродуктивную систему человека, поскольку мужские и женские репродуктивные органы находятся под сложным нейроэндокринным контролем. Любой токсикант, действующий на отдельные звенья этих процессов, способен нарушить работу системы в целом. Например кадмий, как известно, при остром токсическом воздействии вызывает различные повреждения яичек. Свинец аккумулируется в яичках и ингибирует сперматогенез.

При профессиональном воздействии металлической пыли дыхательная система становится одной из главных мишеней токсичности. Острое воздействие может вызвать раздражение и воспаление дыхательных путей, а хроническое воздействие приводит к фиброзам (например, алюминий) или злокачественным новообразованиям (например, мышьяк, хром, никель).

Как уже отмечалось выше, токсичность кадмия, свинца и ртути зависит от возможности их переноса и накопления внутри клетки. Эти процессы регулируются в определенной степени сродством к некоторым белкам цитозоля. Такие белковые лиганды (металлотионеины) обычно обладают большим числом SH-центров связывания и играют роль переносчиков ионов металлов, способствуя их накоплению в клетке. В случае высокой концентрации токсичного металла металлотионеины играют роль детоксикантов, ограничивая доступ металла к чувствительным органеллам.

МЕТОДЫ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

При отравлениях соединениями металлов на химико-токсикологическое исследование могут поступать органы трупов, биологические жидкости и другие объекты биологического происхождения.

Связи металлов с большинством аминокислот, пептидов, белками являются прочными (ковалентными). Поэтому изолировать «металлические яды» из биологического материала путем настаивания его с органическими растворителями или с другими извлекающими жидкостями (подкисленный этиловый спирт, подкисленная вода) не представляется возможным.

Для исследования биологического материала на наличие «металлических ядов» необходимо разрушить органические вещества, с которыми связаны металлы, и перевести их в ионное состояние.

Методы, применяемые для этой цели, можно подразделить на две группы: методы сухого озоления и методы мокрого озоления, или мокрой минерализации.

Выбор метода минерализации органических веществ зависит от свойств исследуемых элементов, количества пробы биологического материала, поступившего на анализ, и т.д.

1. Сухое озоление и сплавление органических веществ

1.1. Метод сухого озоления

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.

Этот метод минерализации имеет ряд недостатков, главными из которых являются улетучивание некоторых металлов или их соединений в процессе нагревания, а также взаимодействие отдельных металлов с материалом тиглей. При сухом озолении трудно контролировать температуру исследуемого материала непосредственно в тигле. При перегреве содержимого тигля некоторые металлы могут улетучиваться. В процессе сухого озоления биологического материала даже при относительно невысокой температуре частично или полностью улетучиваются соединения ртути, таллия и др. При температуре выше 400 °С хлориды кадмия, свинца, серебра, цинка, марганца,

мышьяка являются летучими. При несколько более высокой температуре могут улетучиваться некоторые соединения меди, никеля, хрома и др.

В процессе сухого озоления органических веществ при высокой температуре цинк, серебро, свинец и некоторые другие металлы могут взаимодействовать со стенками кварцевых и фарфоровых тиглей, а кобальт способен сплавляться со стенками платиновых тиглей или взаимодействовать с материалом фарфоровых тиглей.

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

Исследуемые объекты (растительные консервы или части органов) измельчают, вносят в фарфоровые чашки, которые помещают на нагретую песочную баню, и высушивают исследуемую пробу. Затем при дальнейшем осторожном нагревании песочной бани обугливают эту пробу. Обуглившийся или превращенный в пепел биологический материал охлаждают, смачивают концентрированным раствором нитрата аммония или концентрированной азотной кислотой. Фарфоровую чашку помещают на кипящую водяную баню и высушивают ее содержимое, которое переносят в фарфоровый тигель вместимостью 30-50 мл, и осторожно нагревают на слабом пламени. При этом пламя не должно соприкасаться с дном тигля. Нагревание тигля производят таким образом, чтобы его содержимое постепенно превращалось в золу и не было вспышки. При неполном сгорании органических веществ зола в тигле имеет черный или серый цвет.

Для полноты сгорания содержимого тигля его смачивают концентрированным раствором нитрата аммония, высушивают на водяной бане и прокаливают. После этого тигель охлаждают, а к его содержимому прибавляют раствор соответствующей кислоты (соляной или азотной) для перевода оксидов металлов в их соли. При исследовании полученного минерализата на наличие марганца золу обрабатывают соляной кислотой, а при исследовании на наличие меди – азотной кислотой. После обработки золы соответствующей кислотой содержимое тигля фильтруют. Фильтрат выпаривают на кипящей водяной бане досуха. Сухие остатки растворяют в 3-5 мл воды и полученные растворы исследуют на наличие катионов соответствующих металлов (марганца или меди).

Этот метод пригоден при исследовании биологического материала на наличие цинка и висмута.

Сухое озоление органических веществ должно производиться в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

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. При этом может происходить быстрое окисление органических веществ, сопровождающееся выбрасыванием из тигля мелких частиц сожженной пробы. Отмечены случаи взрыва при нагревании некоторых органических веществ с нитратами. Для предотвращения протекания слишком бурной реакции, которая может сопровождаться взрывом, при сплавлении применяют не нитраты, а их смеси с карбонатами щелочных металлов.

Выполнение сплавления. 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.

1-2 г исследуемого объекта вносят в фарфоровую чашку, прибавляют 4-6 г смеси, состоящей из двух частей карбоната натрия и одной части нитрата натрия, перемешивают, смачивают водой и при нагревании на водяной бане высушивают досуха. В фарфоровый тигель вместимостью 30-50 мл вносят 5-6 г нитрата натрия. Тигель осторожно нагревают до полного расплавления нитрата натрия. Затем уменьшают пламя и в тигель небольшими порциями вносят указанную выше высушенную в фарфоровой чашке смесь исследуемого объекта, нитрата и карбоната натрия. Каждую новую порцию этой смеси вносят в тигель после сгорания предыдущей и перехода ее в расплавленное состояние.

После сжигания последней порции смеси в фарфоровую чашку, в которой находилась эта смесь, вносят 2-3 г карбоната натрия, хорошо перемешивают, чтобы остатки исследуемого объекта, оставшиеся на стенках фарфоровой чашки, хорошо смешались с карбонатом натрия. Карбонат натрия вносят в тигель для сжигания исследуемой смеси. При сплавлении смеси пламя горелки регулируют так, чтобы в тигле не вспыхивало пламя и с выделяющимися газами не удалялось исследуемое вещество.

После сжигания всей смеси тигель охлаждают, а его содержимое обрабатывают кипящей водой. Полученный раствор применяют для обнаружения и количественного определения «металлических ядов».

Метод сплавления непригоден для исследования объектов биологического происхождения на наличие соединений ртути, так как они улетучиваются при нагревании с нитратом и карбонатом натрия.

2. Окислители, применяемые для минерализации органических веществ

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.

Азотная кислота. Первый метод минерализации (разрушения) биологического материала при химико-токсикологических исследованиях предложил русский ученый А.П. Нелюбин. Он применил концентрированную азотную кислоту. Метод разрушения биологического материала концентрированной азотной кислотой сыграл большую роль в развитии химико-токсикологического анализа. Он был использован для разрушения ряда объектов биологического происхождения и последующего обнаружения ионов металлов в минерализатах.

Однако разрушение биологического материала нагреванием с концентрированной азотной кислотой требует большой затраты времени. В некоторых случаях разрушение органических веществ заканчивается только после повторного нагревания объектов биологического происхождения с азотной кислотой. Концентрированная азотная кислота слабо окисляет жиры, находящиеся в биологическом материале. Поэтому иногда требуется проводить экстракцию жиров петролейным эфиром или другими органическими растворителями и только после этого приступать к разрушению органических веществ нагреванием с концентрированной азотной кислотой. При повторном нагревании биологического материала с концентрированной азотной кислотой теряется некоторое количество кобальта, цинка, марганца и других металлов, содержащихся в исследуемых объектах.

Серная кислота. Концентрированная серная кислота, действует как дегидратирующий агент и окислитель. На использовании этой кислоты базируется метод определения азота в органических соединениях по Кьельдалю, предложенный в 1883 г. Концентрированная серная кислота применялась для разрушения различных органических соединений. Разбавленная серная кислота не проявляет окислительных свойств и не разрушает органических соединений. С повышением температуры и концентрации серной кислоты усиливаются ее окислительные свойства. При окислении органических веществ концентрированная серная кислота может восстанавливаться до оксида серы IV, свободной серы или сероводорода.

Концентрированная серная кислота как окислитель органических веществ имеет и ряд недостатков. Процесс окисления органических веществ этой кислотой является длительным. Кроме этого, могут образовываться неразлагающиеся этой кислотой обуглившиеся остатки. В процессе разрушения органических веществ нагретой концентрированной серной кислотой могут улетучиваться соединения ртути. Для ускорения и более полного разрушения органических веществ концентрированной серной кислотой прибавляют катализаторы (сульфат меди, оксид селена IV и др.). В литературе описан ряд модификаций метода разрушения органических веществ концентрированной серной кислотой. Выбор этих модификаций зависит от количества и природы разрушаемых соединений.

Ввиду медленного протекания процесса окисления биологического материала концентрированной серной кислотой и образования неразлагаемых обугленных остатков, этот метод мало пригоден для минерализации объектов биологического происхождения, исследуемых на наличие «металлических ядов».

Смесь серной и азотной кислот. В 1821 г. М.Ж. Орфила для разрушения органических веществ предложил смесь концентрированных серной и азотной кислот. В 1902 г. Мейллер применил смесь азотной и серной кислот для разрушения биологического материала при исследовании его на наличие фосфора. П.К. Равданикис в 1908 г. модифицировал метод Мейллера и применил его в химико-токсикологическом анализе для разрушения биологического материала, содержащего «металлические яды».

Смесь серной кислоты и нитрата аммония. Метод разрушения органических веществ смесью концентрированной серной кислоты и нитрата аммония предложил А. В. Степанов. Этот метод на протяжении ряда лет широко применялся в практике судебно-химических лабораторий СССР.

После разрушения органических веществ смесью серной и азотной кислот или смесью концентрированной серной кислоты и нитрата аммония в минерализате содержится большое количество оксидов азота, которые мешают обнаружению и количественному определению некоторых «металлических ядов». В связи с этим предложены различные вещества для *денитрации* (освобождения от азотной, азотистой кислот и оксидов азота) минерализатов. Для этой цели применялись пероксид водорода, мочеви́на, сульфами́новая кислота и др.

Ф.В. Зайковский для денитрации минерализатов предложил формальдегид. Метод, основанный на разрушении органических веществ смесью серной и азотной кислот и на денитрации минерализатов формальдегидом, широко применяется в химико-токсикологических лабораториях нашей страны. Однако этот метод непригоден для химико-токсикологического анализа биологического материала на наличие ртути, значительные количества которой улетучиваются в процессе минерализации.

Смесь хлората калия и соляной кислоты. В химико-токсикологическом анализе для разрушения биологического материала долгое время применялся метод Фрезениуса и Бабо, предложенный в 1844 г. Этот метод основан на разрушении органических веществ хлоратом калия KClO_3 и соляной кислотой. При взаимодействии хлората калия с соляной кислотой выделяется хлор, обладающий окислительными свойствами. Выделившийся при этой реакции хлор разрушает биологический материал.

Учитывая, что при использовании хлората калия и соляной кислоты для разрушения органических веществ процесс минерализации происходит медленно, а в ряде случаев минерализация биологического материала не доходит до конца, в последнее время этот метод потерял свое значение и в химико-токсикологическом анализе не применяется.

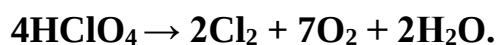
Хлорная кислота. В химико-токсикологическом анализе для разрушения органических веществ применяется хлорная кислота (HClO_4) и ее смеси с другими кислотами. Хлорную кислоту, как окислитель, в аналитической химии впервые применил А. Щербак в 1893 г. Метод минерализации органических веществ смесью хлорной, азотной и серной кислот в 1934 г. предложил Каан. Метод разрушения органических веществ с помощью хлорной кислоты HClO_4 характеризуется высокой скоростью минерализации, а также способностью этой кислоты разрушать вещества, стойкие или медленно разлагающиеся другими окислителями.

Учитывая возможность взрыва при разрушении органических веществ хлорной кислотой и ее смесями, необходимо строго придерживаться правил

обращения с этой кислотой. Свойства хлорной кислоты и правила обращения с ней приводятся ниже.

Безводная хлорная кислота HClO_4 представляет собой сильно дымящую жидкость (мол. масса 100,47, плотность 1,768, т.пл. – 112°C , т.кип. 160°C , 2,39 кПа). Эта кислота гигроскопична, нестойкая и может взрываться при хранении. При нагревании безводной хлорной кислоты до температуры выше 90°C она разлагается со взрывом. Эта кислота также взрывается при соприкосновении с некоторыми органическими соединениями. Поэтому, работая с безводной хлорной кислотой, следует соблюдать меры предосторожности.

При нагревании разбавленных растворов хлорной кислоты вначале отгоняется вода, а при 203°C - азеотропная смесь, содержащая 72,4 % (мас.) указанной кислоты. Эта смесь известна как концентрированная хлорная кислота. Ее можно хранить не опасаясь взрыва. Растворы хлорной кислоты, концентрация которых выше 72 %, при нагревании разлагаются на хлор, кислород и воду:



При нагревании безводной хлорной кислоты может образовываться взрывоопасный Cl_2O_7 .

Хлорная кислота относится к сильным кислотам. Ее окислительные свойства зависят от концентрации и температуры. Сильным окислителем является только нагретая концентрированная хлорная кислота. Холодная концентрированная (70 %-я) хлорная кислота не окисляет даже иодиды до свободного иода и железо (II) до железа (III). Для аналитических целей применяется 30-70%-я хлорная кислота. Разбавленная хлорная кислота не проявляет окислительных свойств ни на холоде, ни при нагревании.

Безводная хлорная кислота является взрывоопасной. Взрыв может произойти и в тех случаях, когда к растворам хлорной кислоты прибавляют водоотнимающие вещества (концентрированную серную кислоту, уксусный ангидрид и др.), гидразин, гидроксиламин, гипохлориты и др. При нагревании хлорной кислоты с жирами, целлюлозой, сахаром, многоатомными

спиртами, азотсодержащими гетероциклическими соединениями и некоторыми другими веществами тоже может произойти взрыв.

Очень опасны твердые перхлораты (соли хлорной кислоты) некоторых органических соединений (пиридина, анилина, диазосоединений и др.). Они детонируют даже при легком прикосновении к ним или же при их перемешивании. Перхлораты диазосоединений опасны даже во влажном состоянии. Смеси хлорной кислоты с желатином и уксусным ангидридом чувствительны к удару.

Во избежание возможного воспламенения и взрыва не следует обрабатывать хлорной кислотой неразложившиеся органические вещества. Для разложения таких веществ сначала их обрабатывают азотной кислотой, которая разлагает легкоокисляющиеся органические соединения, а затем прибавляют хлорную кислоту.

Учитывая взрывоопасность хлорной кислоты и способность ее вступать в реакции со многими органическими веществами, нельзя хранить эту кислоту в склянках, закрытых корковыми или резиновыми пробками. Сосуды, в которых сохраняют хлорную кислоту, должны быть закрыты притертыми стеклянными пробками.

При использовании хлорной кислоты для минерализации органических веществ нагревание исследуемого материала с этой кислотой необходимо проводить в колбах, снабженных обратными холодильниками. При нагревании содержимого колб с обратными холодильниками вода не улетучивается, а следовательно, и не повышается концентрация хлорной кислоты. Холодильники к колбам нельзя присоединять с помощью корковых или резиновых пробок. Для этой цели применяют холодильники и колбы со шлифами.

В ходе минерализации органических веществ смесью кислот, в состав которых входит хлорная кислота, может происходить обугливание исследуемого материала. В таких случаях содержимое колб необходимо немедленно разбавить водой, а затем производить минерализацию смесью кислот (без хлорной кислоты). Это связано с тем, что обуглившиеся частицы органических веществ могут активно взаимодействовать с хлорной кислотой и давать взрыв.

Не допускается полное испарение жидкостей, содержащих хлорную кислоту. При выпаривании таких жидкостей происходит удаление воды и повышается концентрация хлорной кислоты. В результате этого может

произойти взрыв. Если трудно проконтролировать содержание хлорной кислоты в испаряемой жидкости, то в кипящую жидкость прибавляют концентрированную серную кислоту, имеющую более высокую температуру кипения (338 °С), чем хлорная кислота. Поэтому серная кислота останется даже после полного испарения хлорной кислоты из раствора.

Разлитую хлорную кислоту необходимо сразу же разбавить водой, а затем пол или стол вытереть шерстяной (но не хлопчатобумажной) тряпкой. Если не сделать этого, то вода, содержащаяся в разлитой хлорной кислоте, будет испаряться, а концентрация указанной кислоты – увеличиваться. При определенной концентрации оставшейся хлорной кислоты может произойти возгорание или взрыв.

Фильтровальную бумагу, через которую фильтровалась хлорная кислота или ее растворы, необходимо тщательно промывать водой. При несоблюдении этого правила жидкость из непромытых фильтров будет испаряться, а концентрация хлорной кислоты на фильтрах будет возрастать. После высыхания непромытых водой фильтров может произойти их возгорание.

Деревянные части вытяжных шкафов, в которых производилась работа с любыми количествами хлорной кислоты, необходимо регулярно хорошо промывать водой.

Пергидроль. Для разрушения органических веществ в химико-токсикологическом анализе иногда применяют пергидроль и серную кислоту.

Пергидроль представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, содержащую 27,5-31 % пероксида водорода H_2O_2 . Окислительные свойства пероксида водорода усиливаются в присутствии серной кислоты. Это объясняется взаимодействием пероксида водорода с серной кислотой с образованием надсерной (пероксомonosерной) кислоты H_2SO_5 , обладающей большой окислительной способностью.

При взаимодействии пероксида водорода с некоторыми органическими веществами может произойти взрыв. Поэтому, вначале необходимо частично окислить органические вещества концентрированной серной кислотой, а затем для полного окисления этих веществ в горячий раствор по каплям прибавлять пергидроль.

Иногда для минерализации органических веществ применяют трехкомпонентную смесь (пергидроль, концентрированные серная и азотная кислоты). В этих случаях исследуемый объект вначале обрабатывают смесью концентрированных серной и азотной кислот. После частичного окисления

органических веществ этой смесью прибавляют пергидроль, полностью разрушающий органические вещества.

Предложены методики разрушения органических веществ смесью серной, хлорной кислот и пергидроля. Учитывая взрывоопасность хлорной кислоты, минерализацию органических веществ по этим методикам необходимо проводить, соблюдая меры предосторожности.

При использовании метода разрушения органических веществ пергидролем в присутствии указанных выше кислот возможны потери значительных количеств мышьяка, ртути и других металлов. Эти потери увеличиваются при содержании в исследуемом биологическом материале больших количеств хлоридов.

Предпринята попытка проводить разрушение органических веществ пергидролем в щелочной среде. Окислительная способность пероксида водорода в щелочных растворах ниже, чем в кислых, однако скорость окисления органических веществ пероксидом водорода в щелочных средах выше, чем в кислых.

3. Отбор и подготовка проб биологического материала для минерализации

При исследовании биологического материала на наличие «металлических ядов» анализу подвергают органы трупов (печень, почки, желудок с содержимым и др.), биологические жидкости (кровь, моча), пищевые продукты и другие объекты.

Количество исследуемого материала, необходимое для каждого анализа, зависит от общей массы объекта, поступившего на исследование, и от обстоятельств дела. Если из материалов дела известно, что умерший после отравления «металлическими ядами» еще жил долгое время, в течение которого вещество, вызвавшее отравление, хотя бы частично могло выделиться из организма, а также при наличии данных о том, что умершим была принята небольшая доза яда, то на исследование по возможности берут большее количество биологического материала. При отсутствии таких данных на исследование берут пробы по 100 г биологического материала.

Каждую пробу биологического материала минерализуют отдельно, не допуская смешивания этих проб. Если на химико-токсикологический анализ поступили относительно большие навески органов трупов или пищевых продуктов, то на исследование можно брать несколько порций каждого

объекта (массой по 100 г) и каждую порцию разрушать отдельно. Затем соединять минерализаты, полученные из одного и того же объекта.

Если же на анализ поступают малые количества объектов, то для исследования на наличие «металлических ядов» может быть использован биологический материал, из которого ранее были отогнаны летучие яды с водяным паром. Такой биологический материал содержит большое количество воды, мешающей минерализации. При наличии большого количества воды в объекте трудно создать соответствующую концентрацию кислот-окислителей, необходимых для минерализации. Поэтому перед минерализацией из объектов удаляют основную массу воды упариванием на водяной бане. Так же поступают и с другими объектами (моча), богатыми водой. Их упаривают до небольшого объема, а затем проводят минерализацию находящихся в них органических веществ.

На исследование могут поступать органы трупов, консервированные этиловым спиртом. При минерализации биологического материала, содержащего этиловый спирт, может произойти загорание спирта. Это обстоятельство особенно нужно учитывать при минерализации биологического материала хлорной кислотой и ее смесями с другими кислотами, а также при минерализации биологического материала хлоратом калия KClO_3 и соляной кислотой или пергидролем и серной кислотой. К биологическому материалу, консервированному этиловым спиртом, прибавляют раствор карбоната натрия, хорошо перемешивают и на водяной бане, нагретой не выше $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, отгоняют этиловый спирт. После отгонки спирта приступают к минерализации биологического материала.

Меры предосторожности при минерализации. При любом способе минерализации из-за несоблюдения мер предосторожности возможно выбрасывание горячих кислот из колб. В результате этого могут быть поражены глаза, кожа лица и рук или повреждена одежда этими кислотами. Ввиду возможного взрыва при минерализации биологического материала хлорной кислотой, пергидролем, хлоратом калия требуется особая предосторожность. Поэтому приступать к разрушению биологического материала любым методом можно только после ознакомления со свойствами применяемых кислот.

При разрушении биологического материала по соответствующим методикам необходимо пользоваться защитными очками, предохраняющими глаза от попадания горячих кислот и осколков стекла при взрыве содержимого колб. Разрушение биологического материала необходимо производить в вытяжных шкафах с хорошей тягой.

Приступая к минерализации биологического материала, необходимо убедиться в том, что кислоты и другие применяемые для этой цели жидкости не содержат примесей соединений металлов, имеющих токсикологическое значение.

При использовании любых методов минерализации биологического материала недостаточно чистые кислоты-окислители могут загрязнять минерализаты соединениями металлов, которые отсутствовали в исследуемых объектах и не были причиной отравления. Учитывая то, что для каждого метода разрушения биологического материала применяются большие объемы кислот, общее количество примесей металлов в минерализатах может быть значительным. Эти примеси металлов могут быть обнаружены при исследовании минерализатов с помощью соответствующих реакций и послужить основанием для ошибочного заключения о наличии «металлических ядов» в биологическом материале.

Чтобы исключить указанную ошибку при химико-токсикологическом анализе, для минерализации биологического материала необходимо применять кислоты, свободные от примесей соединений металлов, имеющих токсикологическое значение. Если степень чистоты кислот и пергидроля, применяемых для минерализации, неизвестна, то проводят «холостой» опыт. С этой целью кислоты-окислители и другие жидкости (пергидроль и др.) берут в таких количествах, в которых они применяются для минерализации биологического материала, и поступают так, как указано в соответствующих методиках разрушения органических веществ. Только при отрицательных реакциях полученных жидкостей на наличие соединений металлов, имеющих токсикологическое значение, делают вывод о пригодности соответствующих кислот для минерализации биологического материала.

4. Разрушение биологического материала азотной и серной кислотами.

Метод разрушения биологического материала азотной и серной кислотами является основным методом, применяемым в химико-токсикологических лабораториях нашей страны.

В начале минерализации концентрированная серная кислота играет роль водоотнимающего средства. Ее роль, как водоотнимающего средства, усиливается с повышением температуры. Благодаря водоотнимающему действию концентрированная серная кислота нарушает структуру клеток и тканей биологического материала. При повышении температуры (выше 110

°C) и концентрации (до 60-70 %) серной кислоты она проявляет окислительные свойства и разлагается с выделением оксида серы (IV).

Азотная кислота, находящаяся в смеси с серной кислотой, вначале минерализации является слабым окислителем. Со временем часть азотной кислоты при окислении биологического материала превращается в оксиды азота и азотистую кислоту, которые являются автокатализаторами дальнейшего более интенсивного процесса окисления органических веществ азотной кислотой. С образованием оксидов азота и азотистой кислоты, а также с повышением температуры азотная кислота проявляет себя как сильный окислитель.

В процессе нагревания биологического материала со смесью азотной и серной кислот происходит не только разрушение органических веществ этими кислотами, но и ряд побочных реакций, к числу которых относятся реакции сульфирования и нитрования органических соединений. Нитрованию и сульфированию в основном подвергаются фенильные группы аминокислот, образующихся при гидролизе белковых веществ кислотами. Нитрование и сульфирование органических веществ при разрушении биологического материала смесью азотной и серной кислот является нежелательным, так как нитро- и сульфосоединения довольно трудно разрушаются смесью этих кислот.

При разбавлении серной и азотной кислот водой, степень нитрования и сульфирования органических соединений этими кислотами значительно уменьшается. Поэтому разрушение биологического материала производится не концентрированными, а частично разбавленными азотной и серной кислотами.

В процессе разрушения биологического материала смесью азотной и серной кислот образуется некоторое количество нитрозилсерной кислоты HOSO_2ONO , которая мешает обнаружению катионов некоторых металлов в минерализатах.

В первой стадии минерализации происходит деструкция биологического материала азотной и серной кислотами, которая заканчивается за 30-40 мин. В результате деструкции получается прозрачная жидкость (деструктат), имеющая желтоватую или бурую окраску.

Во второй стадии минерализации происходит разрушение (окисление) органических веществ, находящихся в жидкой фазе (деструктате), полученной после деструкции биологического материала. Эта стадия разрушения более длительная, чем стадия деструкции.

Для окончательного разрушения органических веществ, находящихся в жидкой фазе, к ней при нагревании по каплям прибавляют азотную кислоту. Полное разрушение органических веществ в жидкой фазе зависит от количества прибавляемой азотной кислоты. От прибавления больших количеств азотной кислоты происходит обильное выделение оксидов азота, выходящих из колбы и загрязняющих атмосферу лаборатории. От прибавления в колбу недостаточных количеств азотной кислоты находящиеся в ней органические вещества обугливаются горячей серной кислотой, о чем свидетельствует потемнение жидкости в колбе. При обугливании органических веществ серной кислотой из жидкости с выходящими газами могут улетучиваться соединения мышьяка и ртути.

Разрушение биологического материала азотной и серной кислотами считается законченным тогда, когда после прекращения добавления азотной кислоты (при нагревании колбы) будут выделяться белые пары серной кислоты и не будет происходить почернение минерализата.

Полученный минерализат используют для обнаружения и количественного определения «металлических ядов». Однако обнаружению и количественному определению катионов некоторых металлов мешают азотная и азотистая кислоты, а также оксиды азота, находящиеся в минерализатах. В связи с этим минерализаты, полученные после разрушения биологического материала, подвергают денитрации.

5. Разрушение биологического материала хлорной, азотной и серной кислотами

В химико-токсикологическом анализе в последнее время нашел применение метод разрушения биологического материала смесью хлорной (HClO_4), азотной и серной кислот, предложенный Кааном в 1934 году. Этим методом достигается почти полное разрушение биологического материала и в 2-3 раза сокращается время разрушения по сравнению со временем, необходимым для минерализации объектов биологического происхождения азотной и серной кислотами. После разрушения биологического материала с помощью хлорной, азотной и серной кислот получают относительно небольшие объемы минерализатов, что повышает чувствительность этого метода.

Несмотря на указанные выше достоинства метода разрушения биологического материала смесью хлорной, азотной и серной кислот, при использовании этого метода требуется особая предосторожность ввиду

взрывоопасности хлорной кислоты. Лица, приступающие к разрушению биологического материала с помощью хлорной, азотной и серной кислот, должны хорошо ознакомиться со свойствами хлорной кислоты. Сведения об этой кислоте приведены выше.

Выполнение минерализации. В колбу Кьельдаля вместимостью 500 мл вносят тщательно измельченный биологический материал, прибавляют по 25 мл концентрированной азотной и серной кислот и 35 мл 37 %-го или 42 %-го раствора хлорной кислоты. Колбу с содержимым устанавливают на асбестированную сетку и постепенно усиливают нагревание колбы. При нагревании может происходить обугливание, о чем свидетельствует почернение содержимого колбы. В этом случае в колбу по каплям прибавляют концентрированную азотную кислоту. Если и при этом будет продолжаться обугливание и над жидкостью, будут появляться пары ангидрида хлорной кислоты Cl_2O_7 , то прекращают или ослабляют нагревание колбы. Окисление биологического материала продолжают прибавлением по каплям 35- 45 %-го раствора азотной кислоты. Когда жидкость в колбе станет прозрачной, тогда прекращают нагревание и проверяют полноту окисления органических веществ в минерализате. С этой целью к капле охлажденного, разбавленного водой минерализата, прибавляют 25 %-й раствор аммиака. Появление слабо-желтой окраски свидетельствует об окончании процесса минерализации. Появление оранжевой окраски указывает на наличие в минерализате некоторых еще не разрушенных аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан и др.).

Этот метод непригоден для разрушения биологического материала, подлежащего исследованию на наличие ртути, которая улетучивается в процессе минерализации.

6. Разрушение биологического материала пергидролем и серной кислотой

Метод разрушения биологического материала пергидролем и серной кислотой в химико-токсикологическом анализе может быть использован при исследовании малых навесок объектов биологического происхождения, поступивших на исследование.

Выполнение минерализации. Исследуемый объект по возможности освобождают от воды выпариванием, измельчают и вносят в фарфоровую чашку, в которую небольшими порциями (при помешивании стеклянной палочкой) прибавляют пятикратное количество концентрированной серной

кислоты (плотность 1,86) и нагревают на водяной бане. При этом происходит обугливание исследуемого объекта с выделением оксида углерода (IV). После заметного уменьшения скорости выделения оксида углерода (IV) содержимое фарфоровой чашки количественно переносят в колбу Кьельдаля, которую устанавливают на асбестированную сетку. При слабом нагревании колбы в нее вносят небольшими порциями пергидроль. Прибавление новых небольших порций пергидроля производят до тех пор, пока жидкость не станет бесцветной или слегка желтоватой от наличия солей железа. После этого колбу с жидкостью охлаждают, а содержимое разбавляют десятикратным количеством воды.

Для удаления избытка пергидроля в колбу Кьельдаля небольшими порциями прибавляют насыщенный водный раствор сульфита натрия и кипятят в течение 5-10 мин. Вместо сульфита натрия для связывания избытка пергидроля можно прибавлять раствор сульфата гидразина. Минерализат, освобожденный от избытка пергидроля, используют для обнаружения «металлических ядов».

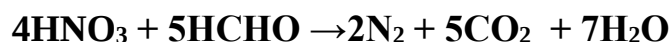
7. Денитрация

Денитрация - процесс освобождения минерализатов от азотной, азотистой, нитрозилсерной кислот и оксидов азота. На первых этапах применения метода разрушения органических веществ азотной и серной кислотами, для денитрации минерализатов применялся так называемый гидролизный метод. Этот метод основан на разбавлении минерализатов водой и на последующем нагревании полученных жидкостей. При нагревании минерализатов, разбавленных водой, улетучиваются азотная, азотистая кислоты и оксиды азота, а нитрозилсерная кислота при указанных условиях практически не улетучивается. Она постепенно разлагается водой (гидролизуется).

Азотистая кислота, образовавшаяся при разложении водой нитрозилсерной кислоты, улетучивается при нагревании. Для освобождения минерализатов от азотсодержащих кислот и оксидов азота (включая нитрозилсерную кислоту) с помощью этого метода требуется 15-17 ч рабочего времени.

Для денитрации минерализатов позднее были предложены *мочевина*, *сульфит натрия* и др. С помощью мочевины процесс денитрации минерализатов заканчивается за 3-5 мин (при 135- 145°C), а с помощью сульфита натрия – за 10-15 мин (при температуре выше 100°C).

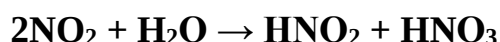
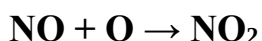
В 1952 г. Ф.В. Зайковский предложил метод денитрации минерализатов *формальдегидом*. При взаимодействии формальдегида с азотной кислотой, которая почти всегда находится в минерализате, выделяется азот:



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:



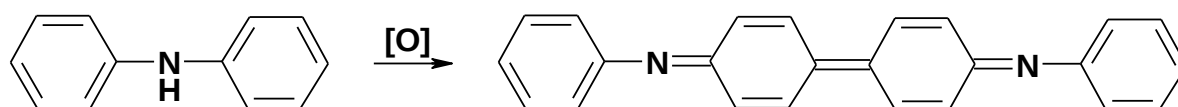
Образовавшиеся при этом азотная и азотистая кислоты реагируют с формальдегидом, как указано выше.

Нитрозилсерная кислота при нагревании с водой разлагается. Образовавшаяся при этом азотистая кислота реагирует с формальдегидом, как указано выше.

Для денитрации минерализатов, полученных при разрушении биологического материала азотной и серной кислотами, 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. Для этой цели требуется от нескольких капель до нескольких миллилитров формалина. Избыток формальдегида, не вступившего в реакцию с азотной и азотистой кислотами, удаляют нагреванием жидкости в течение 5-10 мин.

Для проверки полноты денитрации минерализатов проводят реакцию с раствором дифениламина (0,5 г дифениламина растворяют в 100 г концентрированной серной кислоты и прибавляют 20 мл дистиллированной воды). На предметное стекло или на фарфоровую пластинку с углублением наносят 1-2 капли минерализата, к которому прибавляют 1 каплю указанного

выше раствора дифениламина в серной кислоте. При наличии азотной, азотистой кислот или оксидов азота в минерализате появляется синяя окраска. Эта реакция основана на окислении дифениламина азотной кислотой и продуктами ее разложения. Вначале при окислении дифениламина образуется бесцветный дифенилбензидин, при окислении которого образуется соединение, имеющее синюю окраску:



Денитрация считается оконченной тогда, когда реакция минерализата с раствором дифениламина будет отрицательной. Если от прибавления раствора дифениламина к минерализату он окрашивается в синий цвет, то денитрацию проводят повторно.

Выполнение минерализации. В колбу Кьельдаля вместимостью 500-800 мл вносят 100 г измельченного биологического материала, прибавляют 75 мл смеси, состоящей из равных объемов концентрированных азотной и серной кислот и воды. Колбу с содержимым в вертикальном положении закрепляют в штативе так, чтобы дно ее находилось над асбестированной сеткой на расстоянии 1-2 см. Над колбой Кьельдаля в штативе закрепляют делительную воронку, в которой содержится концентрированная азотная кислота, разбавленная равным объемом воды. После этого начинают осторожно нагревать колбу. В течение 30-40 мин происходит деструкция биологического материала. При этом прозрачная жидкость в колбе приобретает желтую или бурю окраску. Затем колбу Кьельдаля с содержимым опускают на асбестированную сетку и усиливают нагревание. Для разрушения органических веществ, находящихся в колбе, из капельной воронки по каплям прибавляют концентрированную азотную кислоту, разбавленную равным объемом воды. Прибавление азотной кислоты регулируют так, чтобы из колбы не выделялись бурые пары оксидов азота. Минерализация считается законченной тогда, когда прозрачная жидкость (минерализат) при нагревании без добавления азотной кислоты перестанет темнеть, а над жидкостью будут выделяться белые пары серной кислоты.

Полученный минерализат охлаждают, прибавляют 10-15 мл дистиллированной воды и нагревают до 110-130°C, а затем осторожно по каплям (избегая избытка) прибавляют формалин. При этом отмечается обильное выделение бурых (иногда оранжевых) паров. После окончания

выделения этих паров жидкость еще нагревают 5-10 мин, а затем 1-2 капли охлажденной жидкости (минерализата) наносят на предметное стекло или на фарфоровую пластинку и прибавляют каплю раствора дифениламина в серной кислоте. Отрицательная реакция минерализата с дифениламином на азотную, азотистую кислоты, а также на оксиды азота указывает на окончание процесса денитрации. При положительной реакции минерализата с дифениламином денитрацию проводят повторно.

Минерализат, содержащий большинство катионов металлов, будет бесцветным. В минерализате могут быть катионы меди и хрома. В этом случае минерализат будет окрашен соответственно в синий или зеленый цвет. Если в биологическом материале содержались барий и свинец, то в минерализате будут осадки сульфатов этих металлов.

Метод минерализации биологического материала азотной и серной кислотами имеет ряд достоинств. Минерализация этим методом происходит быстрее, чем методом разрушения биологического материала хлоратом калия и соляной кислотой, а также некоторыми другими методами. При использовании метода минерализации биологического материала азотной и серной кислотами получают относительно небольшие объемы минерализатов. Это обстоятельство оказывает влияние на чувствительность методов обнаружения «металлических ядов» в минерализатах.

Однако этот метод непригоден для изолирования ртути из биологического материала, так как значительные количества ее улетучиваются при нагревании биологического материала с серной и азотной кислотами. Метод изолирования ртути из биологического материала описан ниже.