**Лабораторно-практическое занятие №1.**

**Тема: Химико-токсикологический анализ веществ, изолируемые методом минерализации.**

**Цель:** Провести пробоподготовку биологических объектов: минерализация серной и азотной кислотой, удаление окислителей из минерализата.

В настоящее время тема ядовитых металлов становится актуальным, так как их можно обнаружить в быту, в пищевых продуктах, сточных водах, в отходах, сельско-хозяйственной промышленности и т.д. Ядовитые металлы после попадания в организм оседают и вызывают различные заболевания: поражает внутрение органы (печень, почка, сердце), нарушает ЦНС, вызывают отравления и кожные заболевания. В связи с этим обнаружение ядовитых металлов из биологических жидкостей всегда остается актуальным.

В окружающей среде металлы распределяются естественным образом в соответствии с биогеохимическими циклами. Применение металов в промышленности и быту обусловливает их появление в воздухе, воде, почве, организме животных и растениях.

Дожди разрушают горные породы, обогащают или обедняют почвы тем или иными элементами, переносят их в океанические воды, где эти злементы концентрируются в донных осадках или переносятся с течениями в отдаленные регионы.

Обнаружение и определение металлических ядов при химико-токсикологических исследованиях неизбежно связанно с разрушением исследуемых объектов (минерализацией). Минерализация представляет собой окисление (сжигание) органических веществ, состовляющих объект исследования, и предпринимается для освобождения искомых ядовитых элементов из их комплексов с белками.

Из большого количества разнообразных методов «мокрого озоления» практическое значение приобрела минерализация с помошью различных окислителей и присутствии серной кислоты, особенно разрушения смесью серной и азотной кислотами, а также смесью серной, азотной и хлорной ксилотами.

Жидкости, полученная после минерализации в большенстве случаев содержит то или иное количество оксилителей и (окислов азота), мешающих дальнейшему проведению исследования. Дальнейший ход анализа требует обязательного удаления окислителя из минерализата. Исползуют динитрацию с помошью химических реагентов. В качестве химических реагентов, способствующих денитрации минирализата, применяются формальдегид, натрия сульфит, мочевина. Из указанных способов денитрации фармальдегидный способ является наиболее доступным и быстрым.

**Целовые задачи:**

1. Подготовка объекта к минирализации.
2. Минирализация обекта серной и азотной кислотами.
3. Минерализация объекта серной, азотной и хлорной кислотами.
4. Установление наличие окислителей в минирализате и их удаления одним из ниже указанных способов.
5. Удаление окислителей из минерализата формальдегидным способом.
6. Удаление окислителей из минерализата мочевинным способом.
7. Удаленгие окислителей из минерализата сульфитным способом.
8. Подготовка минерализата к исследованию.

Каждый студент получив отдельную задачу, представляющую затравленный несколькими катионами трупный материал, приступает к минерализации объекта, затем проводит денитрацию минерализата, разбавляют водов и оставляют до следующего занятия.

**Подготовка объекта к минирализации.**

После получения объкта исследования тщательный наружный осмотр, проверить рН среды объекта, измельчит его и подвергнуть дальнейшему исследованию. Количество объекта, которое берется для разрушения, зависит от общей массы объекта исследования, обстоятельства дела и других факторов. Когда указания отсутсвуют, то для исследования берут 100 г органа.

При малых количеествах объекта можно употреблять для минерализации также остатки после дистилляции с водяным паром. При этом избыток воды из объкта удаляют осторожным выпариванием на водяной бане.

Если объек консервирован этиловым спиртом, то его слабо подщелачивают 10% раствором натрия карбоната (для разложения хлоридов мышьяка и ртути и т.д.), помещают в фарфоровую чашку, спирт отгоняют на водяной бане при температуре не выше 500 °C.

Минерализация биообъекта смесью серной и азотной кислот.

Метод минерализации серной и азотной кислотами пригоден дляы анализа объектов на наличие подавляющего большинства катионов, имеющих токсикологическое значение.

Роль серной и азотной кислот заключается в окислении органических веществ. В начале минерализации серная кислота обладает низким окислительным потенцталом, но как водоотнимающее вещество, способствует повышению температуры кипения реакционной смеси и тем самым, повышает окислительное действие азотной кислоты.

На последующих стадиях минерализации серная кислота является органических веществ. Техника минерализации биологического материала смесью серной и азотной кислоты.

Измельчённый объект исследования помещают в колбу Кьельдаля емкостью 300-350 мл и заливают смесью, состоящей из равных объемов воды, концентрированных серной и азотной кислот из расчета 75 мл смеси на 100 г биологического материала. Затем колбу с объектом закрепляют в штативе таким образом, чтобы дно ее находилось на расстоянии 1-2 см от асбестовой сетки, и начинают осторожно (во избежание обугливания) нагревать. В процессе минерализации к содержимому колбы время от времени добавляют по каплям азотную кислоту, регулируя введения ее таким образом, чтобы она по возможности полно расходовалась на минерализацию.

Первая стадия минерализации заключается в разрушении форменных элементов и продолжается при условии нагревания при не очень жирном объекте исследования 30-40 минут об окончании первой стадии минерализации судят по отсутствию форменных элементов объекта (кусочков тканей, органов).

После разрушения форменных элементов колбу с объектом исследования опускают на асбестовую сетку и усиливаю нагревание. Постоянно добавляя азотную кислоту (1:1), продолжают минерализацию до тех пор, пока полученная бесцветная жидкость при нагревании в течение 30 минут без добавления азотной кислоты и выделении тяжелых белых паров не будет больше темнеть. В таком случае операцию минерализации можно считать законченной.

На минерализацию при нежирном объекте исследования обычно затрачивается 6-8 часов (при 100 г объекта).

Техника минерализации биологического материала смесью серной, азотной и хлорной кислот.

Измельченный биологический материал помещают в колбу Кьяльделя, заливают 125 мл концентрированной азотной кислоты и 35 мл 75% раствора хлорной кислоты. Колбу помещают на асбестовую сетку и осторожно нагревают на слабом пламени до разрушения форменных элементов.

При сильном вспенивании прекращают нагревание и добавляют по каплям (1-3 капли) изоамиловый спирт (пеногаситель).

По окончании декструкции нагревание временно прекращают, деструктант слегка охлаждают и к охлажденной жидкости по каплям добавляют 25 мл концентрированной серной кислоты, после чего нагревание усиливают и продолжают окисление при периодическом добавлении концентрированной азотной кислоты, до тех пор пока добавление очередной порции азотной кислоты не станет вызывать энергичного вскипания. В этом случае нагревание ослабляют и окисление заканчивают, добавляя еще некоторое время разбаленную азотную кислоту. Окончанием процесса минерализации считают одномоментное просветление и жидкости. По окончании окисления минерализат нагревают еще в течение 5-10 минут для удаления избытка хлорной кислоты. В конце минерализации проводят ксантопротеиновую реакцию на наиболее трудно окисляемые аминокислоты(фениаланин, тирозин, трептофан). Капли охлажденного до 50-70 °C минерализата, разбавленная 1-2 каплям дистиллированной воды, при добьавлении 25% раствора аммиака может окрашиваться лишь в слабо-желтый цвет.

На минерализацию 100 гр биологического материала затрачивают около 2 часов.

Дайте оценку обеим методам минерализации биообъекта и напишите химические уравнения, протекающие во время окисления органическиз веществ.

***Установление наличия окислителей в минерализате.***

После охлаждения минерализата 1-2 капли его смешивают с несколькими каплями дист.воды, к 1 капле этого раствора, помещенный в фарфоровую чашку, добавляют 1 каплю раствора дифениламина в концентрированной серной кислоте, в большинстве случаев при этом наблюдается появление синего окрашивания

**( Напишите уравнение реакции**).

Удаление окислителей из минерализата формальдегидным способом.

Охлажденный минерализат (при положительном результате реакции с дифенил амином) осторожно, небольшими порциями переносят и сткан емкостью 100 мл, в который предварительно налито 10-15 мл дист.воды. После перенесения стакан всего минерализата колбу опаласкают 10-15 мл дист воды, которую сливают в тот же стакан. Затем исследуемый минерализат нагревают до кипения и к нагретой жидкости осторожно по каплям (1-2 капли) добавляют формалин. Может наблюдаться выделение газообразных веществ, окрашенных в оранжевый цвет. После прекращения выделение газов жидкость нагревают в течение 1-2 минут и испытывают на наличие окислителей реакцией с дифениламином.

Если реакция положительная, вновь добавляют 1-2 капли формалина и нагревают до тех пор, пока реакция с дифениламином в серной кислоте не перестанет давать положительного результата.

**Написать уравнение реакции, отражающих сущность процесса денитрации формалином.**

По окончании денитрации жидкости продолжают нагревать несколько минут (около 5 мин) до удаления избытка формалина (по запаху). Для этой цели можно добавить так же 1-2 капли пергидроля и нагревать смесь. Удаление окислов азота из минерализата данным способом требует около несколько минут.

***Удаление окислителей из минерализата сульфидным способом.***

Охлажденный минерализат выливают в химический стакан с 50 мл воды, нагревают до 110 °C, смесь выносят при помешивании 10 % раствором натрия сульфита (обязательно проверять реакциями с дифениламином в серной кислоте на наличие окислителей).

На денитрацию таким способом требуется 5-15 минут и около 10 гр натрия сульфита. Избыток сернистого ангидрида удалить нагреванием и добавлением к жидкости 5-10 капель пергидроля.

**Написать уравнение реакции, протекающих при сульфитном методе денитрации.**

***Удаление окислителей из минерализата мочевиной.***

Минерализат нагревают до 135-145 °C и небольшими порциями при помещении выносят мочевину, избегая избытка ее.

На процесс денитрации с мочевиной требуется 5-10 минут и окло 3 гр мочевины. Непрореагировавшая мочевина при дальнейшем нагревании с жидкостью, содержащуй серную кислоту легко омылается с образованием углекислого газа и сульфата аммония. По окончании денитрации устанавливается, как написано выше.

**Написать уравнение реакции.**

**Вопросы для самоподготовки.**

1. Перечислите способы оказания помощи при отравлении металическими ядами.
2. Охарактеризуйте физические и физико- химические методы анализа, применяемые для идентификации металлических ядов.
3. Назовите источники и пути поступления металлических ядов в организм.
4. Опишите методы изолирования и концентрирования кислот и щелочей из биоматериала.
5. Дайте химико-токсикологическую характеристику едких щелочей и аммиака.
6. Приведите примеры веществ относящихся к металлическим ядам.
7. Укажите основные причины отравления металлическим ядам.
8. Исследование методом тонкослойной хроматографии.
9. Напишите структурную формулу металлических ядов.

**Домашняя задания: Механизмы токсичности металлов.**

**СРС:** Методы определение металлических ядов, применяемые в ХТА.