

Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Фармацевтичний факультет
Кафедра токсикологічної та аналітичної хімії

На правах рукопису
УДК 665.1: 615.9: 543.4

Магістерська робота

ТОКСИЧНІСТЬ ЦИНКУ ТА ВДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДИК ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРИ ХІМІКО- ТОКСИКОЛОГІЧНОМУ ДОСЛІДЖЕННІ

Виконала студентка 5 курсу
заочної форми навчання
спеціальності 226 «Фармація, промислова фармація»
Киричинська Анастасія-Марія Миронівна

Науковий керівник: к.фарм.н., доцент Галькевич І.Й.
Завідувач кафедри токсикологічної
та аналітичної хімії: к.фарм.н., доцент Галькевич І.Й.

Львів – 2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	2
Розділ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ТА ТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СПОЛУК СЕЛЕНУ І МЕТОДІВ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ В БІОЛОГІЧНИХ ПРОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	4
1.1 Біологічна роль цинку в організмі людини.....	4
1.2. Вплив нестачі та надлишку цинку на організм людини.....	5
1.3Токсикокінетичні особливості цинку	10
1.4. Джерела поступлення цинку в організм людини.....	12
1.5 Токсичні кількості цинку та симптоматика отруєнь.....	14
1.6 Кількісне визначення цинку в фармацевтичних препаратах.....	18
1.7 Визначення цинку в біологічних пробах.....	21
Розділ 2. ЕКСПРЕС-МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ ЦИНКУ В БІОЛОГІЧНИХ МАТРИЦЯХ.....	26
2.1 Опрацювання методики кількісного визначення цинку з пірокатехіновим фіолетовим.....	26
2.2. Визначення умов концентрування цинку із водних розчинів на клинотиліті.....	31
2.2.1 Вивчення залежності ступеня сорбції Zn^{2+} від рН розчину в статичних та динамічних умовах.....	33
2.2.2. Вивчення ступеня десорбції Zn^{2+} в динамічних умовах.....	34
2.3.Розробка умов виділення цинку із крові методом ТФЕ.....	36
2.4 Методика ізолювання цинку із сечі.....	37
2.5. Методика визначення цинку в тканині печінки.....	37
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42
Summary.....	50

ВСТУП

Актуальність. В усьому світі мільярди людей страждають на захворювання, викликані нестачею макро- та мікро-елементів. В даний час велика увага приділяється боротьбі з дефіцитом окремих мікроелементів в організмі, в першу чергу йоду, селену, цинку та заліза. Один із перелічених елементів, а саме цинк, відноситься до багатofункціонального мікроелементу, який в людському організмі відіграє значну роль, приймаючи участь у ряді фізіологічних процесів. Даний мікроелемент впливає на ріст і формування клітин, приймає участь у метаболізмі, від його кількісного вмісту залежать когнітивні, репродуктивні та імунні функції організму [11-14].

Паралельно з цим, неконтрольоване вживання препаратів цинку, як дорослими так і дітьми, стає причиною появи токсичних ефектів. Особливо часто ненавмисне вживання препаратів цинку спостерігається серед дітей до 5 років, що у середньому становить 43-45 % від усіх зафіксованих випадків отруєнь. Інгаляційне ураження сполуками цинку, такими як димові шашки, чи випари в процесі виробництва оцинкованих металічних виробів стає причиною гострого респіраторного дистрес-синдрому.

Ймовірність летальності при отруєннях цинком є низькою. Проте вживання сполук цинку з метою суїциду є небезпечним для життя, спостерігаються сильні токсичні ефекти, прогноз залежить від того, наскільки швидко пацієнт отримає лікування [51].

Для встановлення отруєнь цинком необхідно проводити кількісне визначення його концентрації в крові, плазмі, сечі та тканинах біологічного матеріалу. При цьому методики підготовки цих біологічних рідин чи тканин для аналізу полягають у їх мінералізації, яка є тривалим процесом (тривалість до 6 годин). Тому розробка швидких методик вилучення цинку із біологічного матеріалу є актуальною.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у розробці методик експрес-вилучення цинку із крові, сечі та тканини печінки застосовуючи твердо фазну екстракцію даного елемента із біологічних рідин та супернатанту біологічної

тканини, а також опрацюванні умов кількісного визначення цинку в елюатах спектрофотометричним методом.

Для досягнення поставленої мети в процесі виконання роботи необхідно було вирішити такі завдання:

- провести огляд літератури щодо біологічної ролі та токсичності цинку і особливостей методик діагностики отруєнь;
- розробити методику кількісного визначення цинку у розчинах методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру на основі реакції із пірокатехіновим фіолетовим;
- встановити залежність ступеня вилучення цинку сорбентом із водних розчинів від рН середовища;
- розробити умови підготовки проб біологічних матриць для хіміко-токсикологічного аналізу із застосуванням твердофазної екстракції;
- вибрати умови кількісного визначення цинку в елюатах методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру.

Методи дослідження: узагальнення даних літературних джерел щодо токсичності цинку, спектрофотометрія у видимій ділянці спектру, екстракція твердою фазою.

Практичне значення роботи. Опрацьовано умови експрес-вилучення цинку із цільної крові, сечі та супернатанту тканини печінки із застосуванням Н-клинотилоліту, які можна застосовувати в практиці токсикологічних відділень лікувальних установ та у судово-хімічних лабораторіях.

Апробація роботи. Результати роботи обговорювались на засіданні студентського наукового гуртка кафедри токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ ім. Данила Галицького, та впроваджені в навчальний процес.

Структура роботи. Загальний обсяг дипломної роботи становить 50 сторінок друкованого тексту. Дипломна робота складається із вступу, огляду джерел літератури, експериментальної частини, висновків і списку використаних джерел. Список використаних джерел нараховує 71 найменувань, з них 15 кирилицею та латиницею 56.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ТА ТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СПОЛУК ЦИНКУ ТА МЕТОДИК ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ У БІОЛОГІЧНИХ ПРОБАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Біологічна роль цинку в організмі людини

Цинк, залізо, молібден, ванадій, мідь, хром, кобальт, марганець, магній, селен та десятки інших хімічних елементів містяться в організмі людини в дуже малих кількостях 10^{-3} - 10^{-10} %. Їх надлишок чи нестача в організмі є першопричиною розвитку ряду патологій.

Цинк – це один із найнеобхідніших мікроелементів, який важливий для нормального функціонування організму. За кількісним вмістом в організмі він посідає друге місце, перше з яких займає залізо [43]. Цинк присутній у різних тканинах і органах. Загальний вміст Zn в організмі людини в середньому становить близько 2 г, з яких до 60 % в складі м'язів, близько 30 % – в складі кісткової тканини і близько 6 % – в шкірі [28].

Більше 2500 білків, близько 300 ферментів та ензимів містять цинк [20]. В організмі цинковмісні сполуки відповідають за регуляторну, структурну та каталітичну дію [36].

Іони цинку впливають на експресію генів, метаболізм ДНК, структуру хроматину, проліферацію клітин, апоптоз, імунітет, захист від оксидантів [23]. Паралельно цинк приймає участь і регулює передачу внутрішньо клітинних сигналів, є критично важливим для ефективної синаптичної передачі сигналу в центральній нервовій системі [52].

Цинк виступає кофактором великої групи ферментів, що приймають участь в білковому обміні, тому він необхідний для нормального протікання багатьох біохімічних процесів (у понад 200 хімічних реакціях, що регулюються ферментами).

Даний елемент є необхідним для синтезу білків, у тому числі колагену і для формування кісток.

Цинк приймає участь у поділі та диференціюванні клітин, сперматогенезі, формуванні Т клітинного імунітету, в продукуванні інсуліну підшлунковою залозою, регенерації шкіри, рості волосся та нігтів, секреції сальних залоз, біотрансформації алкоголю, кровотворенні, рано заживанні, сприяє всмоктуванню вітаміну А та Е, підтримує їх нормальний рівень у крові [41].

Зокрема в організмі людини нараховується більше 200 цинковмісних металопротеїнів, унікальність багатьох з яких зумовлена особливостями та можливими змінами електронної будови центрального атома. Цинк – компонент активних центрів РНК-полімераз, карбоангідрази, алкогольдегідрогенази, факторів транскрипції, ферментів – оксидоредуктаз, трансфераз, ліаз, гідролаз, ізомераз, цитозольної форми супероксид дисмутази. Цинк входить в структуру гормону виличкової залози тимоліну, міститься в інсуліні, гонадотропних та інших гормонах. Цинк карбоангідрази С, як електрофільні сполуки, приймають участь в утворенні іонів H^+ та OH^- із молекул води та каналізують реакцію утворення карбонатної кислоти в організмі.

Цинк регулює напрямок та швидкість багатьох реакцій біотрансформації, тому він отримав назву «головного неорганічного гормону» [3,7].

Широкий спектр фізіологічних функцій Zn-вмісних коферментів визначається хімічною природою цього елемента. Відомо, що Zn контролює метаболізм, ріст та розвиток кісток і, таким чином, є важливим елементом протягом усього життя. Він головним чином підтримує імунну та нервово-психічну функції, а також покращує загоєння ран.

1.2. Вплив нестачі та надлишку цинку на організм людини

Враховуючи те, що цинк достатньою мірою поширений у природі, узагальнені дані сучасної медицини свідчать, що одним з найпоширеніших дефіцитів мікроелементів у всьому світі – є дефіцит цинку [33].

Вперше про важливість цинку для розвитку та нормального функціонування живих організмів за результатами експериментальних досліджень на *Aspergillus niger* було опубліковано у роботі Raulin J. в 1869 році [58]. В подальших дослідженнях вивчався вплив цинку на розвиток рослин, гризунів та птахів. Зокрема, в 1930-х роках були опубліковані дані, щодо впливу цинку на нормальний ріст гризунів [53].

У 1961 було встановлено, що цинк є незамінним мікроелементом, оскільки такі захворювання, як важка анемія, затримки росту дітей (підліткова аліментарна карликовість), гіпогонадізм, захворювання шкіри та розумова відсталість зумовлювались дефіцитом цинку в їжі [32, 53]. Після цього фундаментального відкриття було описано багато симптомів, спричинених дефіцитом цинку, включаючи постійну діарею, алопецію, розлади смаку, імунну недостатність, дисфункції мозкової діяльності, порушення загоєння ран, втрату апетиту, хронічне запалення, захворювання печінки та нейропсихологічні зміни, такі як емоційна нестабільність, дратівливість і депресія [18, 33].

В даний час достаменно визнано, що цинк відіграє важливу роль в багатьох основних метаболічних процесах, необхідний для оптимального росту організму, імунокомпетентності та гостроти зору. Наводяться дані, які свідчать про те що з дефіцитом цинку пов'язують дитячу смертність (приблизно 116000 дитячих смертей щороку), в основному через зростання поширеності та тяжкості інфекційних захворювань [18, 67].

Знижений рівень концентрації цинку в організмі може бути наслідком надлишкового поступлення в організм міді, кадмію, свинцю, які виступають у ролі функціональних антагоністів цинку, особливо на фоні неповноцінного харчування (дефіциті білку), а також при хронічному зловживанні алкоголем.

Роль цинку при алкогольній інтоксикації зумовлена його участю в метаболізмі алкоголю, оскільки в складі молекули алкогольдегідрогенази міститься 4 атоми цинку.

На фоні дефіциту цинку спостерігається затримка статевого розвитку хлопчиків і втрата здатності запліднення яйцеклітин сперматозоїдами.

Функціональними антагоністами цинку виступають мідь, кадмій, свинець, особливо на фоні недостатньої кількості білку, що потрапляє з їжею. Підвищені кількості фітатів, фосфатів, надлишок кальцію, прийом кортикостероїдів, оральних контрацептивів, анаболітиків, антиметаболітів, діуретиків, алкоголю, імуносупресорів стають причиною нестачі цинку в організмі.

Вітамін А також відіграє роль синергісту цинку.

При дефіциті цинку спостерігається збільшення нагромадження кадмію, свинцю, заліза і міді в організмі. Надлишкова кількість цинку, який поступає ззовні, може знизити загальний вміст і засвоєння міді.

В таблиці 1.1. наведені причини, які зумовлюють нестачу цинку в організм та їх симптоми і прояви.

Таблиця 1.1

**Причини нестачі цинку в тканинах організму та симптоми
цинкдефіцитних станів**

Причини, що викликають нестачу цинку в організмі	Прояви дефіциту цинку в організмі
1	2
Післяопераційні стани, опіки, парентеральне харчування.	Роздратування, втомлюваність, втрата пам'яті, порушення сну, депресивні стани.
Надлишкова кількість естрогенів, кортикостероїдів, діуретиків та інших лікарських засобів.	Послаблення гостроти зору, втрата нюху, втрата смаку, виразки у ротовій порожнині.
Надлишкова кількість міді, кадмію, свинцю та ртуті, що потрапляє в організм.	Зменшення апетиту, діарея, зменшення маси тіла.
Зловживання алкоголем.	Схильність до алкоголізму.
Посилена втрата цинку (при вагітності, годуванні немовлят, в період загоювання ран і одужання після важких хвороб).	Алергічні захворювання, екзема, дерматит, псоріаз, трофічні виразки, вугрі, фурункули, погане заживання ран

<i>Продовження таблиці 1.1</i>	
1	2
Порушення всмоктування цинку в кишківнику (дисбактеріоз, ферментопатії та ін.)	Розшаровування пластинки нігтя та поява білих плям на ній.
Наявність кишкових паразитів.	Тьмянний колір волосся, сповільнення росту та випадіння волосся.
Псоріаз, себорея, підвищена пітливість.	Зменшення рівня інсуліну, ризик розвитку цукрового діабету
	Зменшення запліднюючої здатності сперматозоїдів, послаблення сексуальної активності, імпотенція у чоловіків.
	Підвищений ризик розвитку пухлинних захворювань та аденоми простати
	Передчасні пологи, народження ослаблених дітей, стерильність у жінок, затримка росту та статевого дозрівання дітей (особливо хлопчиків) [Terrin G]
	Знижений Т-клітинний імунітет, пониження опірності до інфекцій, часті та тривалі простудні захворювання.
	Анемія.
	Швидке старіння.

В таблиці 1.2 наведено узагальнені чинники, які приводять до надлишку цинку в організмі та властиві симптоми захворювання, викликані передозуванням цинку.

Таблиця 1.2.

Причини надлишкових кількостей цинку в організмі та їх симптоми

Причини надлишку цинку	Симптоми, викликані надлишком цинку
Надлишкове поступання (при контакті із сполуками цинку у виробничих умовах).	Розлади імунної системи, аутоімунні реакції.

<i>Продовження таблиці 1.2</i>	
1	2
Неконтрольоване використання препаратів із цинком, в тому числі мазей.	Порушення стану волосся, шкіри, нігтів.
Порушений обмін цинку в організмі.	Біль у шлунку, нудота.
	Зменшення кількості заліза, міді та кадмію у тканинах організму.
	Послаблення функції передміхурової та підшлункової залоз.
	Ослаблення функції печінки.

Значна зміна рівня концентрації будь-якого елемента в організмі супроводжується зміною рівня концентрації іншого елемента або декількох. Наприклад, при застосуванні солей цинку з органічними чи неорганічними кислотами, в яких цинк утворює іонні сполуки, приводить до пониження засвоєння міді та заліза, що пояснюється подібністю будови електронної оболонки у першому випадку чи близьким радіусом у другому. Цей фактор впливу ініціює системні хвороби з аутоімунними порушеннями типу васкулітів. Це викликано зниженням активності ферментів при нестачі міді, витіснення якої із лізилооксидази – мідьвмісного ферменту (протеїн лізин-6-оксидази), яка приймає участь в процесах зшивання колагенових волокон, і цей процес в свою чергу збільшує рихлість стінок судин та клітин сполучної тканини.

В процесах синтезу колагену приймає участь два залізовмісних ферменти (проколлагенпролін-4-діоксигеназа і проколлагенлізин-5-діоксигеназа). Штучно викликаний через антагонізм елементів дефіцит заліза при введенні іонної форми цинку посилює ефект індукованих васкулітів, а також може сприяти розвитку остеопорозу та порушенню енергетичного обміну в клітинах за рахунок пригнічення активності дихального ланцюга. При цьому порушення балансу міді та заліза призводить до порушень синтезу протеогліканів, які є основною речовиною міжклітинного матриксу, що супроводжується больовими артритом колінних, кульшових, ліктьових та плечових суглобів з можливим розвитком артрозів.

Введення препаратів цинку у формі комплексів з органічними лігандами, тобто у формі хелатної сполуки, не приводить до таких небажаних наслідків.

1.3 Токсикокінетичні особливості цинку

У тілі дорослої людини масою 70 кг міститься у середньому 2-3 г цинку. Приблизно із цієї кількості 60 % цинку входить до складу скелетних м'язів, до 30% - у складі кісткової тканини, до 5% цинку міститься в тканині печінки та шкірі, а решта 2-3% - в інших тканинах.

На сироватковий цинк припадає приблизно 0,1% цинку, з цієї кількості 80% сполучено з альбуміном, а до 20 % - утворює міцний зв'язок з α_2 -макроглобуліном. Невелика кількість цинку міститься в сироватці у вільному стані.

Цинк, який прийнято перорально в основному всмоктується в тонкому кишківнику. Всмоктуванню цинку сприяє металотіонеїн, який знаходиться у ворсинках ентероцитів . Після цього більша кількість цинку зв'язується з внутрішньоклітинним білком металотіонеїном, який регулює рівень концентрації багатьох інших металів, у тому числі міді. Цинк у плазмі крові здебільшого зв'язаний з альбуміном, невелика частина знаходиться у вільному стані.

При надлишку цинку в організмі виробляється більша кількість металотіонеїну, який зменшує концентрацію вільного цинку [60]. Проте паралельно при цьому зменшується і концентрація міді, яка характеризується високою спорідненістю до металотіоніну. Тим пояснюється те, що при високих концентраціях цинку спостерігається пониження рівня концентрації міді [42] .

Екскреція комплексу металотіонеїн-цинк певною мірою проходить із жовчю і калом.

В таблиці 1.3. наведено показники основних токсикокінетичних властивостей цинку.

Показники токсикокінетичних властивостей цинку

Параметр	Кількісний показник
Добова кількість, що потрапляє в організм з продуктами харчування	13 мг 16 мг – чоловіки 12 мг – жінки
Добове потрапляння з повітрям	0,01 мг
Резорбція із шлунково-кишкового тракту в кров	20-30 %
Добове виділення: – з сече – з калом – з потом – волоссям	0,5 мг 11 мг 0,8 мг (2-3 мг в країнах з гарячим кліматом) 0,03 мг
Період піввиведення ($T_{1/2}$)	245 днів
Зв'язування з білками плазми (Fb)	0,99
Середній вміст:	
– в організмі людини масою 70 кг	1,3-2,3 г (або 2-3 г)
– кістки	75-170 мг/кг (
– кров	4-8,6 мг/л
– плазма/сироватка	0,55-1,3 мг/л
– печінка	15-155 мг/кг
– м'язи	240 мг/кг
– сеча	0,25 мг/л
– волосся	50-400 мг/кг 124-320 мг/кг
– нігті	73-304 мг/кг
– емаль зубів	173-250 мг/кг
– дентин зубів	200-365 мг/кг
– грудне молоко	0,75-4 мг/л

Щоденно до 0,1 % цинку поповнюється з їжею. Всмоктування цинку в тонкому кишківнику зростає до 90 % при вживанні їжі з низьким вмістом цього елементу. Організм людини має здатність саморегулювати вміст цинку в організмі при 10-ти кратній зміні його споживання.

Надлишкові кількості цинку виділяються з калом та жовчю, сечею та із злущеними клітинами слизової оболонки кишківника.

1.4. Джерела поступлення цинку в організм людини

В народному господарстві цинк використовують для гальванізації заліза. Його також вводять до складу сплавів (латунь), входить до складу акумуляторних батарей, за допомогою сполук цинку проводять стабілізацію полімерів.

У природі цинк найбільшою мірою входить до складу сфарелиту, який є мінеральною сполукою з кристалами сульфід цинку.

В медичній практиці цинк та його сполуки найчастіше використовують :

- для радіоізотопної діагностики, у тому числі, як мітку, для цинковмісних ферментів;
- при визначенні згортання крові, застосовують цинку сульфат;
- оксид цинку входить в склад мазей для лікування дерматологічних захворювань

Останнім часом в дерматології, ендокринології, при лікуванні імунодефіцитних станів стали широко використовувати:

- цинку глюконат;
- цинку аспаргінат;
- цинку піколінат ;
- інші форми органічно зв'язаного **цинку** (хелат цинку – «Бісгліцинат», який за хімічною будовою є хелатним комплексом цинку з гліцином.

Станом на теперішній час на фармацевтичному ринку України переважають препарати цинку у формі мазей, розчинів для зовнішнього застосування, порошку

(цинку оксид, цинку сульфат, цинку хлорид), ін'єкційних розчинів (цинку сульфат), очних крапель (цинку сульфат 0,25%).

Оксиду цинку у сонцезахисних засобах виконує функцію УФ-фільтру, такі ж властивості проявляє і піритіон цинку [61].

Місцеве застосування сполук цинку пов'язане з загоєнням ран завдяки його протизапальним та антиоксидантним властивостям. Солі цинку також є ефективними при лікуванні ряду захворювань шкіри, таких як вульгарні вугри та виразки шкіри [63].

Встановлено, що при місцевому застосуванні 10 % розчину сульфату цинку у вигляді примочок (тричі на день протягом чотирьох тижнів) на 80 % зменшується кількість вірусних бородавок [65].

Єдиним на сьогоднішній день моно компонентним препаратом цинку сульфату для внутрішнього вживання – є таблетки «Цинктерал» виробництва АТ Кутнівського фармацевтичного заводу «Польфа» (Польща), який містить 45 мг елементарного цинку [14].

Враховуючи різноманітність сполук цинку як лікарських препаратів, цинк може потрапляти в організм різними шляхами: через шкіру, при місцевому застосуванні; перорально. Аномально високе поглинання цинку цими трьома шляхами може призвести до його токсичності. Також цинк потрапляє в організм шляхом інгаляції, в основному на підприємствах.

Процес всмоктування цинку шкірою є складною темою, оскільки різні фактори впливають на регуляцію гомеостазу цинку в шарах дерми. Фактори, що впливають на всмоктування цинку, включають рівень рН шкіри, тривалість і кількість нанесення цинку та його хімічний склад. Хоча поглинання цинку шкірою є визнаним фактом, точні механізми його дії залишаються незрозумілими.

Ряд авторів вивчали вплив на шкіру людей та тварин (мишей, кроликів, морських свинок) неорганічних сполук цинку: цинку оксиду, цинку хлориду, цинку ацетату, цинку сульфату. За результатами проведених досліджень встановлено, що цинку оксид не проявляє подразнюючу дію на шкіру людини, ацетат цинку

викликав помірне подразнення, в той же час цинку хлорид та цинку сульфат характеризувались високою частотою ознак подразнення шкіри [35; 48].

Хоча цинк є важливим мікроелементом, надмірне його споживання може призвести до передозування або токсичності. Зазвичай це відбувається при вживанні харчових добавок або кремів для приклеювання зубних протезів [39].

Допустимий верхній рівень споживання цинку визначається European Food Safety Authority (EFSA) (Європейським агенством з безпечності харчових продуктів).

Добова доза для дорослої людини (чоловіка або жінки) встановлена на рівні 25 мг на добу. За рекомендаціями FDA добова доза, необхідна для нормального функціонування усіх систем організму становить 40 мг цинку на добу [26, 34].

Якщо людина споживає вищі кількості цинку то існує ризик порушення гомеостазу міді [69]. У людей, які дотримуються вегетаріанської або веганської дієти, рівень цинку в сироватці крові буде нижчим, ніж у тих, хто не дотримується вегетаріанської дієти [47]. У рослинних продуктах містяться великі кількості фітатів, які в організмі людини перешкоджають засвоєнню цинку. При цьому фітати зв'язуються з цинком, утворюючи комплекси, які не можуть засвоюватися організмом.

При одночасному пероральному застосуванні цинку з хінолоновими антибіотиками або антибіотиками тетрациклінового ряду посилюється всмоктування цинку [25]. Якщо всмоктування цинку порушується, це є фактором послаблення функціональної здатності імунної системи, оскільки цинк має вирішальне значення для росту і функціонування імунних клітин [65].

1.5 Токсичні кількості цинку та симптоматика отруєнь

При визначенні токсичності металів та інших елементів необхідно враховувати унікальні та різноманітні фізичні і хімічні властивості даної групи токсикантів. Необхідно враховувати, що в організмі метали не піддаються деградації

природнім шляхом, що приводить до більш вираженого їх впливу на організм людини у порівнянні з токсичними речовинами органічного походження.

Здатність сполук металів іонізувати у водних розчинах впливає на абсорбцію, розподіл та виведення токсиканту. Існування елементів в об'єктах довкілля, рослинних та тваринних організмах в різних хімічних формах (елементна, іонна, ковалентна, координаційна) значною мірою впливає на їх хімічні і токсичні властивості.

Передозування, зловживання та неконтрольоване вживання препаратів цинку та використання солей та сполук цинку з метою суїциду стає причиною гострих чи хронічних отруєнь. Особливо часто отруєння препаратами цинку спостерігаються серед дітей або пацієнтів з психічними захворюваннями, які приймають у велику кількість харчових добавок або цинковмісних сумішей [57].

При підозрі на цинковий токсикоз життєво важливим є збір повного анамнезу харчування, професійної діяльності та життя, оскільки це може виявити приховані джерела впливу цинку на організм.

Розрізняють два основні типи токсичності цинку: *гострої і хронічної*.

Характеристика гострої токсичності, викликаной цинком.

Гостра токсичність цинку виникає внаслідок короткочасного прийому сполук цинку у великих дозах і переважно вона зумовлена вживанням великої кількості цинковмісних продуктів або добавок протягом короткого періоду часу.

Найчастіше гострі отруєння викликаються сульфатом цинку та концентрованим хлоридом цинку, і супроводжуються ефектами з боку шлунково-кишкового тракту, які характеризуються болем у животі, діареєю, нудотою, блюванням та гематемезисом, викликаних їдким впливом цих солей.

Основними клінічними симптомами гострої цинкової токсичності при пероральному прийомі є болі голови, нудота, блювання, яке іноді є кривавим (гематемезис), відчувається дискомфорт у животі, який супроводжується водянистою діареєю та дифузними болями у животі. У рідких випадках може

виникати метаболічний дисбаланс та спостерігаються важкі неврологічні симптоми з м'язовими судомами [38].

Найчастіше при гострих отруєннях спостерігаються лише шлунково-кишкові симптоми, що ускладнює постановку діагнозу, якщо в анамнезі відсутня інформація про контакт з цинком.

При гострих токсичних станах, викликаних цинком у рідких випадках можуть уражатись нирки та підшлункова залоза, може спостерігатись печінкова недостатність та гемодинамічна нестабільність [17].

Іноді при гострих отруєннях може виникати септичний шок, сильна шлунково-кишкова кровотеча та інші прояви, які є також типовими при різних видах отруєнь.

Історично оксид цинку або хлорид цинку використовували для виготовлення димових шашок, вводили до складу військових снарядів, авіабомб. Тому контакти із цими сполуками є масовими при проведенні військових навчань та воєнних дій [27; 71]. Таке отруєння супроводжується появою лихоманки. Вдихання диму цих сполук викликає обструкцію верхніх дихальних шляхів, ущільнення і набряк легень [22].

Інгаляційне ураження сполуками цинку, такими як газом димових шашок, вдихання парів цинку на робочих місцях де проводиться зварювання, латунне покриття та гаряче цинкування може призвести до гострого респіраторного дистрес-синдрому [49]. При цьому робітники вдихають аерозолі, що складаються з частинок і газів, які містять оксид або хлорид цинку, що є потенційно небесні для здоров'я [19].

Лихоманка від металевих парів або "цинкова лихоманка" від гострого вдихання супроводжується грипоподібними симптомами, такими як кашель, лихоманка, озноб, головний біль, нездужання, нудота та біль у м'язах [38]. Пацієнт може мати безсимптомні проміжки часу протягом декількох днів, коли він не працює, тому необхідний детальний професійний анамнез. В ряді випадків такий тип лихоманки може сприйматись медиком як інфекція верхніх дихальних шляхів, тому завдання лікаря полягає у врахуванні фактору професійного впливу при встановленні діагнозу [30].

Особливо це є актуальним в даних умовах, коли наші воїни на полях бою вдихають аерозолі внаслідок вибуху керованих бомб та інших вибухових речовин. У солдатів, які вдихали дим гекситу ($ZnCl_2$) під час військових дій (чи під час навчань) розвивався гострий респіраторний дистрес. Солдати перебували в критичному стані, оскільки в легенях накопичувався колаген. Деякі із них через три-чотири тижні після вдихання помирали в стаціонарних умовах через розвиток важкої дихальної недостатності [49].

Наслідки гострої токсичності цинку включають рецидивуючу задишку або запалення дихальних шляхів після інгаляційного впливу чи ураження шлунково-кишкового тракту зі зневодненням і потенційною шлунково-кишковою млявістю, анемією та запамороченням [51].

Особливості протікання хронічного отруєння цинком.

Хронічне отруєння цинком розвивається поступово з плином часу внаслідок тривалого впливу підвищених рівнів цинку. Зазвичай це відбувається в результаті регулярного прийому добавок, що містять цинк, або тривалого впливу цинкового пилу чи парів на роботі.

Хронічне надходження цинку в організм може проявлятися симптомами, пов'язаними з дефіцитом міді, яке індуковане цинком, включаючи порушення імунної функції, зниження рівня ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) і підвищення рівня ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) [24].

Хронічну токсичність цинку слід розглядати, коли залізодефіцитна анемія не реагує на препарати заліза. Більш поширеними причинами анемії є втрата крові, дієта з дефіцитом заліза та патології кісткового мозку.

Сидеробластичний мієлодиспластичний синдром, який не піддається традиційній терапії, може бути спричинений дефіцитом міді внаслідок хронічної токсичності цинку. При хронічній токсичності, викликаній цинком, уражається кістковий мозок та виникає полінейропатія через супутній дефіцит міді. Такий синдром отримав назву "swayback". При цьому спостерігається повільне прогресування нейропатії та анемії зі збільшенням втоми, спастичність, порушення

ходи та сенсорна атаксія. Симптоми синдрому розгойдування пов'язані з накладеним дефіцитом міді. Додатки міді та нормалізація споживання цинку усувають гематологічні порушення протягом декількох тижнів, хоча неврологічний дефіцит залишається, незважаючи на терапію [16.]

Токсичність цинку стає причиною погіршення метаболізму міді результатом чого є анемія.

Надмірне споживання цинку протягом тривалого періоду збільшує ризик раку простати та смертності від раку простати[31]. Слід враховувати, що хронічне та надмірне використання кремів для фіксації зубних протезів також може призвести до цинк-індукованого дефіциту міді та неврологічних симптомів [24].

Токсична доза цинку для людини при хронічному поступленні становить 150-600 мг, летальна – 6 г.

1.6 Кількісне визначення цинку в фармацевтичних препаратах

Спектрофотометричні методи

Хоча спектрофотометричні методи, як аналітичні інструментальні методи для аналізу мікроелементів у різних об'єктах, здаються застарілими, вони все ще не втратили своєї актуальності і мають низку переваг над іншими сучасними методами дослідження. Це викликано їх простотою, швидкістю виконання, низькою вартістю як самого аналізу, так і обслуговування приладів, портативністю спектрометрів тощо.

Якщо умови експерименту вимагають суворого контролю, тоді розробляються висококонкурентні методи із застосуванням сучасного обладнання. Проте валідація методів спектрального аналізу демонструє якість та можливості його застосування з різними цілями.

Ряд методик для контролю кількісного вмісту цинку у фармацевтичних препаратах ґрунтується на використанні спектрофотометричних методик. В основному це атомно-адсорбційна спектрофотометрія чи спектрофотометрія у видимій ділянці [7].

Одна і таких методик, яка описана в джерелах літератури, базується на утворенні внутрішньо-комплексної сполуки цинку із 8-оксихіноліном. При цьому даний комплекс характеризується спектром поглинання в інтервалі довжин хвиль 350-450 нм з вираженим максимумом поглинання при 384 нм, тоді як максимум поглинання чистого 8-оксихіноліну знаходиться при 316 нм. Колективом авторів вивчено залежність світлопоглинання утвореного комплексу від природи розчинника, встановлено залежність значень оптичних густин від рН розчину. Встановлено, що при спектрофотометричному визначенні цинку у формі 8-оксихіноліатного комплексу лінійність градувального графіку даної внутрішньо-комплексної сполуки спостерігалась у межах концентрацій 1 - 5 мкг/мл (в перерахунку на цинк), а при визначенні цинку у складі цього комплексу методом атомно-адсорбційної спектрометрії від 0,1 до 1,5 мкг/мл [46].

Для кількісного визначення цинку в дієтичних добавках запропоновано умови, які ґрунтуються на реакціях утворення комплексів цинку із ксиленоловим оранжевим та цетилпіридинію хлоридом в ацетатному буфері при рН = 5,5. Спектр утвореного комплексу характеризується максимумом поглинання при 560 нм. Лінійність градувального графіку знаходилась в межах концентрацій 0,5-1,5 мкг/мл (при $r=0,9998$). Авторським колективом встановлено, що при спектрофотометричному визначенні у видимій ділянці спектру та паралельному визначенні методом атомно-адсорбційної спектрофотометрії прецизійність методики становила 1,57 % та 1,77 % відповідно. Точність визначень була у межах 98,29-100,55 %, в результаті чого зроблено висновок, що дану методику можна рекомендувати як фармакопейну для кількісного визначення цинку у твердих лікарських формах [59].

Nagarjunareddy Дю із співав. [45] розроблено методику спектрофотометричного визначення цинку у пальмовому листі, плодах перцю та пробах молока, а також у фармацевтичних препаратах, що базується на вимірюванні світлопоглинання комплексу цинку із 2-бензоїлпіридинтіосемікарбазоном. Цей реактив отримували в лабораторних умовах шляхом нагрівання 2-бензоїлпіридину із тіосемікарбазоном в присутності оцтової кислоти та етанолу. Даний реагент із

цинком при $pH = 6$ утворює комплекс жовтого кольору, оптичну густину якого вимірювали при 430 нм. Лінійність градувального графіку спостерігалась в межах 0,26-2,6 мкг/мл. Для вилучення цинку із рослинного матеріалу чи молока проводили озолування проби з наступним прокалюванням у муфельній печі при 550 °С. Із золи вимивали цинк розчином хлоридної кислоти.

Mohammed A.F у співав. [44] запропонували спектрофотометричний метод, що ґрунтується на реакції цинку із новосинтезованим реагентом під назвою [4,5-дифеніл-2-((1E)-(4-(1-(2-фенілгідразоно)етил)феніл)діазеніл-4Н-імідазол)]. Цими авторами досліджено ІЧ-спектр утвореного комплексу, а також знято спектр поглинання у видимій ділянці, який характеризується максимумом поглинання при 520 нм. Градувальний графік для спектрофотометричного визначення цього забарвленого комплексу побудовано в межах концентрацій цинку 0,5 - 27 мкг/мл.

Pinto J.J. із співавт. [50] описали чутливий метод спектрофотометричного кількісного визначення цинку в природних водах (в мкг/л). Він базується на реакції іонів $Zn(II)$ з ди-2-піридилкетонбензоїлгідразоном (dPKBH) у слабкокислому середовищі (pH 6,4) у середовищі 15 % етанолу. Методом ізомолярних серій встановлено, що цинк з реактивом реагує у співвідношенні 1:2, а спектр жовтого комплексу характеризується максимумом поглинання при $\lambda = 370$ нм. Оптична густина забарвленого розчину підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в діапазоні концентрацій цинку 6,3 - 3000 мкг/л.

Також спектрофотометричному визначенню цинку у фармацевтичних препаратах присвячена робота Gaubeur I. із співав. [29]. У цій роботі іони цинку (II) вводили в реакцію із ди-2-піридилкетон саліцилоїлгідразоном. Встановлено, що комплекс утворюється при pH 4,5, а сама реакція протікає кількісно у 50 % розчині етанолу. Продукт реакції забарвлений у жовтий колір характеризується максимумом поглинання при $\lambda = 376$ нм. При цій довжині хвилі молярний показник поглинання утвореного комплексу становить $4,82 \times 10^4$. Метод було застосовано для спектрофотометричного визначення цинку у фармацевтичних препаратах, і за отриманими результатами автори зробили висновок, що вони співставні із результатами, отриманими при визначенні цинку методом ААС.

1.7 Визначення цинку в біологічних пробах

Цинк (Zn) є необхідним кофактором у дії понад 200 ферментів, тому знання рівня його вмісту у біологічних тканинах має велике значення при дослідженні метаболізму та захворювань. Нещодавно було підраховано, що до 2 мільярдів людей у світі мають дефіцит Zn, що викликає різноманітні клінічні симптоми, включаючи затримку росту, імунну дисфункцію та когнітивні розлади [54]. Тому контролюють вміст цинку в сечі, плазмі, цільній крові та волоссі. Додатково проводять визначення вмісту цинку в слині.

Переважно для кількісного визначення пропонуються методики атомно-адсорбційної спектрофотометрії (ААС), які дозволяють вимірювати поглинання оптичного випромінювання (світла) вільними атомами в газоподібному стані. Атоми елемента, які знаходяться в основному стані у вигляді розчину розпилюють у полум'ї або графітовій печі. Залежно від поглинання вибраного довжини хвилі елемента, оцінюється його концентрація.

Паралельно із ААС для кількісного визначення іонів металів пропонується застосовувати рентгено-флуоресцентний аналіз (XRF). Даний метод полягає у випромінюванні інтенсивності характерних "вторинних" (або флуоресцентних) рентгенівських променів з матеріалу, який був збуджений бомбардуванням високоенергетичними рентгенівськими або γ -променями.

Метод є швидким, точним, неруйнівним і базується на вимірюванні рентгенівського випромінювання, випромінюваного елементами в зразку при опроміненні рентгенівськими променями з більш високою енергією. Енергетичні рівні випромінюваного рентгенівського випромінювання характерні для елементного складу зразків.

Stevens B.J. із співавт. [66] описали результати досліджень щодо ААС визначення цинку в плазмі. Дані автори наводять результати експериментальних досліджень, в яких показують, що введення до плазми динатрію едетату (комплексн III, або трилон Б) сприяє вивільненню цинку із зв'язків із білковими речовинами плазми в результаті чого покращуються результати його кількісного визначення у

цій біологічній рідині. При цьому цинк із трилоном Б утворює міцний хелатний комплекс, що дозволяє визначати цинк в присутності інших мікроелементів плазми.

Treska E. із співавторів [68] наводять результати порівняльної оцінки кількісного визначення цинку у плазмі крові вагітних жінок двома методиками ААС та XRF. Авторами встановлено, що серед 100 вагітних жінок, які приймали участь в експериментальних дослідженнях дефіцит цинку спостерігався у 65 осіб.

Описано спосіб кількісного визначення слідових кількостей цинку в сечі [64]. Для вилучення цинку з сечі використано процедуру мікроекстракції. Для цього до 10 мл сечі вносили 2 мл 1-(2-піридилазо)-2-нафтолу (ПАН), який виступав у ролі ліганду, додавали 90 мкл 1-додеканола. Для протікання реакції між цинком та ПАН створювали рН 5,5. Мікроекстракцію проводили обробкою проби УЗ (20 хв) при температурі 35 °С. Після цього процесу пробу центрифугували до утворення емульсії і пробу заморожували. Органічну фазу, яка являла собою тверду плівку розчиняли в етанолі і даний розчин аналізували методом ААС.

Визначення цинку в біологічних тканинах

Цинк можна виявити у всіх тканинах організму. Найвищі кількості цинку є у гіпофізі, простаті, підшлунковій залозі, спермі, шкірі, волоссі, м'язовій тканині, клітинах крові.

Оцінка вмісту цинку в організмі проводять за результатами досліджень волосся, сироватки та цільної крові [57]. Паралельно визначають активність ферментів карбоангідази, сорбітдегідрогенази, лактатдегідрогенази та лужної фосфатази.

У статті Lech T із співавторів. [40] представлено результати кількісного визначення концентрації цинку в тканинах і рідинах організму людей, які проводились протягом 13 років (з 1995 по 2005 рік). Вміст цинку визначали в органах трупів людей віком від 14 до 80 років, які не були отруєні сполуками цинку. Кількість цинку визначали методом полум'яної атомно-абсорбційної спектрофотометрії. При цьому було встановлено рівень концентрації цинку в тканинах органів та біологічних рідин, які наведені в таблиці 1.3.

Розподіл цинку в посмертних органах та біологічних рідинах людини
(за даними Lech T із співав.[40])

Орган	Діапазон концентрацій, мкг/г	Біологічна рідина	Діапазон концентрацій, мкг/мл
мозок	7,99-13,8 (n = 48);	кров	4,02-8,68 (n = 50)
шлунок	8,00-22,5 (n = 71)	сеча	0,39-1,00 (n = 5)
кишківник	8,36-28,1 (n = 35)	жовч	3,20-7,09 (n = 9)
печінка	16,0-78. 8 (n = 109)		
нирки	16,4-60,9 (n = 93)		
легені	6,13-18,7 (n = 26)		
селезінка	11,4-18,3 (n = 5)		
серце	22,5-31,8 (n = 5)		

Результати даних досліджень автори рекомендують використовувати при інтерпретації результатів, отриманих у випадках діагностики хронічних і гострих отруєнь сполуками цинку, тобто в клінічній і судово-медичній токсикології.

Описано методику кількісного визначення цинку у білковій фракції методом рідинної хроматографії у м'ясі свинини, яку купували у місцевого м'ясника (Потсдам, Німеччина) на наступний день після забою і гомогенізували за допомогою ручного міксера (Braun, Швальбах, Німеччина). 32 г отриманого м'ясного гомогенату переносили в склянку і розводили 40 мл фосфатного буфера (10 ммоль/л Na_2HPO_4 , 1,8 ммоль/л NaH_2PO_4 , 0,9 % NaCl , 0,02 % NaN_3 , всі придбані у Carl Roth, Карлсруе, Німеччина) при pH 7,4 та 4 °C. Білки відокремлювали на льодяній бані з використанням Ultra Turrax при 12 000 об/хв протягом 1 хв. Детекцію проводили УФ-спектрофотометрично при 254 нм . Цинковмісні білки виписувались хроматографічними піками з часом втримування від 11 до 45 хв. На хроматограмах було виявлено три білкові піки високої інтенсивності, а також п'ять піків меншої

інтенсивності. Також було проведено флуоресцентне детектування цинквмісних білків при $\lambda_{ex/em} = 420/590$ нм. При цьому флуоресціювали піки в широкому інтервалі. Всього було виявлено п'ять флуоресціюючих піків, чотири з яких характеризувались часом утримування в діапазоні 11-45 хв [37].

Посмертне тестування на вміст металів має вирішальне значення в судово-медичній токсикології для визначення того, чи спричинив вплив металів смерть людини. Однак сучасні референтні діапазони концентрацій металів, що базуються переважно на живих людях, не враховують посмертні фізіологічні зміни. Описане дослідження заповнює цю прогалину, аналізуючи рівні цинку та заліза в крові після смерті протягом різних посмертних інтервалів (PMI) за допомогою оптичної емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (ICP-OES). Було проаналізовано 50 зразків, які виявили значне збільшення концентрації металів з плином часу : рівень цинку збільшився з 181 мкг/л до 24 935 мкг/л, а рівень заліза - з 155 мкг/л до 11 421 мкг/л протягом 40-місячного зберігання трупних органів. Ці зміни автори пояснюють перерозподілом металів з тканин у кров і процесами розпаду. Дослідження пропонує референтні діапазони, специфічні для посмертних випадків, підкреслюючи необхідність для судово-медичних патологоанатомів і токсикологів враховувати посмертні інтервали у своїх оцінках, щоб уникнути неправильної інтерпретації і неточного визначення причини смерті. Це дослідження підкреслює необхідність оновлення референтних діапазонів для посмертного аналізу, що в кінцевому підсумку підвищить точність судово-токсикологічних звітів і сприятиме більш надійному визначенню причини смерті. Дослідження включало збір 50 посмертних зразків цільної крові від осіб без фізіологічних симптомів інтоксикації металами. Ці зразки були взяті зі стегнової вени - звичайного місця для посмертного збору крові через її відносну ізоляцію від безпосередніх посмертних змін, таких як гемоліз і забруднення з прилеглих тканин. Час, що минув з моменту смерті (час зберігання), коливався від кількох годин до кількох тижнів, забезпечуючи широкий спектр для аналізу впливу посмертного інтервалу (ПІ) на концентрації металів. Кожен зразок крові ретельно зберігали в стерильних, безметалевих контейнерах, щоб уникнути забруднення. Потім зразки зберігали в

холодильнику при постійній температурі 4 °С до аналізу. Перед аналізом зразки доводили до кімнатної температури та гомогенізували для забезпечення однорідності. Для аналізу зразки готували шляхом розведення 500 мкл крові 4,5 мл 7% v/v азотної кислоти у воді Milli-Q. Після додавання азотної кислоти кров центрифугували при 10 000 об/хв протягом п'яти хвилин при кімнатній температурі для видалення ліпідних і білкових осадів. СР-OES аналіз проводили за допомогою приладу ICPE-9820 (Shimadzu Italy, Мілан, Італія). В оптимізованій установці потужність радіочастоти була встановлена на рівні 1,20 кВт, потік аргону - 10,00 л/хв, допоміжного газу - 0,60 л/хв, а потік газу-носія був відрегульований до 0,70 л/хв. Час експозиції для кожного зразка був зафіксований на рівні 30 с. Аксиальна конфігурація перегляду була використана через її вищу чутливість, що особливо важливо для виявлення і кількісного визначення слідових кількостей цинку, особливо в присутності заліза [21] .

Розділ 2

ЕКСПРЕС-МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ ЦИНКУ В БІОЛОГІЧНИХ МАТРИЦЯХ

2.1 Опрацювання методики кількісного визначення цинку з пірокатехіновим фіолетовим

Пірокатехіновий фіолетовий це індикатор, який за своєю природою можна віднести до чотирьохосновних кислот органічної природи із загальною формулою H_4R , яка в кислому середовищі утворює біполярний іон $^+H_4R^-$.

Встановлено, що спектри поглинання пірокатехінового фіолетового у видимій ділянці мають різне забарвлення, яке залежить від рН середовища.

Зокрема у сильно-кислому середовищі пірокатехіновий фіолетовий має червоно-фіолетове забарвлення, з максимумом поглинання при 580 нм. У кислому середовища (рН $\approx$ 2-6) індикатор характеризується жовтим забарвленням, з максимумом поглинання 430 нм, викликаним іонною формою H_3R^- . У лужному середовищі (рН $\approx$ 7-10) переважає H_2R^{2-} іонна форма індикатору фіолетового кольору, з максимумом поглинання 620 нм. У сильно-лужному середовищі (рН $>$ 10) існують HR^{3-} та R^{4-} іонні форми індикатору, які мають синій колір з максимумом поглинання 630 нм.

Зазначені іонні форми даного індикатору при різному значенні рН середовища наведені на рис.2.1.

Вивчивши залежність реакції взаємодії цинку з пірокатехіновим фіолетовим, ми встановили, що у лужному середовищі (рН 8) утворюється внутрішньо комплексна сполука цинку синього кольору. Проте забарвлення пірокатехінового фіолетового при цьому значенні рН має фіолетове забарвлення, яке перешкоджає вимірюванню оптичної густини при 620 нм .

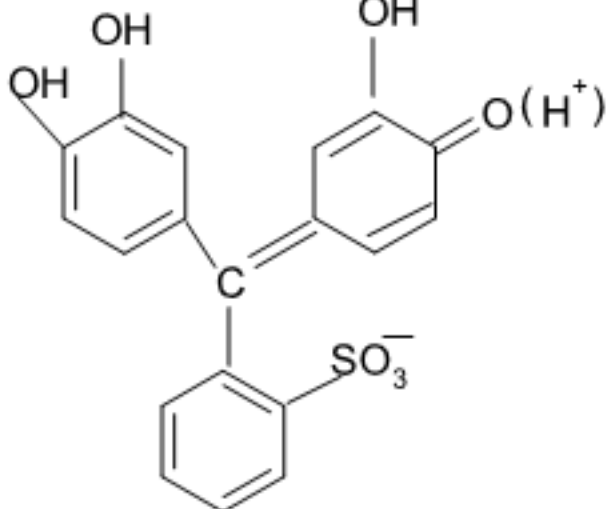
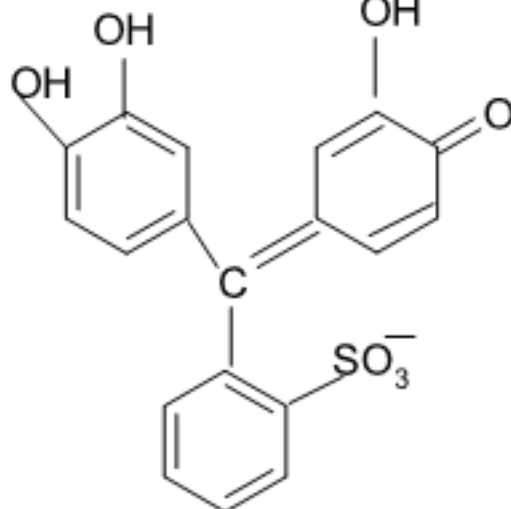
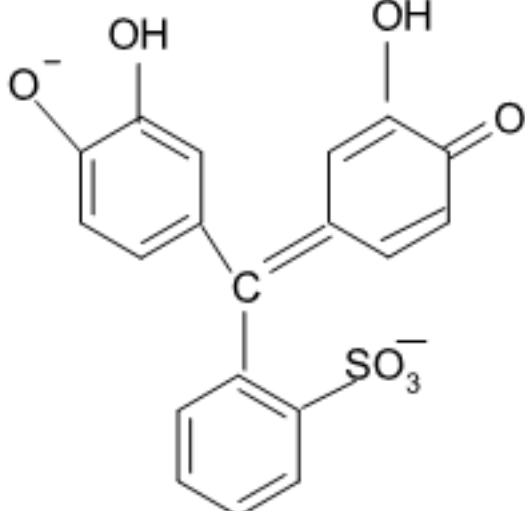
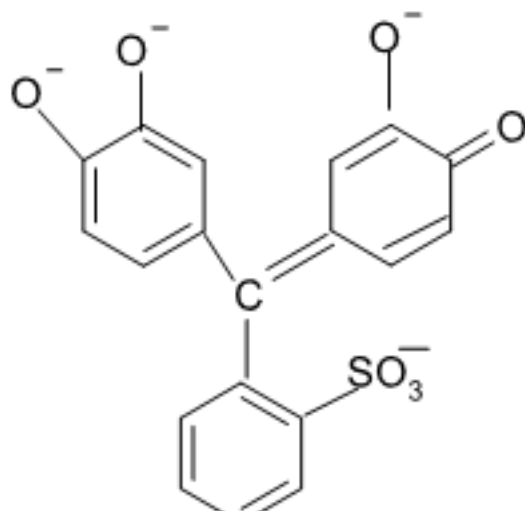
 ${}^+\text{H}_4\text{R}^+$	 H_3R^+ (pH 2-6)
 H_2R^{2-} (pH 7-10)	 $\text{HR}^{3-}, \text{R}^{4-}$ pH>10

Рис.2.1 Іонні форми пірокатехінового фіолетового при різних рН.

Тому нами використана модифікація індикатору. Для цього до складу індикатору вносили борну кислоту, яка реагуючи з пірокатехіновим фіолетовим утворює комплекс, який забарвлений в червоний колір. Червоне забарвлення зникає лише при рН >9.

Виготовлення розчину пірокатехінового фіолетового.

Готували 0,1 % водний розчин борної кислоти, для чого 0,1000 г борної кислоти розчиняли в 100 мл води.

Готували 0,1 % водний розчин пірокатехінового фіолетового, для цього наважку 0,1000 г пірокатехінового фіолетового переносили у мірну колбу місткістю 100 мл та розчиняли у 50 мл води. До отриманого розчину пірокатехінового фіолетового вносили 50 мл 0,1 % розчину борної кислоти.

Даний розчин використовували як реактив для кількісного визначення цинку методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру.

Виготовлення стандартного розчину цинку та його робочих розчинів.

Для виготовлення стандартного розчину цинку застосовували кристалогідрат цинку сульфату кваліфікації х.ч. ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Із цієї солі готували стандартний водний розчин, із концентрацією іонів цинку 1 мг/мл. Для цього на аналітичних вагах зважували 0,4399 г гептагідрату цинку сульфату, наважку кількісно переносили у мірну колбу місткістю 100 мл та розводили водою до позначки (розчин А, концентрація іонів Zn^{2+} 1 мг/мл).

5,0 мл стандартного розчину А переносили у мірну колбу місткістю 50 мл та доводили об'єм розчину водою до позначки. В 1 мл цього розчину концентрація іонів Zn^{2+} становила 100 мкг/мл (розчин В).

Із розчину В готували розчин С, в якому концентрація іонів Zn^{2+} становила 10 мкг/мл. Для цього 5,0 мл розчину В переносили у мірну колбу місткістю 50 мл та доводили об'єм розчину водою до позначки.

Виготовлення розчину буферної суміші з рН 7,8. На аналітичних вагах зважували 12,367 г борної кислоти (H_3BO_3). Наважку кількісно переносили у мірну колбу місткістю 1000 мл, розчиняли в невеликому об'ємі води і до отриманого розчину вносили 100 мл 1 М натрію гідроксиду. Об'єм розчину доводили водою до позначки.

В мірну колбу місткістю 200 мл вносили 108 мл отриманого розчину та доводили 0,1 М розчином хлоридної кислоти до позначки. рН розчину контролювали за допомогою рН метра. При необхідності доводили рН до 7,8 , додаючи відповідний реагент.

Побудова градуювального графіку для кількісного визначення цинку методом спектрофотометрії у видимій ділянці спектру.

У мірні колби місткістю 25 мл вносили по 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 0,80 та 1,0 мл водного розчину, із концентрацією іонів Zn^{2+} 10 мкг в 1 мл розчину (розчин С). Після цього в кожну із колб вносили по 5 мл боратного буферного розчину з рН =

7,8 та по 1 мл 0,1 % розчину пірокатехінового фіолетового у суміші з 0,1 % розчином борної кислоти. Розчин забарвлювався у синьо-фіолетовий колір.

Паралельно готували контрольну пробу, яка складалась із 1 мл розчину пірокатехінового фіолетового, 5 мл буферу та 19 мл води.

Оптичну густину, забарвленого у синьо-фіолетовий колір розчинів, вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвиля 620 нм, відносно контролю, який мав жовтий колір.

Градувальний графік будували за результатами п'яти паралельних вимірювань.

У таблиці 2.1 наведено значення оптичних густин комплексів ZnH_2R , залежно від концентрації цинку.

Таблиця 2.1

Залежність оптичної густини розчинів від кількісного вмісту Zn^{2+}

Взято Zn^{2+}		Виміряне значення оптичної густини (A)					A _{сер.}
мл	мкг	A ₁	A ₂	A ₃	A ₂₄	A ₅	
0,05	0,5	0,065	0,060	0,064	0,060	0,065	0,063
0,10	1,0	0,130	0,125	0,127	0,128	0,125	0,127
0,20	2,0	0,255	0,26	0,255	0,26	0,25	0,256
0,50	5,0	0,640	0,637	0,645	0,650	0,640	0,642
0,80	8,0	1,024	1,030	1,020	1,025	1,025	1,025
1,0	10,0	1,300	1,285	1,298	1,300	1,285	1,294

За отриманими значеннями оптичної густини будували градувальний графік, який наведено на рис. 2.2, та користуючись методом найменших квадратів розраховували рівняння, яким описується прямолінійна залежність відповідності світлопоглинання закону Бугера-Ламберта-Бера.

Рівняння прямої градувального графіку виражається залежністю :

$$Y=7,741X + 0,021,$$

де: Y – вміст цинку у пробі, мкг;

X – значення оптичної густини.

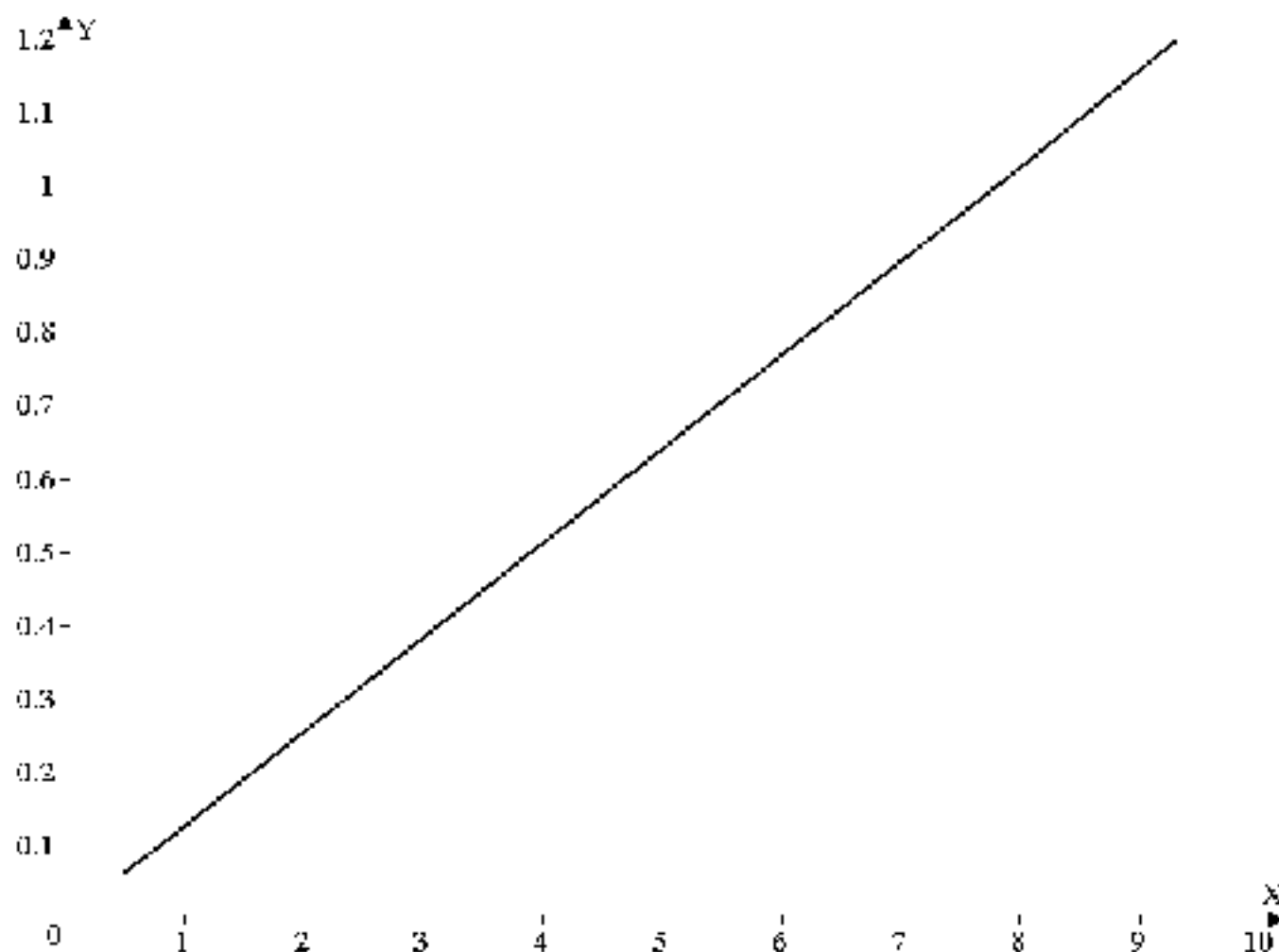


Рис. 2.2 Градувальний графік для кількісного визначення цинку за реакцією із пірокатехіновим фіолетовим

Представлені в таблиці 2.1 та на рис. 2.2 дані, свідчать, що світлопоглинання розчинів комплексу цинку із пірокатехіновим фіолетовим підпорядковується закону світлопоглинання від 0,5 до 10 мкг іонів Zn^{2+} у 25 мл кінцевого об'єму.

Визначення концентрації цинку в розчинах методом спектрофотометрії.

Користуючись градувальним графіком чи рівнянням прямої розраховували вміст цинку у розчинах. Для цього в мірні колби місткістю 25 мл вносили по 1 мл розчинів цинку з різною концентрацією 0,5 мкг/мл; 2 мкг/мл; 4 мкг/мл; 6 мкг/мл; та 9 мкг/мл. Після цього в кожену із колб вносили по 5 мл боратного буферного розчину з $pH = 7,8$ та по 1 мл 0,1 % розчину пірокатехінового фіолетового у суміші з 0,1 % розчином борної кислоти. Об'єм розчинів доводили водою до 25 мл та вимірювали значення оптичних густин при 620 нм (товщина шару рідини в кюветі 1 см).

За значенням оптичної густини розраховували вміст цинку у внесеній пробі.
Результати проведених експериментальних досліджень наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

**Кількісне визначення Zn^{2+} у розчинах методом спектрофотометрії у
видимій ділянці спектру ($n=5$)**

Внесено Zn^{2+} , мкг	Середнє значення оптичної густини (A)	Визначено Zn^{2+}		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
0,5	0,063	0,51	102,0	$\bar{X} = 100,52$
2,0	0,253	1,98	99,0	$S = 1,08$
4,0	0,518	4,03	100,8	$S_{\bar{x}} = 0,48$
6,0	0,774	6,01	100,2	$\Delta x = 1,35$
9,0	1,166	9,05	100,6	$\varepsilon = 1,34 \%$

Наведені у таблиці 2.2 дані свідчать, що при спектрофотометричному визначенні цинку у розчинах за реакцією утворення комплексу із пірокатехіновим фіолетовим відносна похибка визначення не перевищує 1,34 %.

2.2. Визначення умов концентрування цинку із водних розчинів на клиноптилоліті

Останніми роками техніка твердофазної екстракції (ТФЕ) викликає підвищений інтерес у застосуванні та розробці нових методів концентрування токсичних речовин і очищення складних біологічних матриць у хіміко-токсикологічному аналізі. Модифіковані сорбенти широко використовуються для селективної адсорбції речовин відповідно до їх фізико-хімічних властивостей, у тому числі іонів металів. Проте при аналізі мінералізаторів із тканин біологічного матеріалу з ряду сорбентів вимиваються модифікатори, в результаті чого вони

втрачають свої сорбційні властивості. Тому дослідження впровадження у практику судово-хімічного аналізу ефективних сорбентів для очищення, концентрування та розділення складних багатокomпонентних сумішей, таких як кислі витяжки з трупних органів, крові, сечі є актуальним завданням сьогодення.

Природні сорбенти, зокрема цеоліти, характеризуються високою швидкістю встановлення сорбційної рівноваги, стійкістю до агресивних середовищ, термостабільністю, здатністю до регенерації та низькою вартістю. Клиноптилоліт - найпоширеніший у природі цеоліт групи геландитів. Великі поклади природного клиноптилоліту залягають в осадових відкладеннях, розташованих в Закарпатській області України [4].

Клиноптилоліт - це мікропористий кристалічний гідратований алюмосилікатний мінерал, що характеризується комірчастою структурою і відомим складом, з великою внутрішньою і зовнішньою поверхнею та високою катіонообмінною здатністю. Цей сорбент виявився особливо корисним для концентрування та розділення катіонів металів [5, 8]. Природний клиноптилоліт придатний для використання в системах очищення та фільтрації промислових відходів, в техніці, медицині та сільському господарстві [2]. Однак досі не було публікацій про його застосування в судово-хімічному аналізі для підготовки та очищення зразків крові, сечі та мінералізаторів біологічних тканин при їх дослідженні на наявність цинку.

Зразки клиноптилоліту були отримані з Сокирницького родовища в Закарпатській області (Україна). Хімічний склад (мас. %) зразків клиноптилоліту був визначений наступним чином: SiO_2 - 71,5; Al_2O_3 - 13,1; Fe_2O_3 - 0,9; TiO_2 - 0,5; CaO - 3,44; MgO - 0,68; P_2O_5 - 0,014 і $\text{K}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{O}$ - 3,03; масове співвідношення $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ становило 5,5 [9,10].

Сорбційна ємність зразків природного цеоліту змінювалася залежно від його партії. Для виключення впливу партійного походження цеоліту на його сорбційну ємність клиноптилоліт модифікували до H^+ -форми за допомогою іонообмінного процесу, коли його обмінні центри були насичені іонами H^+ . Встановлено, що

сорбційна здатність Н-клиноптилоліту підвищується. Для обробки клиноптилоліту та його модифікації іонами H^+ використовували аналітично чисту HCl .

У цих дослідженнях зразки природного клиноптилоліту подрібнювали в роторному млині та просіювали на п'ять фракцій з розмірами частинок 0,10-0,12; 0,20-0,22; 0,30-0,32; 0,50-0,70 та 0,80-1,00 мм. Сорбент промивали дистильованою водою для видалення пилу, а потім сушили на повітрі. Хімічне перетворення клиноптилоліту в Н-форму досягалося обробкою зразків 1 М розчином HCl (20 мл розчину на 1 г адсорбенту) і струшуванням протягом 6 годин. Потім зразки декантували і промивали дистильованою водою до тих пір, поки в супернатанті не виявлялись хлорид-іони. Зразки сорбенту сушили при 120 °С і зберігали в ексикаторі.

2.2.1 Вивчення залежності ступеня сорбції Zn^{2+} від рН розчину в статичних та динамічних умовах

Адсорбційні властивості Н-клиноптилоліту стосовно іонів Zn^{2+} визначали в статичних умовах. Для цього нами проводились дослідження із впливу рН на сорбцію цинку з водних розчинів.

При проведенні цих досліджень у хімічні стакани вносили по 0,3 г Н⁺ форми клиноптилоліту (0,20-0,22 мм) та вносили по 5 мл розчинів цинку сульфату у воді, 0,0001 М розчині HCl та 0,0001 М розчині $NaOH$. При цьому концентрація цинку в кожному із вибраних розчинників становила 10 мкг/мл (всього внесено до наважки сорбенту 50 мкг цинку). Проби поміщали у механічний струшувач (30 коливань за 1 хв) . Тривалість сорбції становила 60 хв.

Після вказаного часу екстракції , проби залишали для осідання частинок сорбенту і з кожної із них відбирали по 1000 мкл рідкої фази і кількісно визначали вміст Zn^{2+} у відібраних пробах за реакцією із пірокатехіновим фіолетовим.

Результати кількісного визначення залишкової концентрації цинку у розчині після екстракції твердою фазою наведені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3.

**Залежність сорбції Zn^{2+} Н- клиноптиломітом в статичних умовах
від рН середовища**

К-ція Zn^{2+} у внесеному розчині, мкг/мл ⁺	рН проби	Визначено Zn^{2+} у 1 мл розчину після сорбції		Сорбовано Zn^{2+} , %
		мкг/мл	%	
10	4	0,6	6	94
10		0,7	7 %	93
10		0,6	6%	94
10	7	2,4	24 %	76
10		2,5	25%	75
10		2,5	25 %	75
10	10	3,2	32 %	68
10		3,3	33%	67
10		3,5	35%	65

Як видно із даних, представлених у таблиці 2.3, найвищий ступінь сорбції цинку спостерігається при рН 4. В статичних умовах досягнуто 93 % -94 % ступінь сорбції. Отже, результати свідчать про те, що Zn^{2+} доцільно сорбувати із кислих розчинів (рН яких 4).

2.2.2. Вивчення ступеня десорбції Zn^{2+} в динамічних умовах

При вивченні ступеня десорбції в динамічних умовах готували SPE-картриджі. Для цього у медичні шприци об'ємом 5 см³ вносили по 1 г клиноптилоліту з розміром частинок 0,20-0,22. На дно шприца і поверх шару клиноптилоліту поміщали фільтрувальний папір. Через картридж пропускали по 10 мл розчинів Zn^{2+} у 0,0001 М розчині HCl (рН 4,0) та у воді.

Швидкість пропускання становила 1 мл/хв. Після пропускання проби, сорбент промивали 2 мл води, підсушували пропускаючи через сорбент повітря. Елюювання проводили 0,1 М розчином HCl та 0,1 М розчином HCl в етанолі.

Об'єм елюату становив 10 мл.

У даних елюатах визначали вміст Zn^{2+} за реакцією із пірокатехіновим фіолетовим. Для цього відбирали по 1 мл елюатів.

Результати експериментальних даних наведені у таблиці 2.4.

Таблиця 2.4

**Залежність ступеня десорбції цинку із Н-клиноптилоліту
в динамічних умовах**

К-ція Zn^{2+} у внесеному розчині, мкг/мл ⁺	рН проби	Визначено Zn^{2+} у 1 мл елюату		Втрати Zn^{2+} при ТФЕ, %
		мкг/мл	%	
Елюат 0,1 М водний розчинHCl				
10	4	9, 78	97,8	2,2
10		9,86	98,6	1,4
10		9,75	97,5	2,5
10	7	8,65	86,5	13,5
10		8,48	84,8	15,2
10		8,74	87,4	12,7
Елюат 0,1 М розчин HCl в етанолі				
10	4	9,49	94,9	5,1
10		9,56	95,6	4,4
10		9,48	94,8	5,2
10	7	8, 47	84,7	15,3
10		8,35	83,5	16,5
10		8,45	84,5	15,5

За результатами, наведеними в таблиці 2.4 можна зробити висновок, що найвищий ступінь вилучення іонів Zn^{2+} із картриджів з Н-клиноптилолітом спостерігається при рН 4. Для елюювання цинку із сорбенту найкраще використовувати 0,1 М водний розчин HCl . При цьому втрати цинку в цих умовах аналізу становлять 1,4 % -2,5 % від внесеної кількості.

2.3.Розробка умов виділення цинку із крові методом ТФЕ

У більшості випадків хронічного отруєння цинком необхідно визначати його вміст у крові.

Для цього нами опрацьовані умови вилучення цинку із цільної крові, не застосовуючи мінералізації цієї біологічної рідини. Цільну кров отримували в Львівському обласному центрі служби крові.

Оскільки за даними ряду авторів при летальних інтоксикаціях концентрація іонів цинку у цільній крові знаходиться у межах 4-8,6 мкг/мл ми готували модельні зразки, що складались із 3 мл крові, у яку вносили по 120 мкл та 240 мкл водного розчину В (концентрація цинку 100 мкг/мл). Відповідно концентрація цинку в крові у модельних сумішах становила 4 мкг та 8 мкг з розрахунку на 1 мл крові, 12 та 24 мкг цинку. Модельні суміші готували в епендорфах. Після внесення в проби крові цинку суміші струшували протягом 10 хв і для ТФЕ відбирали по 2 мл крові.

Методика ТФЕ цинку із крові. Перед завантаженням крові у картриджі активували сорбент, пропускаючи через нього 2 мл етанолу та 2 мл води, в яку вносили 0,1 мл 0,1 М хлоридної кислоти. В картридж вносили 2000 мкл модельного зразку крові із внесеною кількістю цинку. Після пропускання цільної крові через сорбент пропускали 2 мл тріс-буферу (рН 7.4) та 3 мл води. Елюювали цинк із сорбенту 5 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти. При необхідності об'єм елюату доводили водою до об'єму 5 мл.

Кислий елюат використовували для кількісного визначення цинку. Для цього кількісно відбирали 2500 мкл елюату, який переносили у мірну колбу місткістю 25 мл, в кожную пробу вносили по 5 мл боратного буферного розчину з рН =7,8 та по 1

мл 0,1 % розчину пірокатехінового фіолетового у суміші з 0,1 % розчином борної кислоти. Об'єм розчинів доводили водою до 25 мл та вимірювали значення оптичної густини при 620 нм.

Розрахунок кількості цинку у досліджуваній пробі проводили користуючись рівнянням прямої.

Результати кількісного визначення цинку у пробах крові представлені у таблиці 2.5.

2.4 Методика ізолювання цинку із сечі

Беручи до уваги те, що при смертельних отруєннях концентрація цинку в сечі від 0,4 до 1 мкг/мл ми готували модельні зразки, в які до 10 мл сечі вносили по 400 мкл та по 1000 мкл робочого розчину С, із концентрацією 10 мкг/мл.

Проби перемішували та кількісно пропускали через картриджі із Р-клиноптилолітом. Перед внесенням усіх 10 мл сечі сорбент промивали 2 мл етанолу та 2 мл води, в яку вносили 0,1 мл 0,1 М хлоридної кислоти. Після завантаження усієї проби промивали сорбент 4 мл води та елюювали цинк 2 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти.

Весь елюат використовували для кількісного визначення цинку. Для цього його кількісно переносили у мірні кльби місткістю 25 мл, вносили по 5 мл боратного буферного розчину з рН=7,8 та по 1 мл 0,1 % розчину пірокатехінового фіолетового у суміші з 0,1 % розчином борної кислоти. Об'єм розчинів доводили водою до 25 мл та вимірювали значення оптичної густини при 620 нм.

2.5. Методика визначення цинку в тканині печінки

При смертельних отруєннях вміст цинку в печінці знаходиться в межах рівнів концентрацій 16 – 78 мкг/г органу. Виходячи із цього ми готували модельні проби, де до 5 г печінки вносили 80 мкг та 200 мкг цинку. При цьому зважували по 5 г свинячої печінки та готували гоменізат. Для цього подрібнену печінку вносили у

хімічний стакан, куди прибавляли по 0,8 мл розчину В (100 мкг/мл) і, а в інші порції – по 200 мкл розчину А. (1 мг/мл). Проби залишали на 60 хв, після чого в кожную із них вносили по 5 мл води та отримували гомогенізатор.

Гомогенізовану тканину поміщали в УЗ-екстрактор та обробляли ультразвуком протягом 1 години.

Усі суміші піддавали центрифугуванню 30 хв при 30000 об/хв. З кожної проби відбирали супернатант і піддавали очищенню на картриджах з Н-клинотилолітом .

Для цього кондиціонування сорбенту проводили промивали 2 мл етанолу та 2 мл води, в яку вносили 0,1 мл 0,1 М хлоридної кислоти. Після завантаження усієї проби промивали сорбент 5 мл тріс-буферу, 4 мл води та елюювали цинк 5 мл 0.1 М розчину хлоридної кислоти. При необхідності об'єм елюату доводили до 5 мл дистильованою водою.

Для кількісного визначення використовували 0,5 мл елюату. Утворення комплексу із пірокатехіновим фіолетовим проводилось аналогічно, як і при утворенні комплексів при дослідженні проб крові чи сечі.

Результати ізолювання цинку із цільної крові, сечі та гомогенізаторів тканини печінки свині представлені в таблиці 2.5

Таблиця 2.5

Результати визначення кількостей цинку у модельних зразках крові, сечі та тканини печінки

Тканина чи біологічна рідина (маса або об'єм)	Внесено Zn^{2+} у біологічну пробу, мкг	Визначено Zn^{2+}		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
1	2	3	4	5
Кров, 3 мл	12	10.5	87,5	$\bar{X} = 84,66$
	12	10, 2	85,0	$S = 2,70$
	12	9,7	80,8	$S_{\bar{x}} = 1,21$
	12	10,4	86,7	$\Delta x = 3,35$
	12	10, 0	83,3	$\varepsilon = 3,96 \%$

	24	21.0	87,5	$\bar{X} = 85,74$
	<i>Продовження таблиці 2.5</i>			
	2	3	4	5
	24	20,4	85,0	$S = 1,35$
	24	20,8	86,7	$S_{\bar{x}} = 0,61$
	24	20,2	84,1	$\Delta x = 1,69$
	24	20,5	85,4	$\varepsilon = 1,97 \%$
Сеча, 10 мл	4	3,6	90,0	$\bar{X} = 96,0$
	4	3,7	92,5	$S = 5,18$
	4	4,1	102,5	$S_{\bar{x}} = 2,32$
	4	4,0	100,0	$\Delta x = 6,44$
	4	3,8	95,0	$\varepsilon = 6,71 \%$
	10	9,3	93,0	$\bar{X} = 94,8$
	10	9,5	95,0	$S = 2,38$
	10	9,8	98,0	$S_{\bar{x}} = 1,07$
	10	9,2	92,0	$\Delta x = 2,97$
	10	9,6	96	$\varepsilon = 3,13 \%$
Тканина печінки, 5 г	80	57,6	72,0	$\bar{X} = 72,08$
	80	58,0	72,5	$S = 0,85$
	80	58,6	73,3	$S_{\bar{x}} = 0,38$
	80	57,0	71,2	$\Delta x = 1,06$
	80	57,1	71,4	$\varepsilon = 1,47 \%$
	200	145,2	72,6	$\bar{X} = 72,78$
	200	145,0	72,5	$S = 0,73$
	200	146,8	73,4	$S_{\bar{x}} = 0,33$
	200	147,2	73,6	$\Delta x = 0,91$
	200	143,6	71,8	$\varepsilon = 1,25 \%$

Наведені у таблиці 2.5 результати кількісного визначення цинку у пробах крові, сечі та тканині печінки свідчать, що із застосуванням пробопідготовки біологічних рідин та тканин методом ТФЕ на картриджах із Н-клиноптилолітом отримуються відтворювані результати кількісного визначення даного іону у цих біологічних пробах. При цьому ступінь виділення цинку із крові досягає становить 84 % - 88 %, із сечі ізолюється 93-98 %, а з гомогенізаторів тканини печінки ізолюється 71-73 % цинку. Застосувавши ТФЕ на клиноптилоліті не потрібно проводити тривалу мінералізацію біологічної проби для вилучення цинку.

ВИСНОВКИ

1. Узагальнено дані літератури щодо біологічної ролі цинку як мікроелемента, його токсичності при передозування лікарських препаратів (гострої та хронічної) і можливостей кількісного визначення в біологічних матрицях.

2. Для кількісного визначення цинку запропоновані умови проведення реакції із пірокатехіновим фіолетовим. Встановлено, що даний індикатор реагує з іонами цинку у співвідношенні 1:1 з утворенням синьо-фіолетового комплексу при рН 7,8, який характеризується інтенсивною смугою поглинання при 620 нм. Доведено доцільність проведення реакції в присутності борної кислоти. В межах концентрацій цинку 0,5-10 мкг у 25 мл кінцевого об'єму спостерігається відповідність закону світло вбирання. Відносна похибка кількісного визначення цинку при цьому не перевищує 1,34 %.

3. Вивчено залежність ступеня сорбції іонів цинку Н-клиноптилолітом із водних розчинів від рН середовища в статичних умовах. Встановлено, що при рН 4 досягається 94 % ступінь екстракції іонів цинку даним сорбентом. Встановлено, що в статичних умовах із Н-клиноптилоліту 0,1 М розчином НСІ десорбується до 99 % цинку.

4. Розроблено методики виділення цинку із модельних зразків крові, сечі та гомогенізату тканини печінки застосовуючи твердофазну екстракцію даного елемента на картриджах з Н-клиноптилолітом. Встановлено, що із крові ізолюється до 88 % цинку, з сечі – до 98 % цинку, а з гомогенізатів печінки до 73 % цинку від введеної кількості. При цьому не потрібно проводити мінералізацію біологічного матеріалу.

5. Для кількісного визначення цинку, виділеного із біологічного матеріалу використано метод спектрофотометрії у видимій ділянці спектру за реакцією досліджуваного іону із пірокатехіновим фіолетовим. При цьому відносна похибка кількісного визначення цинку у крові не перевищувала 3,96 %, у сечі – 3,13 % а в гомогенізаті біологічної тканини – 1,47 %.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Акімов О.Є. Роль цинку в організмі людини та шляхи подолання його дефіциту / О.Є. Акімов, Т.Ю.Кузнецова, Н.В.Соловйова та ін. //Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії.- 2023.- Т.23.- №3.- С. 246-249 .
2. Акулова А.В. Адсорбційне очищення стічних вод від сполук фосфору/ А.В.Акулова, В.В. Сабадаш// Матер. І Міжнар. наук. –практ. конф. «Екологічна безпека як основа сталого розвитку суспільства».–Львів: ЛДУ БЖД. 2012. –С. 194 –196.
3. Антоняк Г.Л. Біологічна роль цинку в організмі людини і тварин / Г.Л. Антоняк, О.В. Важненко, О.М. Стефанишин, Н.Є. Панас // Біологія тварин. - 2011. - Т. 13, № 1-2. - С. 17-31.
4. Басараба Ю.Б. Перспективи застосування цеолітів Сокирницького родовища для очищення природної води / Ю.Б. Басараба, Т.М. Засадний // Науково-технічний журнал «Екологічна безпека та збалансоване ресурсокористування».–2015.-№1(11).–С.46-51.
5. Василечко В. Концентрування Cr(III) на закарпатському клиноптилоліті В. Василечко, Г. Грищук, М. Вітер, Я. Каличак // Вісник Львів, ун-ту. Серія хім.—57(1).—2016.—с. 232—241.
6. Копач О. Є. Морфологічні зміни тканин печінки при моделюванні тяжкої травми на фоні отруєння солями міді й цинку / О.Є. Копач // Вісник наукових досліджень. - 2015. - № 4. - С. 103-105.
7. Мартинова С. М. Метаболічні ефекти цинку (огляд літератури) / С.М. Мартинова, Т.В. Горбач, Н.В. Ярмиш, В.Г. Гопкалов, Г.В. Полікарпова // Український журнал медицини, біології та спорту. – 2019. – Том 4, № 6 (22). – С. 16–24.
8. Милянник О.В. Статика поглинання двох іонів важких металів природним цеолітом /О.В.Милянник, О.М.Шквірко, Я.М.Гумницький//Вісник

- Національного університету Львівська політехніка. Серія "Хімія, технологія речовин та їх застосування".-2016.-N841.-С.330-334.
9. Сивий М. Я. Ресурсна база адсорбційної сировини (цеолітів) в УКРАЇНІ
Режим доступу <http://dspace.tnpu.edu.ua/bitstream/123456789/26311/1/Syvyi.pdf>
- 10.Сивий М., Паранько І., Іванов Є. Географія мінеральних ресурсів України.
Львів: Простір М, 2013. 682 с.
- 11.Фартушок Н.В. Роль цинку в метаболічних процесах живих організмів /
International scientific journal «Grail of Science»/ Н.В. Фартушок,
Т.В.Фартушок, Ю.М.Федевич, А.Ю.Бучковська.- 2024.- № 36.-С.478-487.
- 12.Цинк ВООЗ Режим доступу <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
- 13.Цинк, застосування, переваги. Режим доступу:
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/263176>
- 14.Цинкдефіцитні стани: сучасні погляди на проблему/ Український медичний
часопис 30 жовтня 1999. Режим доступу: (www.umj.com.ua/uk/publikatsia-2383-cinkdeficitni-stani-suchasni-poglyadi-na-problemu) Посилання:
(www.umj.com.ua/uk/publikatsia-2383-cinkdeficitni-stani-suchasni-poglyadi-na-problemu)
- 15.Чекман І.С. Цинк і наноцинк: властивості,застосування у клінічній практиці /
І.С.Чекман, З.Р. Ульберг, А.Д. Руденко та ін. // Укр. мед. Часопис.- 2013.- №
2.- Т.(94).- С.42-47.
- 16.Afrin L.B. Fatal copper deficiency from excessive use of zinc-based denture
adhesive / L.B. Afrin // Am J Med Sci.- 2010.- V.340.- N2.- P.164-168.
- 17.Barceloux D.G. Zinc / D.G. Barceloux // J Toxicol Clin Toxicol. -1999.-V.37.-N 2.-
P.279-292.
- 18.Black R.E. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and
middle-income countries / R.E.Black, C.G.Victora, S.P.Walker [et al] // Lancet. -
2013.- V.382.- P.427-451.

- 19.Bodar C.W. The European Union risk assessment on zinc and zinc compounds: The process and the facts / C.W.Bodar, M.E.Pronk, D.T.Sijm// Integr. Environ. Assess. Manag.- 2005.- N 1.- P. 301–319.
- 20.Bonaventura P. Zinc and Its Role in Immunity and Inflammation / P.Bonaventura, G.Benedetti, F. Albarède, P. Miossec // Autoimmun. Rev.- 2015.- V.14.- P. 277–285.
- 21.Conte R. Postmortem Blood Metal Levels: Establishing Updated Reference Ranges Using ICP-OES / R. Conte, S.Romano, R.Foggia [et al] //Perspectives in Legal and Forensic Sciences.- 2024.- N1.- P.100-108.
- 22.Cooper R.G. Zinc toxicology following particulate inhalation/ R.G.Cooper // Indian. J. Occup. Environ. Med.- 2008.-N 12.- P. 10–13.
- 23.Costa M.I. Zinc: from biological functions to therapeutic potentia / M.I. Costa, A.B. Sarmiento-Ribeiro, A.C. Gonzalves // Int J Mol Sci.- 2023.- V.24.- N 5.- P. 4822.
- 24.Doherty K. Zinc-containing denture adhesive: A potential source of excess zinc resulting in copper deficiency myelopathy/ K.Doherty, M.Connor, R. Cruickshank // Br. Dent. J.- 2011.- V. 210.- P. 523–525.
- 25.Donaldson M. Vitamin and mineral supplements: Friend or foe when combined with medications? / M. Donaldson, R.Touger-Decker //J. Am. Dent. Assoc.- 2014.- V. 145.- P. 1153–1158.
- 26.EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. EFSA J. 2014, 12
- 27.El Idrissi A.The toxicology of zinc chloride smoke producing bombs and screens/ A.El Idrissi, L. van Berkel, N.E. Bonekamp, D.J.Dalemans, M.A.van der Heyden // Clin. Toxicol.- 2017.- V. 55.- P. 167–174.
- 28.Frydrych A. Zinc:a critical importance element in cosmetology/ A.Frydrych, K.Kasiura// J. Appl. Cosmetol.- 2004.- V. 22.- P. 1–13.
- 29.Gaubeur I. Spectrophotometric Determination of Zinc in Pharmaceutical Samples Using Di-2-Pyridyl Ketone Salicyloylhydrazone / I.Gaubeur, M.C. da CunhaAreias, L.H.S. Avila Terra, M.E.V.Suárez-Iha // Spectrosc. Lett.- 2002.- V. 35.-P. 455–465.
- 30.Greenberg M.I. Metal fume fever and polymer fume fever/ M.I.Greenberg, D.Vearrier // Clin Toxicol (Phila).- 2015 .- V.53.- N4.- P.195-203.

31. Gumulec J. Insight to physiology and pathology of zinc(II) ions and their actions in breast and prostate carcinoma /J. Gumulec, M.Masarik, S.Krizkova [et al]//Curr Med Chem. – 2011.- V.18.- V.18.- N 33.- P.5041-5051.
32. Hambidge M. Human zinc deficiency/ M.Hambidge //J. Nutr. -2000.- V.130.- P.1344S–1349S.
33. Hotz C., Brown K.H. Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in Populations and Options for its Control. IZINCG Technical Document #1. International Nutrition Foundation for United Nations University Press; Tokyo, Japan: 2004.-158 p.
34. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2001.- 456 p.
35. International Labour Organization. International Chemical Safety Cards (ICSCs) Zinc Chloride; International Labour Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
36. Kambe T. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism/T.Kambe, T. Tsuji, A.Hashimoto, N. Itsumura // Physiol Rev.- 2015.- V.95.- P.749-784.
37. Khozroughi A.G. Investigation of the post mortem zinc protoporphyrin IX fluorescence with respect to its protein-bound and unbound occurrence in aqueous meat extracts /A. G.Khozroughi, T.W.Braga, J.Wagner, H.Rawel //Food Chemistry.-2019.- V.283, N15 .-P. 462-467.
38. Kim Y.H. Alveolar epithelial cell injury due to zinc oxide nanoparticle exposure / Y.H.Kim, F.Fazlollahi, I.M. Kennedy [et al]//Am J Respir Crit Care Med.- 2010.- V.182.- N 11.- P.1398-1409.
39. Kiouri D.P. Multifunctional role of zinc in human health: An update/ D.P. Kiouri, E.Tsoupra, M.Peana, [et al]// EXCLI J.- 2023.- V. 22.- P. 809–827.
40. Lech T. Zinc in postmortem body tissues and fluids / T. Lech, J.K. Sadlik //Biol Trace Elem Res.- 2011.- V142.- N1.- P.11-17.
41. Lin P.-H. Zinc in Wound Healing Modulation / P.-H.Lin, M.Sermersheim, H.Li [et al] // Nutrients .-2018.- V. 10.- P. 1620.

42. Marastoni L. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. Intercropping/ L. Marastoni, M. Sandri, Y. Pii [et al]// Chemosphere.- 2019.- V.214.- P.563-578.
43. Mccall K.A. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes / K.A.Mccall, C.-C. Huang, C.A. Fierke // J. Nutr.- 2000.- V. 130.- P. 1437S–1446S.
44. Mohammed A.F. Spectrophotometric Determination of Zinc in Pharmaceutical Preparations by Using a New Synthesized Reagent [4,5-Diphenyl-2-((1E)-(4-(1-(2-Phenylhydrazono) Ethyl) Phenyl) Diazenyl)-4H-Imidazole]/ A.F.Mohammed, S.J.Baqir// Iraqi Natl. J. Chem.-2015/- V.15.- P. 271–283.
45. Nagarjunareddy D. Simple and Sensitive Spectrophotometric Determination of Zn (II) in Biological and Pharmaceutical Samples with 2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone(BPT)/D. Nagarjunareddy, K.V.Reddy, K.H. Reddy //J. Chem. Pharm. Res .-2011.- N 3.- P.205–213.
46. Najim S.S. Spectrophotometric Determination of Zinc in Pharmaceutical Medication Samples Using 8-Hydroxyquinoline Reagen / S.S.Najim, M. A.Al-Hussian Hameed., Mundher Abdulhasan Al-Shakban, Tahseen Saddam Fand // International Journal of Chemistry.- 2020.- V.12.- N 1.- P. 29-36.
47. Neufingerl N. Nutrient Intake and Status in Adults Consuming Plant-Based Diets Compared to Meat-Eaters: A Systematic Review/ N.Neufingerl, A. Eilander //Nutrients -2021.- V.14.- P. 29-35.
48. Organization, I.L. International Chemical Safety Cards (ICSCs) ICSC: 0208 Zinc Oxide. 2024. Режим доступа: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0208&p_lang=en National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 11192, Zinc Acetate. 2024. Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zinc-Acetate>
49. Pettila V. Zinc chloride smoke inhalation: A rare cause of severe acute respiratory distress syndrome / V.Pettila, O.Takkunen, P. Tukiainen// Intensive Care Med.- 2000.- V. 26.- P. 215–217.

50. Pinto J.J. Enhanced Spectrophotometric Methods for Trace Metal Determination in Waters: Zinc as an Example / J.J. Pinto, M. García-Vargas, C. Moreno // *Anal. Methods* .-2012.- N. 4.- P. 147–152.
51. Plum L.M. The essential toxin: impact of zinc on human health/ L.M. Plum, L. Rink, H. Haase // *Int J Environ Res Public Health*.- 2010.- V.7.- N4.- P.1342-1365.
52. Portbury S.D. Zinc signal in brain diseases / S.D. Portbury, P.A. Adlard // *Int J Mol Sci.* – 2017.- V.18.- N12.- P.2506.
53. Prasad A.S. Clinical manifestations of zinc deficiency/ A.S. Prasad // *Annu Rev Nutr.*- 1985.- N 5.- P.: 341–363.
54. Prasad A.S. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease / A.S. Prasad // *Adv Nutr* .- 2013.- V.4.- N2.- P.176-190.
55. Prasad A.S. Molecular mechanisms of zinc as a pro-antioxidant mediator: clinical therapeutic implications / A.S. Prasad, B. Bao // *Antioxidants (Basel)*.- 2019.- V.8.- N 6.- P.164-167.
56. Prasad A.S. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia / A.S. Prasad, J.A. Halsted, M. Nadimi // *Am J Med*.- 1961.- V.31.- P. 532–546,
57. Rahimzadeh M.R Zinc Poisoning - Symptoms, Causes, Treatments / M.R. Rahimzadeh, S. Kazemi, A.A. Moghadamnia // *Mini Rev Med Chem*.- 2020.- V.20.- N.15.- P.1489-1498.
58. Raulin J. Etudes clinique sur la vegetation / J. Raulin // *Annales des Sciences Naturelle: Botanique* 11-: V.93.- P.299- 307.
59. Rus L.L. Determination of Zn^{2+} in Solid Pharmaceutical Dosage Forms by Means of Spectrophotometry in Micellar Media: Method Validation / L.L. Rus, A.M. Juncan, V.I. Craciun [et al].- *Appl. Sci.* – 2022.- V.12.- N 9.- 4476
60. Ruttkay-Nedecky B. The role of metallothionein in oxidative stress / B. Ruttkay-Nedecky, L. Nejdl, J. Gumulec [et al] // *Int J Mol Sci*.- 2013.- V.14.- N3.- P.6044-6066.

- 61.Ryu H.J. Zinc oxide nanoparticles: A 90-day repeated-dose dermal toxicity study in rats/ H.J.Ryu, M.Y. Seo, S.K. Jung [et al]//Int. J. Nanomedicine.- 2014.- N 9.- P. 137–144.
- 62.Schoofs H. Zinc Toxicity: Understanding the Limits / H. Schoofs, J.Schmit, L. Rink //Molecules.- 2024.- V. 29.- N13.- P. 3130.
- 63.Sehgal V.N. Trophic skin ulceration in leprosy: Evaluation of the efficacy of topical phenytoin sodium zinc oxide paste / V.N. Sehgal,P.V.Prasad, P.K.Kaviarasan, D. Rajan, D. // Int. J. Dermatol. – 2014.- V.- 53.- P. 873–878.
- 64.Shabab M. Feasibility evaluation of trace amount of zinc in urine samples using atomic absorption solidified floating organic drop micro-extraction technique/ M.Shabab, M.Rismanchian, S.K.Zeverdegani, H.A.Rangkooy // JOHE.- 2018.- V. 7.- N1.- P.11-19.
- 65.Sharquie K.E. Topical zinc sulphate solution for treatment of viral warts / K.E Sharquie, A.A. Khorsheed, A.A.Al-Nuaimy///Saudi Med. J.- 2007.- V. 28.- P. 1418–1421.
- 66.Stevens B.J. Direct determination of zinc in plasma by graphite furnace atomic absorption spectrometry using palladium/magnesium and EDTA matrix modification with high temperature pyrolysis / B.J. Stevens, D.J.Hare, I.Volitakis, R.A. Cherny, B R. Roberts // J. Anal. At. Spectrom.-2017.- V. 32.- P. 843-847.
- 67.Terrin G. Zinc in Early Life: A Key Element in the Fetus and Preterm Neonate /G.Terrin, R.Berni Canani, M.Di Chiara [et al]//Nutrients.- 2015.- V.7.- N12.- P.10427-10446/
- 68.Treska E. Zinc deficiency analysis in serum blood, using two different methods / E.Treska, K.Vaso, S. Buzo, A.Emiri //Journal of Environmental Protection and Ecology.- 2014.- V.15.- N 1.- P. 309 .
- 69.Wahab A. Zinc-induced copper deficiency, sideroblastic anemia, and neutropenia: A perplexing facet of zinc excess / A.Wahab, K. Mushtaq, S.G. Borak, N. Bellam//Clin. Case Rep.- 2020.- V. 8.- P. 1666–1671.

70. Wieringa F. T. Determination of Zinc Status in Humans: Which Indicator Should We Use? / F.T. Wieringa, M.A. Dijkhuizen, M. Fiorentino, A. Lallou, J. Berger // *Nutrients*. - 2015. - V. 7. - N5. - P. 3252–3263.
71. Yilmaz B. Awful face of the war-impacted smoke bomb capsule in the face and systemic toxicity: Reports from the conflict in Syria / B. Yilmaz, N. Yesiloglu, R. Firinciogullari [et al] // *J. Craniofac. Surg.* - 2015. - V. 26. - P. 167–169.

SUMMARY

Kyrychynska Anastasia

ZINC TOXICITY AND IMPROVEMENT OF ITS DETERMINATION METHODS FOR CHEMICO-TOXICOLOGICAL RESEARCH

Department of Toxicological and Analytical Chemistry

Scientific Supervisor: Assoc. Prof. I.Y. Halkevych

Keywords: Zinc, Pyrocatechol violet, blood, urine, liver tissue, Zeolite Clinoptilolite.

Introduction. Zinc is a multifunctional trace element that participates in a number of physiological processes in the human body. Uncontrolled use of zinc supplements by both adults and children can cause toxic effects. The use of zinc compounds for suicidal purposes is life-threatening and causes severe toxic effects. Therefore, the development of new rapid methods for determining zinc in biological material is relevant.

Materials and methods. The solutions were prepared from zinc sulphate heptahydrate. The quantitative determination of zinc was based on its reaction with pyrocatechol violet at pH 4. The optical density of the solutions was measured at 620 nm using a Specord50plus spectrophotometer. Zinc extraction from blood, urine and liver homogenate was performed on cartridges with H-clinoptilolite.

Results. For the quantitative determination of zinc, conditions for conducting a reaction with pyrocatechol violet have been proposed. It has been established that this indicator reacts with zinc ions in a 1:1 ratio to form a blue-violet complex at pH 7.8, which is characterised by an intense absorption band at 620 nm. The feasibility of conducting the reaction with this indicator in the presence of boric acid has been proven. Within the zinc concentrations of 0.5-10 µg in 25 ml of the final volume, compliance with the light absorption law is observed. The relative error of quantitative determination of zinc does not exceed 1.34%.

The adsorption properties of H-clinoptilolite with respect to Zn²⁺ ions were determined under static conditions. To this end, the effect of pH on the sorption of zinc from aqueous solutions was studied. The highest degree of zinc sorption is observed at pH 4. Under static conditions, the degree of zinc sorption from aqueous solutions was 93%–94%. The degree of desorption was determined under dynamic conditions on SPE cartridges with 1 g of H-clinoptilolite. For elution of zinc from the sorbent, it is best to use a 0.1 M aqueous solution of HCl. In this case, zinc losses amount to 1.4%–2.5% of the amount added. The conditions for zinc extraction on cartridges with H-clinoptilolite were studied from 3 ml blood samples, to which 12 µg and 24 µg of zinc were added, and from 10 ml urine samples, to which 4 µg and 10 µg of zinc were added. 80 and 200 µg of zinc were added to 5 g of liver tissue and homogenates were obtained. The samples were purified on cartridges with H-clinoptilolite, weighing 1 g, and the sorbed zinc was eluted with 0.1 M HCl solution. The zinc content in the eluates was determined spectrophotometrically. In this case, 84%–88% of zinc was excreted from the blood, 93%–98% was isolated from the urine, and 71%–73% of zinc was excreted from the liver tissue homogenates.

Conclusions: A method for extracting zinc from blood, urine and liver homogenates using sorption on H-clinoptilolite has been developed. This method does not require mineralisation of biological samples for zinc extraction.