

М. П. ПАТАПОВИЧ, И. Д. ПАШКОВСКАЯ, Ж. И. БУЛОЙЧИК, Г. Т. МАСЛОВА, А. П. ЗАЖОГИН

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЗМА ЖИЗНЕННО НЕОБХОДИМЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ПО ВОЛОСАМ МЕТОДОМ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ МНОГОКАНАЛЬНОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

Разработана методика ретроспективной оценки метаболизма жизненно необходимых элементов (ЖНЭ) в организме человека по количественному определению их содержания в волосах методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии с возбуждением спектров электрической дугой переменного тока. Сокращены временные и материальные затраты на пробоподготовку, повышены пределы чувствительности метода, что улучшает количественные оценки и ускоряет процесс анализа, приближая его к экспрессным. Методика позволяет уменьшить исходную пробу образца по сравнению с количествами, необходимыми для анализа методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС ИСП) и атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Используя полученные авторами результаты по ретроспективной оценке мета-

близма ЖНЭ в волосах пациентки, удалось своевременно определить начало процесса гиперкальциемии, стабилизировать, а затем и существенно улучшить состояние ее здоровья. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологические образцы; волосы; электрическая дуга переменного тока; атомно-эмиссионная многоканальная спектрометрия; ретроспективный анализ метаболизма; жизненно необходимые элементы.

The methods of retrospective estimation of the essential elements metabolism in a human organism by quantitative determination of their content in hair using multichannel atomic-emission laser spectrometry with spectra excited by an a. c. arc have been developed. Owing to these methods, the material costs were reduced and time for sampling preparation was shortened; the sensitivity limits were widened to improve the quantitative estimates and to increase the rate of the analysis process. Using the proposed methods, one can reduce the initial sample as compared to the quantities required for ICP-AES and AAS. Based on the results obtained during estimation of metabolism of the essential elements in hair of the patient, the beginning of the hypercalcemia process was detected in due time and stabilized to allow for a significant improvement in the patient's health state. The accumulated experimental data may be used to develop further the methods for early diagnosis of the inadequate level of the health system reserves and for selection of the rehabilitating measures.

Key words: biological samples; hair; alternating current (a. c.) arc; multichannel atomic-emission spectrometry; retrospective analysis of metabolism; essential elements.

Для ранней диагностики ряда заболеваний, коррекции лечебно-восстановительных процессов, оптимального подбора методов лечения существует потребность в экспрессных методах определения содержания ЖНЭ в биологических материалах. Хотя в настоящее время в лабораторной диагностике используются достаточно чувствительные и селективные методы определения элементов, общим недостатком их является необходимость использования относительно большого количества биологического субстрата и зачастую значительная длительность анализа [1–4]. Так, например, в методических указаниях [1] на спектрографическое определение 6–10 элементов в одной пробе необходимо 44 рабочих часа, что включает озоление пробы, перетиравание ее со спектроскопической основой, подсушивание, заполнение и взвешивание электродов, уплотнение спиртом, закрепление коллодием и затем трехкратное фотографирование на фотопластинках. Далее следует качественный анализ, т. е. выбор аналитических линий, фотометрирование проб и эталонов, построение градуированных графиков после приготовления и апробации эталонов и спектроскопической основы. Даже использование новейших методик [2–4] требует для проведения анализа 5–10 ч.

Вместе с тем одновременное определение микроконцентраций нескольких элементов может быть выполнено с помощью различных экспрессных инструментальных методов анализа, отличающихся простотой, не требующих большого количества исследуемого материала и обеспечивающих требуемую относительную точность. В этом аспекте метод атомно-эмиссионного многоэлементного анализа в современном исполнении регистрации спектров (фотодиодные и ПЗС линейки и матрицы) дает возможность одновременного определения до 35 элементов с достаточной чувствительностью и точностью. Эмиссионная спектроскопия, использующая электрическую дугу, электрический искровой разряд, лазерную искру, – мощное средство, позволяющее обнаружить до 70 элементов при кратковременном возбуждении нескольких микрограммов анализируемого образца.

Следует также подчеркнуть, что до сих пор имеется определенный дефицит официально стандартизированных методик анализа [1–4]. Более того, анализ биологического объекта является сложной аналитической задачей. Главные причины затруднений связаны с индивидуальностью состава, многокомпонентностью пробы. Отсюда вытекает необходимость приспособления даже несложных стандартных методик к особенностям состава и физико-химической структуре каждого исследуемого объекта, т. е. в каждом конкретном случае, по сути дела, требуется проведение в той или иной мере аналитической исследовательской работы.

Также отметим, что пробоподготовка часто является сложным многостадийным процессом, лимитирующим скорость анализа [5].

Цель настоящей работы – создание оперативной методики одновременного количественного определения ЖНЭ в волосах человека методом атомно-эмиссионной многоканальной спектроскопии.

Волосы выбраны в качестве объекта исследования, поскольку постоянно аккумулируют элементы, реагируют на все изменения элементного состава в организме человека и стабильно сохраняют состав в каждый промежуток времени [6–8]. Хотя волосы эволюционно сформировались как один из вспомогательных экскреторных органов, в то же время они характеризуются высокой скоростью роста, сочетающейся с отсутствием у них метаболической активности. Это приводит к накоплению микроэлементов и дает возможность проведения ретроспективного анализа за определенные промежутки времени. Элементный состав волос отражает устойчивые тенденции, сформировавшиеся за достаточно большой промежуток времени (недели, месяцы, годы), он не подвержен значительным колебаниям в зависимости от приема пищи и времени суток. Содержание макро- и микроэлементов в волосах позво-

ляет изучить элементный статус организма в целом. Пробы волос являются интегральным показателем минерального обмена, надежным источником информации. Для волос характерна фиксированная динамика роста (0,2–0,5 мм в день). Для оценки микроэлементного статуса организма на момент обследования наиболее адекватной является прикорневая (3–4 см) часть волос. Для проведения анализа согласно [1–4] необходима навеска 0,10–0,20 г.

Материалы и методика исследования

В настоящей работе для минерализации образцов волос использован метод «мокрого озоления». Навеску пробы весом 20–30 мг помещали в кварцевый стакан или чашку, приливали 2,0 мл концентрированной азотной кислоты и 1,0 мл 30 % перекиси водорода, нагревали при температуре 80–95 °С. Разложение образца и дальнейшее выпаривание занимает примерно 2–3 ч. Пробу доводили до состояния «влажной соли», затем в определенном количестве переносили в колбу, смывая осадок десятикратным по отношению к взятой навеске количеством бидистиллированной воды. Получали десятикратное разведение пробы, которую анализировали. Условия осуществления пробоподготовки позволяют проводить одновременное разложение 10–15 образцов, тем самым значительно сокращая суммарное время анализа.

Для регистрации спектров использовали многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр ЭМАС-200, для возбуждения спектров – генератор UBI-1. Сжигание образцов и возбуждение спектров проводили в дуге переменного тока. Предварительные исследования показали, что при силе тока $I = 6$ А наблюдается наиболее равномерное уменьшение интенсивности от времени возбуждения. Ширина щели – 40 мкм, время накопления одного спектра – 0,65 с, число накоплений – 25, общее время анализа – 16,25 с.

В работе использовали электроды марки ОСЧ 7-3, которые перед проведением эксперимента отжигали в дуге переменного тока 30–50 с током дуги 10 А. Такая операция примерно на порядок уменьшает интенсивность линий элементов (Cu, Ca и др.), присутствующих в электродах, что практически устраняет возможную дополнительную ошибку при проведении анализа.

При выполнении анализа использовали угольные электроды с углублением цилиндрической формы диаметром 4,0 мм и высотой 3,0 мм. Объем цилиндрической полости после отжига электрода равен 25–30 мкл. Для закрытия пор углубление электрода дополнительно покрывали тонким слоем 0,1 % раствора полистирола в толуоле. При приготовлении образцов в углубление помещали точное количество анализируемого раствора (25 мкл), электроды оставляли под теплом настольной лампы 100 Вт до полного испарения жидкости. Анализ проводили, сжигая образцы в дуге переменного тока. Выполняли три параллельных опыта.

Величину погрешности измерений в работе соотносили со значениями, полученными на большом экспериментальном материале в работах [2, 3], которые приведены в табл. 1. Разработанная нами методика количественного определения элементов не допускает превышения приведенных значений погрешности.

Таблица 1

Погрешность измерений

Элемент	Диапазон определяемых количеств, мкг/г	Относительная погрешность, %, $P = 0,95$
Al, Be, Ca, K, Fe, Mg, Na, Zn	0,01–0,10	65
	0,1–1,0	40
	1–200	20
Cu	0,05–0,50	50
	0,5–5,0	40
	5–10 000	25

В целях количественного определения общего содержания элементов при исследовании образцов волос с помощью электрической дуги анализировали стандартные образцы для построения градуировочных графиков.

Графическое изображение зависимости интенсивности полос Al и Ca от концентрации этих элементов в эталонных образцах и градуировочные графики представлены на рис. 1.

Зависимость между концентрацией элемента и интенсивностью линий прямолинейна в логарифмических координатах:

$$\lg I = A + B \lg C,$$

где $\lg I$, $\lg C$ – десятичный логарифм интенсивности и концентрации химического элемента соответственно; A и B – коэффициенты, рассчитанные из градуировочных графиков, значения которых приведены в табл. 2.

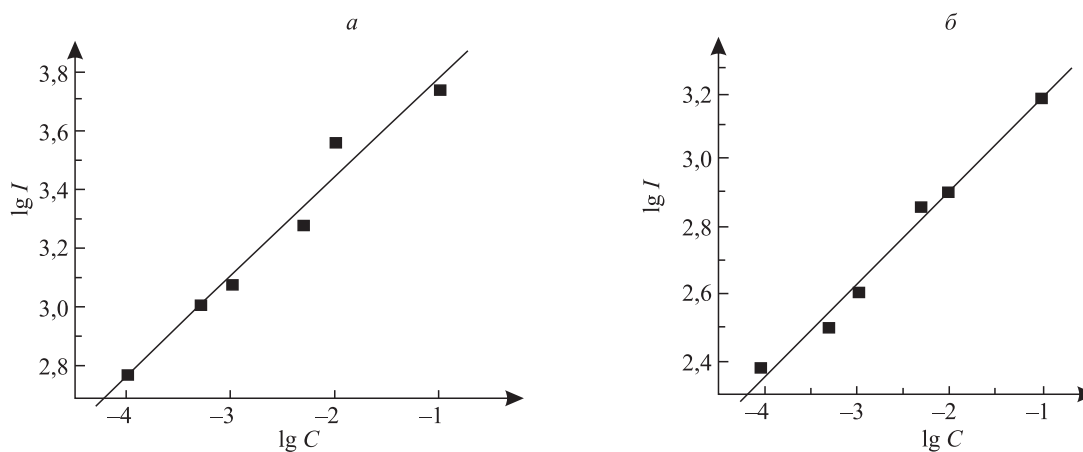


Рис. 1. Градуировочные графики для определения концентрации алюминия (а) и кальция (б)

Таблица 2

Значения коэффициентов A и B для различных элементов

Элемент	A	B
Al	4,11	0,33
Fe	3,88	0,32
Be	4,28	0,31
Ca	3,45	0,27
Zn	3,30	0,31
Mg	3,27	0,31
Cu	3,62	0,30
Li	3,54	0,29

Полученные данные позволили определить общее содержание количества элементов в волосах большого числа пациентов с различными заболеваниями.

Нами также проведен ретроспективный анализ волос, что явилось наглядным примером важности использования ретроспективного количественного анализа метаболизма элементов для диагностических целей. Так, после обращения одной из пациенток в поликлинику и проведения там лабораторной диагностики врачами был сделан акцент на заниженный уровень кальция. Ей назначили курс лечения кальцийсодержащими препаратами, порекомендовали усиленную молочную диету. Поскольку улучшения не наступало, ей предложили санаторное лечение для отдыха и дальнейшего укрепления организма, назначили общеукрепляющие препараты. Но уже в первые дни после приема препаратов, повышающих уровень гемоглобина, состояние ее здоровья ухудшилось, пища не усваивалась, началась тошнота и рвота. Она покинула санаторий, поскольку врачи не смогли установить причину обострения.

Пациентка обратилась к нам, и вначале нами было определено общее содержание элементов в волосах пациентки методом АЭМС. Согласно рекомендациям [1–3] были использованы 4 см волос от корней. Результаты определения общего содержания элементов после «мокрого озоления» волос приведены в последней строке табл. 3. Концентрация большинства элементов близка к верхней статистической границе. Заметным исключением является только кальций, его концентрация более чем в три раза превышает максимальное референтное значение.

Таблица 3

Концентрация элементов в волосах пациентки, мкг/г

Длина волос, см	Al	Mg	Be	Ca	Fe	Cu	Zn
1	98,8	443,7	0,01	13 264,5	56,1	26,4	383,4
2	63,8	394,9	0,02	8143,6	50,9	19,6	365,7
3	76,3	389,7	0,01	2956,4	59,7	43,5	342,1
4	54,8	285,2	0,02	864,4	76,9	25,3	322,6
5	49,6	287,7	0,01	121,6	136,8	8,2	337,7
6	56,9	364,8	0,02	231,5	57,2	22,5	290,1
7	88,6	274,5	0,02	241,4	63,4	13,2	289,4
8	29,8	312,2	0,01	367,6	72,8	8,9	297,8

Длина волос, см	Al	Mg	Be	Ca	Fe	Cu	Zn
9	46,9	258,8	0,01	403,7	61,2	7,4	313,6
10	48,8	337,8	0,01	441,4	80,7	11,3	337,6
11	35,8	276,8	0,01	467,6	81,2	6,7	323,3
12	44,1	402,9	0,02	473,7	45,4	11,2	287,7
Среднее значение	57,8	335,5	0,014	2331,1	70,6	17,1	324,3
Граница: нижняя	2,0	25,0	0,01	200,0	15,0	6,5	125,0
верхняя	40,0	120,0	0,05	1500,0	50,0	15,0	250,0
Общее содержание	63,6	365,1	0,015	6557,3	52,3	20,3	324,5

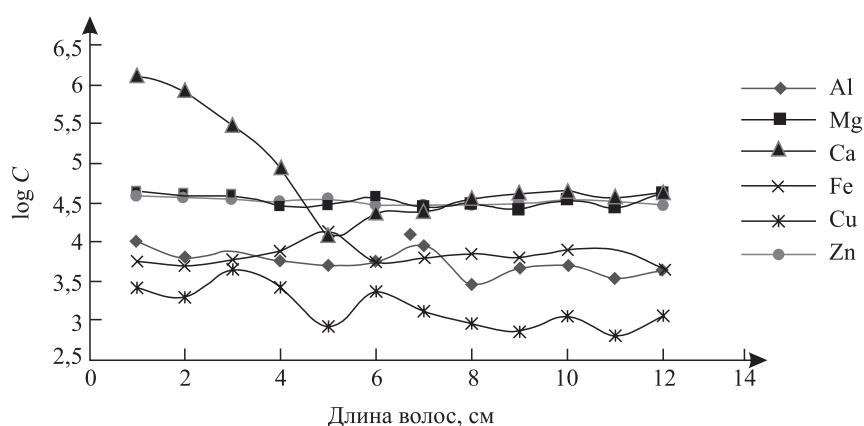


Рис. 2. Концентрация жизненно необходимых элементов по длине волос

Чтобы детально оценить нарушение метаболизма кальция, целесообразно было проведение ретроспективного анализа волос за последний год жизни пациентки. Методом АЭМС анализировали примерно каждый сантиметр взятых волос длиной 13 см после их «мокрого озоления». Количественные результаты определений приведены в табл. 3 и на рис. 2. Здесь же даны средние значения концентрации элементов и референтные значения (нижняя и верхняя граница) [7, 8].

Хронология изменения концентрации элементов по длине волос показывает, что в действительности при обращении пациентки к врачам содержание кальция было пониженным (5-я строка табл. 3; 5-й см от корней волос, рис. 2). Выяснилось, что это было результатом серьезных психологических нагрузок в связи с переездом пациентки на новое место жительства в регион с другим климатом.

Нормальные показатели кальция в волосах для женщин, согласно [11], лежат в пределах 60–300 мг/100 г. Полученный нами результат ретроспективной оценки содержания кальция показывает, что назначение кальцийсодержащих препаратов после обследования в поликлинике было оправдано.

После приема кальцийсодержащих препаратов уровень его заметно повышался (см. табл. 3: с 4-й по 2-ю строку) и затем более чем в 2 раза превысил верхнюю границу (1-я строка табл. 3). Это является показателем гиперкальциемии. Известно [12], что при гиперкальциемии страдает функция почек, происходит угнетение клубочковой фильтрации. Субъективными симптомами гиперкальциемии является слабость, тошнота вплоть до рвоты, жажда. Практически все эти симптомы у нашей пациентки наблюдались как в санатории, так и после.

Пациентке было предложено изменить диету, воздержаться от приема кальцийсодержащих продуктов и препаратов. Нами проведено повторное ретроспективное определение концентрации элементов. Динамика изменения концентрации элементов до и после отмены препаратов приведена в табл. 4 и на рис. 3. Видно, что в течение последующего полугодия наблюдалось восстановление концентрации кальция примерно до среднестатистического значения (с 4-й по 1-ю строку табл. 4; рис. 3: с 5-го по 1-й см от корней волос).

Таблица 4

Изменение концентрации элементов в волосах пациентки по длине за последний период исследований, мкг/г

Период времени	Al	Mg	Be	Ca	Fe	Cu	Zn
1	45,6	262,1	0,01	501,6	71,4	7,3	326,6
2	53,8	349,3	0,01	502,9	84,8	12,3	280,8
3	56,3	365,3	0,02	1164,5	67,0	22,7	343,4

Период времени	Al	Mg	Be	Ca	Fe	Cu	Zn
4	48,9	293,6	0,01	1070,1	58,5	7,8	331,2
5	88,9	266,7	0,01	3452,2	138,6	13,1	317,8
6	66,6	391,2	0,02	5365,4	44,9	18,1	263,5
7	97,7	442,2	0,02	8937,8	56,6	25,8	255,1
8	69,2	396,9	0,01	3452,7	59,1	44,2	244,9
9	53,6	281,1	0,02	1536,5	85,2	25,4	260,6
10	30,2	326,7	0,01	119,1	133,7	8,9	302,1
11	44,2	414,0	0,01	221,3	50,5	11,4	280,9
12	34,3	293,5	0,02	275,4	82,9	6,7	294,9
Среднее значение	57,7	340,7	0,01	221,6	77,7	16,7	291,2
Граница: нижняя	2,0	25,0	0,01	200,0	15,0	6,5	125,0
верхняя	40,0	120,0	0,05	1500,0	50,0	15,0	250,0

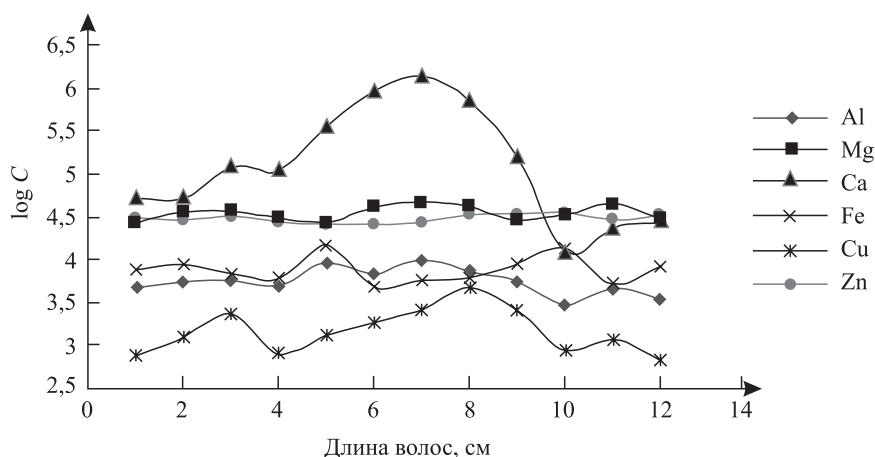


Рис. 3. Изменения концентрации жизненно необходимых элементов по длине волос

Через несколько месяцев после окончания приема кальцийсодержащих препаратов самочувствие пациентки стало заметно улучшаться и стабилизировалось. Таким образом, ретроспективный количественный анализ содержания макро- и микроэлементов позволил выявить и устранить одну из доминирующих причин недомогания пациентки.

В результате исследований методом АЭС из небольшой навески пробы выполнено одновременное многоэлементное количественное определение алюминия, кальция, магния, цинка, меди, железа и бериллия. Разработанная методика позволяет дать не только общую, но и ретроспективную оценку количественного содержания элементов по длине волос методом многоканальной АЭС.

Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий. Из этого следует, что научные исследования могут быть перенесены в область профессиональной деятельности и помочь медицинскому контролю здоровья. Используя разработанную методику, можно получить четкую картину содержания элементов в организме, рекомендовать разумное сочетание элементсодержащих препаратов и продуктов, чтобы добиться оптимальной коррекции микроэлементного статуса организма.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Методические указания по спектральным методам определения микроэлементов в объектах окружающей среды и биоматериалах при гигиенических исследованиях / Главное санитарно-эпидемиологическое управление М-ва здравоохранения СССР. 1987. № 42-46-87.
2. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах масс-спектрометрией с индуктивно связанной аргоновой плазмой : метод. рекомендации / Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. М., 2003.
3. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах атомной спектрометрией с индуктивно связанной аргоновой плазмой : метод. рекомендации / Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. М., 2002.
4. Определение химических элементов в биологических средах : метод. указания / Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. М., 2003.
5. Другов Ю. С., Родин А. А. Пробоподготовка в экологическом анализе. СПб., 2002. С. 651.
6. Окина О. И., Ляпунов С. М., Горбунов А. В. Использование микроэлементного состава волос в экологических и медицинских исследованиях // Экология человека. 2009. № 4. С. 45–51.

7. Скальный А. В., Демидов В. А. Элементный состав волос как отражение сезонного колебания обеспеченности организма детей макро-, микроэлементами // Микроэлементы в медицине. 2001. Т. 2, вып. 1. С. 36–41.
8. Скальный А. В. Референтные значения концентрации химических элементов в волосах, полученные методом ИСП-АЭС // Микроэлементы в медицине. 2003. Т. 4, вып. 1. С. 55–56.
9. Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. М., 1991.
10. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М., 2004.
11. Нестерова Д. В. Ваш домашний доктор. Расшифровка анализов без консультации врача. М., 2001.
12. Смоляр В. И. Гипо-, гипермикроэлементозы. Киев, 1988.

Поступила в редакцию 20.08.2014.

Мария Петровна Патапович – аспирант кафедры лазерной физики и спектроскопии. Научный руководитель – доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерной физики и спектроскопии А. П. Зажогин.

Ирина Дмитриевна Пашиковская – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Республиканского научно-практического центра неврологии и нейрохирургии.

Жанна Игнатъевна Булойчик – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры физической оптики.

Галина Трофимовна Маслова – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных.

Анатолий Павлович Зажогин – доктор физико-математических наук, профессор кафедры лазерной физики и спектроскопии.