РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСАХ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

Л. С. Мезга¹, В. С. Кульбацкий², Ю. Г. Походня²

¹Белорусский государственный университет, г. Минск

²Учреждение Здравоохранения "Национальная антидопинговая лаборатория", г. Минск;

lilyamezga@gmail.com, v.kylbatskiy@antidoping.by;

науч. рук – Ю. Г. Походня, канд. биол. наук, доц.;

соруk. – Е. Б. Окаев, канд. хим. наук, доц.

Проведение элементного анализа волос позволяет с высокой степенью надежности выделить группы риска заболеваний, связанных с избытком или недостатком микроэлементов, и своевременно принять профилактические меры. Для разработки методики количественного определения в качестве анализируемых микроэлементов были выбраны цинк (Zn), мышьяк (As), железо (Fe), медь (Cu). В настоящей работе была разработана методика количественного определения микроэлементов в волосах человека методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Образец волос отмывали по двум методикам, анализу также подвергался образец без отмывки. Для минерализации был выбран метод разложения с использованием микроволновой системы. Было доказано отсутствие мешающего влияния совместного нахождения аналитов и установлен предел количественного определения.

Ключевые слова: ИСП-МС, микроэлементы, элементный состав волос

ВВЕДЕНИЕ

Организм человека состоит из большого количества элементов. Предполагается, что оптимальное содержание их в организме уменьшает вероятность развития заболеваний. В настоящее время в медицинской практике уделяется недостаточное внимание контролю элементного баланса в организме ввиду трудоемкости анализов и большого количества воздействующих факторов, в связи с чем прибегают к мониторингу в случае существующей проблемы [1]. Своевременное выявление элементного дисбаланса позволит проводить мониторинг функционального состояния организма человека, предупреждать развитие осложнений и рецидивов у пациентов, уже страдающих от нарушений функций организма.

Для элементного анализа в клинической диагностике используются различные биологические образцы человека, каждый из которых имеет свой ряд преимуществ и недостатков. Наиболее перспективным биообразцом являются волосы, так как характеризуются стабильной динамикой роста и накоп-

ливают в себе информацию о процессах метаболизма, имевших место в организме за определенный срок, в связи с чем можно установить приблизительный период воздействия какого-либо элемента. Волосы не требуют особых условий для хранения, а содержание микроэлементов остается постоянным с течением времени. Кроме того, достоинствами элементного анализа по волосам являются полная неинвазивность и нетравматичность метода.

Согласно литературным данным [2-5], на территории Беларуси наиболее часто встречаются заболевания, связанные с дефицитом кальция, калия, цинка, железа, йода, селена, меди, мышьяка, свинца и кадмия. Для исследования, описанного далее в этой работе, были выбраны эссенциальные и условно эссенциальные микроэлементы, которые имеют большую значимость для организма человека. Содержание цинка, железа, меди и мышьяка в волосах коррелирует с содержанием этих микроэлементов в организме [6-7], что делает их идеальным объектом для анализа.

Большая часть методик элементного анализа волос была разработана для ААС и АЭС, однако в настоящее время масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой является предпочтительным аналитическим методом из-за ее многоэлементности, высокой чувствительности, способности измерять широкий диапазон концентраций, а также достаточно высокой скорости анализа. Отдельно стоит отметить, что на территории Беларуси такие исследования не проводятся.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения эксперимента образец волос был отобран у одного добровольца, перед сбором образца волосы мылись шампунем, более чем месяц не подвергались химической обработке, не красились. Измельчение образца проводилось стальными ножницами, предварительно очищенными последовательно метанолом, а затем пентаном. Данные органические растворители были выбраны для очистки ножниц, так как они позволяют последовательно избавиться от органических и неорганических загрязнений, которые обладают гидрофильными и гидрофобными свойствами.

Шампунь не дает гарантии, что были устранены все экзогенные загрязнители, а также есть вероятность, что в составе шампуня содержались исследуемые аналиты, поэтому основные этапы пробоподготовки включают отмывку образца и минерализацию. Отмывку образца проводили по двум методикам: для более мягкой отмывки (методика №1) в качестве промывочной смеси выступал ацетон, для более глубокой отмывки применяли смесь диэтилового эфира с ацетоном в соотношении 3 к 1 (методика №2). Также проводили анализ образца без отмывки.

Для минерализации образца волос не подходит открытая минерализация из-за высокой летучести мышьяка, поэтому был выбран метод разложения в микроволновой системе. Минерализация считалась успешной в случае отсутствия остатков образца после разложения. После минерализации проба представляла собой бесцветный и прозрачный раствор, без осадков и помутнений.

По результатам эксперимента, проведенного с использованием метода стандартных добавок, было обнаружено большое различие между коэффициентами наклона внутренней и внешней калибровок, что, вероятнее всего, было вызвано сильным влиянием матричного эффекта. Для минимизации возможных отклонений нами был проведен повторный эксперимент с использованием метода стандартных добавок совместно с методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был выбран раствор с ионами скандия.

Для доказательства отсутствия мешающего взаимного влияния интерференции выбранных аналитов в рамках одной аналитической серии были проанализированы образцы мышьяка, железа, меди, цинка с известными концентрациями и образец, содержащий все выбранные аналиты. Значения отклонений относительной интенсивности для всех аналитов составили не более 5%, что говорит о специфичности методики.

Для оценки чувствительности разрабатываемой методики необходимо было определить предел количественного определения (ПКО) анализируемого соединения. Нами был выбран метод определения ПКО по отношению сигнал/шум. В рамках одной аналитической серии были проанализированы холостой и калибровочные образцы, в качестве растворителя была использована 2%-ная азотная кислота. ПКО рассчитывался из уравнений калибровочных графиков для соответствующих элементов, за сигнал шума был принят холостой опыт (Таблица 1).

Таблица 1

Значения относительных интенсивностей и рассчитанные значения ПКО

Элемент	As	Fe	Cu	Zn
Относительная интенсивность сигнала элемента в холостом образце	0,001286	1,006094	0,190063	2,911708
Относительная интенсивность сигнала элемента в холостом образце x10	0,012864	10,06094	1,90063	29,11708
Рассчитанное значение ПКО, нг/г	1	30	30	80

Количество независимо проведенных опытов n=1.

Данный метод является приблизительным, для более точного определения предела количественного определения требуется провести большее количество измерений и использовать более строгие методы расчета: по

стандартному отклонению аналитического сигнала и наклону градуировочной кривой, по стандартному отклонению холостой пробы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был произведен анализ трех серий образцов с тремя повторами: три образца волос, отмытых по методике №1; три образца волос, отмытых по методике №2; три образца волос без отмытки (Таблица 2).

Концентрации аналитов, полученные при анализе серии образцов по методике №2, оказались меньшими, нежели концентрации серии образцов, полученные по методике №1. Методика №1 занимает гораздо меньшее время и является менее трудозатратной, а также требует меньшего количества дорогостоящих реактивов. Получилось правильно подобрать количество вносимых добавок стандартных образцов для построения калибровочного графика, рассчитанные значения концентраций попали в построенную калибровку, что говорит о достаточно высокой точности полученных значений.

Таблица 2

Значения полученных концентраций аналитов различных серий испытываемых образцов

Метод №1				
Номер образца Аналит	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Сред. знач.
	мкг/г	мкг/г	мкг/г	мкг/г
Fe	13,11	8,83	12,77	11,57
Cu	25,41	15,46	16,80	19,22
Zn	470,67	330,69	335,97	379,08
As	0,0077	0,0062	0,0082	0,0073
Метод №2				
Номер образца Аналит	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Сред. знач.
	мкг/г	мкг/г	мкг/г	мкг/г
Fe	11,09	9,50	9,37	9,99
Cu	15,01	15,54	16,59	15,72
Zn	319,89	339,68	333,21	330,93
As	0,0031	0,0087	0,0083	0,0067
Без отмытки				
Номер образца Аналит	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Сред. знач.
	мкг/г	мкг/г	мкг/г	мкг/г
Fe	15,72	14,66	12,13	14,17
Cu	22,39	19,38	19,57	20,45
Zn	450,50	394,09	389,62	411,41
As	0,013	0,015	0,011	0,013

При проведении анализа были выявлены некоторые проблемы. Во-первых – невозможность разделения этапов, когда устранены все эндогенные загрязнения и начинают вымываться экзогенные. Таким образом, методика более глубокой отмывки образца может давать ложные значения. Во-вторых – сложность сопоставления с референтными значениями, так как неизвестно, при каких условиях проходил анализ для их установления. И в-третьих – недостаточное измельчение образца, из-за чего в каждой серии образцов между повторами есть достаточно большое отклонение. Для его снижения требуется специальное оборудование, которое измельчает волосы в порошок. Способы устранения выявленных проблем будут изучаться в будущих работах, посвящённых данной тематике.

Таким образом, для подтверждения корректности разработанной методики количественного определения требуется либо наличие сертифицированного стандарта волос с известными концентрациями, либо участие в междулабораторных сличениях.

Библиографические ссылки

1. Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты / Под ред. Н. А. Гресь, А. В. Скального. – Минск : Харвест, 2011. – 352 с.
2. *Маленченко, А. Ф.* Элементный состав волос жителей Беларуси / А. Ф. Маленченко [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2009. – №1, 19. – С. 126-130.
3. *Петренко, С. В.* Изучение обеспеченности микроэлементами селена, йода, железа и цинка населения различных экологических регионов Республики Беларусь с высокими показателями заболеваемости щитовидной железы / С. В. Петренко [и др.] // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. – 2018. – № 4. – С. 109-118
4. *Гузик, Е. О.* Метод гигиенической оценки баланса химических элементов у детей (Региональный микроэлементный паспорт) / Е. О. Гузик [и др.] // Здоровоохранение и медицинская наука Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа : <http://med.by/methods/book.php?book=1550>. – Дата доступа: 08.04.2021
5. *Загорский, С. Э.* Элементный состав волос детей в возрасте 12–18 лет, проживающих в промышленно развитом мегаполисе (г. Минск) / С. Э. Загорский, Е. А. Синевич, С. Б. Мельнов // Здоровье для всех : материалы IV Международной научно-практической конференции, УО “Полесский государственный университет”, ч. 3. – Пинск : ПолесГУ, 2012. – С. 232 – 235
6. *Скальный А.В.* Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.
7. Лабораторная диагностика / под ред. Е. А. Кондрашевой, А. Ю. Островского. – 4-е изд., перераб и доп. – М.: Медиздат, 2018. – 720 с.