

МЕТОДИКА МИКРОВОЛНОВОГО РАЗЛОЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ОРГАНИЗМА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Вергун О.М.¹, Боровикова Л.Н.²

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Эссенциальные микроэлементы (Zn, Se, Fe, Cu, Mn и др.) являются эндогенными для человека, присутствие их в организме в микроколичествах необходимо и должно быть сбалансированным. При нарушении этого баланса, а также наличие условно токсических микроэлементов, солей тяжелых металлов в живом организме могут повлечь развитие патологических состояний, поэтому представляется необходимым количественная оценка элементарного состава. Поскольку микроэлементы находятся в связанном состоянии с белками крови и являются структурными компонентами клеток, то определить их количество возможно только полностью разрушив органическую структуру, для этого разработана методика подготовки проб биологических объектов (крови, мочи, волос) с помощью микроволновой минерализации.

Ключевые слова: микроэлементы и токсические металлы, микроволновая минерализация.

Введение. Количество металлов в организме современного человека зависит от биологических особенностей пола, возраста и индивидуальной чувствительности организма; строения и физико-химических свойств веществ, поступающих с пищей и водой, их количество; факторов внешней среды (температура, атмосферное давление, среда обитания). Возросшая нагрузка на организм, обусловленная широким производством вредных для человека химических продуктов, попадающих в окружающую среду, изменила иммунобиологическую реактивность населения, поэтому все чаще встает вопрос об определении количества микроэлементарного состава человеческого организма. Важным звеном является подготовка биологического материала как одной из сложных матриц. Задача эксперта состоит в умении выделить элемент, содержащийся в крайне низких концентрациях (мкг/л) из матрицы, при этом ничего не утратив. Ранее, когда для определения металлов и микроэлементов в организме использовались методы аналитической химии или дробный анализ [4], то для выделения металлов из биоматериала использовался метод минерализации или простого сжигания, при этом в ходе анализа свинец теряется до 42%, цинк — до 21%, марганец обнаруживается лишь в очень незначительном количестве, т. к. основная масса его — до 64% — терялась, соосаждаясь с железом и т. д. [2]. Сегодня к стадии пробоподготовки предъявляются такие требования, как скорость (эспрессность), минимальное влияние человеческого фактора, отсутствие потерь и загрязнений проб, воспроизводимость процедуры, автоматизация, документирование процесса, безопасность. Ситуацию коренным образом позволяет изменить современное микроволновое оборудование для полного разрушения органических веществ биологических объектов и сохранения микроэлементарного состава аналита [1].

Разработанная методика предназначена для подготовки крови, мочи и волос к исследованию с помощью микроволнового разложения биологического материала с использованием методом адсорбционной или эмиссионной спектроскопии на уровне концентраций соответствующей минимальному требуемому пределу обнаружения.

Цель работы — разработка методики микроволнового разрушения биологических объектов, обеспечивающей полное разрушение органических веществ с выделением микроэлементов и металлов для дальнейшей идентификации и количественного определения в организме человека.

В процессе разработки методики необходимо решить следующие задачи: подобрать температурные условия минерализации для крови, мочи и волос; установить режимы, микроволнового разрушения, обеспечивающие необходимую степень выделения определяемых веществ из биологической матрицы; установить порядок вскрытия тefлоновых патронов, минерализованных биообъектов;

Материалы и методы. Материалом исследования являются биологические жидкости человеческого организма: кровь, волосы, моча. Поскольку «металлические» яды способны накапливаться в организме и выводятся из организма в связанном виде в процессе биотрансформации постепенно, для мочи необходимы особые условия отбора материала: 100 мл из суточного сбора мочи. Кровь (4 мл) отбирается в пробирку с антикоагулянтом. При токсическом воздействии металлов на организм волосы (0,25 г) необходимо состричь с учетом периода взаимодействия с ксенобиотиками и скорости роста волос (окрашенные волосы значительно искажают результаты исследования).

- реактивы: стандартные образцы «ICP multi-element standard solution IV CertiPUR» 1000 mg/l (23 elements) компании Merck Millipore (Франция, Германия); азотная кислота 65% Iso для спектрального анализа компании Merck Millipore (Франция, Германия); перекись водорода 30% для спектрального анализа Aqueous Solution компании Merck Millipore (Франция, Германия); Деионизированная вода и с низким содержанием углерода;

- микроволновая печь «Milestone» START D (Microwave digestion system);

- весы лабораторные аналитические. Предел взвешивания не менее 210 г, класс точности 1, точность взвешивания не менее 0,00001 г (0,01 мг). Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими метрологическими характеристиками. Средства измерения должны пройти метрологическую поверку в установленные сроки.

- лабораторная посуда: цилиндры мерные лабораторные на 10; 50 и 100 мл; дозатор переменного объема (Thermo scientific) вместимостью 0,1; 0,5; 1; 2; 5 мл; пипетка для отбора растворителей (Колор); шприцы медицинские вместимостью 5 мл (ТУ ВУ 400063552.001-2005); пробирки на 15 и 10 мл (ГОСТ 1770-74); виалы (герметичные флаконы) на 2 мл и 1 мл, Shimadzu (Япония); тефлоновые стаканы Shimadzu (Япония).

Условия для подготовки проб: для получения конечного результата необходимо обеспечить следующие стандартные условия в помещениях лаборатории: температура воздух — $+20\pm 5$ С; атмосферное давление — 84–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.); влажность воздуха 70 ± 5 % при 20 ± 2 °С; напряжение питающей сети 230 ± 23 В; частота переменного тока 50 ± 1 Гц. Или иных обоснованных условиях выполнения измерений, если это требуется.

Результаты и их обсуждение. Среди ксенобиотиков важное место занимают тяжелые металлы и их соли, которые в больших количествах выбрасываются в окружающую среду. Основным путем поступления тяжелых металлов в организм является желудочно-кишечный тракт, который наиболее уязвим к действию техногенных экотоксикантов. В силу этого на токсическое действие металлов, как и других ядов, большое значение имеют их транспорт, распределение, способность накапливаться в определенных органах и тканях, концентрация в месте действия, метаболизм, скорость и пути выделения [3].

Вопросы метаболизма ядов, имеющие большое значение для понимания действия органических веществ, мало изучены в отношении металлов. Однако некоторые данные о превращении металлов в живом организме все же имеются. Известны происходящие в организме восстановительные процессы, при которых металлы и неметаллы из состояния высшей валентности переходят в состояние низшей валентности. Резорбция и распределение, а также выделение металлов, как и вообще экзогенных ядов, в конечном итоге схематически представляют как ряд процессов распределения между внешней средой и биосредами. Соли металлов как хорошо растворимые и диссоциирующие соединения, попадая в организм, распадаются на ионы. Скорость и полнота резорбции зависят от соотношения между ионизированной и неионизированной частью молекулы. Металлы высшей валентности и т. н. тяжелые металлы, склонные к образованию очень трудно растворимых гидроокислов, фосфатов, альбуминов или весьма стойких комплексов, плохо всасываются из желудочно-кишечного тракта или при любых других путях введения. Поэтому важно правильно выбрать объект исследования и комплексно исследовать концентрацию металлов в различных биосредах.

В химико-токсикологической лаборатории УЗ «ГК БСМП» г. Минска на имеющемся в наличии атомно-абсорбционном спектрофотометре АА-6300 «Shimadzu Corporation» при микроволновом разложении биоматериала выполнены исследования на следующие микроэлементы: марганец, цинк, мышьяк, олово, барий, талий (таблица 1).

Таблица 1. — Количество выполненных анализов за период 2012–2015 гг.

Год	Количество доставленных биопроб	Количество исследований по микроэлементам					
		марганец Mn	цинк Zn	мышьяк As	олово Sn	барий Ba	талий Tl
2012	6	3	5	3	2	3	1
2013	75	39	47	70	43	31	57
2014	81	76	77	80	6	72	63
2015 (5 мес.)	25	19	23	19	4	19	21
Итого	187	137	152	172	55	125	142

При традиционной минерализации смесью концентрированных серной и азотной кислотами и микроволновым разрушением проб оказалось потеря марганца, цинка и бария, при микроволновом разрушении биоматрицы потерь не наблюдалось.

Достоверность спектрального анализа определяется многими факторами, наиболее существенными из которых являются подготовка и ввод образцов, а также чистота используемых реагентов и посуды. Высокотехнологичные, производительные современные спектральные приборы атомной абсорбции и атомной эмиссии с индуктивно-связанной плазмой требуют качественно подготовленные, очищенные, сконцентрированные пробы для исследования, а традиционные методы — минерализация кислотами или сухое озоление — устарели и дав-

но не соответствуют уровню спектрального оборудования. Время, необходимое для полной традиционной минерализации биологического материала, определяется в основном температурой, которая при нагревании не может быть выше температуры кипения используемой в реакции кислоты. Процесс может занимать часы и не гарантирует отсутствия потерь летучих элементов из объема пробы, также как и загрязнения пробы извне [2, 3]. Предлагаемая методика значительно сократит время подготовки пробы и сведет потери микроэлементов к минимуму.

Подготовка проб для исследования: в тefлоновый патрон с соблюдением установленной последовательности вносят:

- кровь (0,75 мл), 4 мл — 65% азотной кислоты, 1 мл — 30% перекиси водорода;
- моча (1,25 мл), 4 мл — 65% азотной кислоты;
- волосы (навеску 0,25 г), 5 мл — 65% азотной кислоты.

Затем тefлоновый патрон закрывается тefлоновой крышкой, фиксируется ограничительным кольцом сверху и с помощью специального ключа герметично завинчивается до характерного щелчка в держателе патронов. Герметично закрытый патрон устанавливается в микроволновую печь, разложение биоматериала происходит наиболее эффективно за счет повышения температуры при повышенном давлении в закрытых системах и увеличения подвижности частиц в поле. Для контроля парообразования в микроволновую печь устанавливается патрон с водой и патрон с исследуемыми жидкостями, задается индивидуальная программа (подобранная экспериментально) для каждого вида биологического объекта (таблицы 2–4).

Таблица 2. — Программа микроволнового разложения для крови

Этапы	Время, мин	Температура, °С	Мощность, Ватт
1	2	85	1000
2	4	135	1000
3	5	230	1000
4	15	230	1000

Таблица 3 — Программа микроволнового разложения для мочи

Этапы	Время, мин	Температура, °С	Мощность, Ватт
1	10	200	1000
2	10	200	1000

Таблица 4 — Программа микроволнового разложения для волос

Этапы	Время, мин	Температура, °С	Мощность, Ватт
1	10	200	1000
2	20	200	1000

После проведения программы микроволнового разложения биологических сред пробу оставляют на 12 ч для охлаждения и конденсации. Затем в вытяжном шкафу при включенной вытяжной вентиляции, производят вскрытие патрона. Несколькими миллилитрами деионизированной воды (с учетом разведения) смывают капельки конденсата в патрон.

Полученный раствор отбирают, переносят в пробирку со шлифом, дополнительно разводят (при необходимости) и используют для исследования на высокотехнологическом оборудовании (раствор при этом приобретает окраску от желтой до зеленоватой). Проводят количественное определение (с учетом разведения) металлов и микроэлементов в биологическом материале.

Заключение. Подготовка биоматериала с помощью микроволнового разложения (СВЧ-минерализация) имеет колоссальное значение для обнаружения металлических ядов и микроэлементов в биологических средах человеческого организма, поскольку значительно сокращает время протекания реакции и расход реактивов, полностью разрушает биологический материал, высвобождая металлы и микроэлементы, сокращая потери.

Закрытые системы позволяют предотвратить потери летучих элементов, загрязнение образца из атмосферы, уменьшают расход кислот, задерживают пары кислот, угрожающих безопасности и здоровью оператора, процесс протекает в автоматическом режиме без контроля оператора.

Литература

1. Башилов, А. Микроволновая подготовка проб к элементному анализу — вчера, сегодня, завтра / А. Башилов // Аналитика. — 2011. — № 1. — С. 6–14.
2. Крылова, А.Н. Дробный анализ в медицине и перспективы его применения в судебной химии / А.Н. Крылова // Суд.-мед. экспертиза. — 1958. — № 4. — С. 26–30.
3. Скальный, А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный. — М.: Изд. дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. — 216 с.
4. Тананаев, Н.А. Дробный анализ: Качественные реакции и анализ неорганических соединений дробным методом / Н.А. Тананаев. — М.; Л.: Гос. научно-техн. изд-во хим. лит., 1950. — 248 с.

5. Black, M.S. Determination of metal chelates by inductivity coupled plasma atomic emission spectrometry and applied to biological materials / M.S. Black, H.B. Thomas, R.R. Browner // An. Chem. — 1981/ — Vol. 53, № 14. — P. 22–34.

METHODS MICROWAVE DECOMPOSITION BIOLOGICAL OBJECTS OF HUMAN BODY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HEAVY METALS AND MICROELEMENTS

Viarhun O.M.¹, Borovikova L.N.²

¹Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;

²Institution of Health “City Clinical Hospital Ambulance”, Minsk, Republic of Belarus

For the study of trace elements and metal poisons that may be present in the body in a bound state with the protein in the blood must completely destroy the organic structure, for this we have developed a technique of preparation of samples for blood, urine, hair.

Preparation of biological material by microwave decomposition (microwave mineralization) is of paramount importance for the study of detection of metal poisons and trace elements in biological fluids of the human body, as greatly reduces the reaction time and consumption of reagents, completely destroys the biological material, releasing metals and minerals.

Closed systems can prevent the loss of volatile components, contamination of the sample from the atmosphere, reduce the consumption of acids, acid vapors detain, threaten the security and health of the operator, the process takes place automatically, without operator control.

Keywords: trace elements and toxic metals, microwave mineralization.