

УДК 577.118-074

Л.Г. Лисецкая

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ АНАЛИЗА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В БИОСРЕДАХ

АФ НИИ медицины труда и экологии человека ГУ НЦМЭ ВСНЦ СО РАМН (Ангарск)

В работе рассмотрены проблемы аналитического процесса при изучении микроэлементного состава биосред человека. Обсуждаются особенности данного вида исследования. Определяются методологические подходы для получения адекватных результатов. Показана перспективность применения современных инструментальных методов анализа. Правильный выбор метода анализа с учетом его достоинств позволяет оптимизировать планирование исследований. Особое внимание уделено обеспечению достоверности элементного анализа.

Ключевые слова: микроэлементы, биосреды, анализ

METHODOLOGICAL ISSUES OF MICROELEMENT ANALYSES IN BIOMATERIALS

L.G. Lisetskaya

Research Institute of Industrial Medicine and Human Ecology, SC ME ESSC SB RAMS, Angarsk

In this work the problems of analytical process in study of microelement composition in human biomaterials are considered. The features of the study are discussed. Methodological ways to get adequate results are determined. The perceptiveness of using modern instrumental analytical methods is indicated. A correct choice of method of analysis with taking into account its dignities allows to optimize planning the ways of study. Securing the significance of element analyses is considered to be of a special attention.

Key words: microelements, biomaterials, analysis

В общем виде уровни содержания микроэлементов в организме «условного» человека и его биосубстратах определены в ряде фундаментальных исследований 60 – 70-х гг. [1, 8]. Эти предварительные данные получены с применением сложных, дорогостоящих и, зачастую, уникальных методов (спектральных, ядерно-физических). В последующие годы накоплен значительный фактический материал о роли и значении сбалансированного обеспечения микроэлементами тканей организма в поддержании гомеостаза. В связи с этим, особый интерес представляют поступление, абсорбция, метаболизм и выведение микроэлементов из организма. В системе гигиенического мониторинга и диагностических исследований отсутствует единый подход к решению всего комплекса задач, стоящих перед аналитиками.

Международный опыт мониторинговых исследований свидетельствует, что в большинстве случаев результаты аналитических измерений трудно

сравнивать между собой из-за различия применяемых методов, условий отбора, хранения и подготовки проб. Комитетом по улучшению окружающей среды (CEI) Американского химического общества разработаны рекомендации по выбору методов и выполнению аналитических измерений, регламентирующие основные этапы аналитического процесса при изучении микроэлементного состава природных объектов окружающей среды [10]:

- ✘ планирование общей программы исследований и аналитических измерений;
- ✘ контроль качества аналитических измерений;
- ✘ условия пробоотбора, пробоподготовки и количество анализируемых проб;
- ✘ условия выполнения аналитических измерений и оценки метрологических характеристик применяемых методик (предел обнаружения, воспроизводимость, уровень контрольного опыта и др.);
- ✘ документация и представление результатов.

Нами сделана попытка обосновать методологические основы определения микроэлементов в биосубстратах, используя указанные рекомендации [10].

Методологические аспекты анализа микроэлементов в биосубстратах включают два направления:

1. Выбор адекватного метода анализа;
2. Метрологическое обеспечение анализа.

В свою очередь, метрологическое обеспечение анализа подразумевает следующее:

- ✦ наличие метрологической базы;
- ✦ анализ погрешностей;
- ✦ обеспеченность стандартными образцами;
- ✦ контроль качества аналитических работ.

Прежде чем приступить к разработке методологических основ анализа микроэлементов в биосубстратах, необходимо определить особенности данного вида исследований. Их обуславливает характер изучаемого объекта. Объектом исследования является концентрация химических веществ в различных пробах биологического происхождения. Это определяет особенности данного вида исследований. К ним относятся:

- ✦ объем пробы;
- ✦ время хранения пробы;
- ✦ состав матрицы;
- ✦ концентрация определяемых компонентов;
- ✦ количество определяемых элементов в пробе.

ОБЪЕМ ПРОБЫ

Количество биологического материала, которое можно взять на анализ у живого человека, часто ограничено. Количество крови, спинномозговой жидкости и других проб составляет не более 10 г. У маленьких детей эти количества еще меньше. Моча и волосы взрослых людей могут быть представлены в большом объеме. Поэтому при выборе метода анализа всегда надо сопоставлять три наиболее важных фактора: объем пробы, ожидаемое содержание в ней определяемого компонента и чувствительность выбранного метода анализа.

ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ ПРОБЫ

Долговременному хранению могут подвергаться только твердые биоматериалы (волосы, ногти, зубы). Даже для кратковременного хранения жидких проб необходимо их консервирование. Причем, поскольку речь идет об определении микроколичеств элементов, особое внимание необходимо уделять качеству консервирующего вещества и процессам сорбции и десорбции материалом применяемой посуды.

Основной реагент для минерализации биопроб — азотная кислота квалификации хч (химически чистая) — нормируется в основном только по анионам [5]. Из катионов предполагается наличие свинца в количестве не более 0,00002 %, мышьяк 0,000001 %, железо 0,0003 %. На фоновом уровне содержание свинца в моче составляет 0,000001 %, железа — 0,00001 %, т.е. свинца на 1 порядок, а железа — на 2 порядка меньше. Осталь-

ные металлы не нормируются. Нами определялись большие количества цинка в применяемой азотной кислоте.

Имеются данные [2], что при хранении подкисленной пробы в полиэтиленовой посуде происходит загрязнение цинком, а в тефлоновых емкостях — свинцом. Из-за пыли в лабораторном помещении наиболее вероятно загрязнение хромом, марганцем и свинцом [13]. Кровь и образцы тканей могут сильно контаминироваться хромом, содержащимся в иглах, ножах и других инструментах [11]. С другой стороны, хром в низких концентрациях может адсорбироваться на поверхности сосуда при длительном хранении [8].

СОСТАВ МАТРИЦЫ

Большое значение при определении микроэлементов в биосубстратах человека имеет влияние матрицы. Как правило, биологические образцы отличаются сложным составом и большей вариативностью матрицы. Для уменьшения влияния матрицы на анализ, ее необходимо устранять или разрушать. При этом возникают дополнительные источники погрешности, зависящие от конкретной методики пробоподготовки.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ОПРЕДЕЛЯЕМОГО КОМПОНЕНТА В ПРОБЕ

Сегодня при анализе биопроб в большинстве случаев определяют достаточно низкие концентрации элементов, соизмеряемые с фоном, с присутствием этих элементов в воздухе, воде, в земной коре, в применяемых реактивах, используемой посуде. Отклонение результатов определения содержания микроэлементов в сторону завышения или занижения истинного значения может быть связано с двумя факторами — загрязнением и возможными потерями вследствие выпаривания или образования тугоплавких соединений в процессе приготовления пробы. Загрязнение представляет серьезную проблему при измерении низких концентраций в крови и моче. Например, концентрация хрома в лабораторной пыли может достигать 70 мг/кг [12]. Иными словами, загрязнение 1 мл пробы мочи всего лишь 1 мкг пыли увеличит концентрацию хрома в два раза. Для решения этой проблемы необходимо соблюдать специальные меры предосторожности, предложенные Tolg [14]. Вторая проблема связана с тем, что определенные методы подготовки проб, такие как нагрев или кислотное разложение в открытых системах, могут привести к потере заметных количеств микроэлементов. Следовательно, для уменьшения потерь пробоподготовку необходимо вести в закрытых системах.

КОЛИЧЕСТВО ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРОБЕ

Из 92 встречающихся в природе элементов 81 обнаружен в организме человека [1]. Первые 20 элементов периодической системы Д.И. Менделеева являются основными или «структурными». 15 элементов, относящихся к микроэлементам, при-

знаны эссенциальными, т.е. жизненно необходимыми. Еще несколько являются «серьезными кандидатами на эссенциальность». Постоянно появляются новые данные о роли того или иного микроэлемента в различных физиологических процессах. На сегодняшний день существует около 20 приоритетных микроэлементов, и их количество постоянно пополняется.

ВЫБОР МЕТОДА АНАЛИЗА

Важнейшим элементом планирования программы является выбор рациональной схемы анализа, учитывающей чувствительность методов, точность, скорость и стоимость анализа. Не менее важным является условие надежной воспроизводимости всех процедур и доступности применяемых методик, приборов и реактивов. Эти условия необходимы для регулярных наблюдений типа мониторинга, т.е. рассчитанных на длительный период. Их выполнение призвано сохранить единообразие методических процедур, а стало быть, сопоставимость результатов. Решение названных аналитических задач возможно лишь при использовании комплекса инструментальных методов, так как ни один из существующих методов в отдельности не удовлетворяет всем требованиям к пределу обнаружения, селективности и экспрессности.

В литературе описаны фото- и спектрофотометрические, полярографические, потенциометрические методы анализа микроэлементов в биосубстратах. Анализ описанных методов показал, что все они не удовлетворяют современным требованиям, предъявляемым к методикам. Общим недостатком этих методов является отсутствие данных о наиболее важных метрологических характеристиках — пределе обнаружения, диапазоне измеряемых концентраций, не говоря уже об оценке погрешностей. Во многих случаях металлы в крови и моче определяются фотометрически без минерализации пробы, хотя известно, что в сложных пробах фотометрическое определение металлов неселективно.

В настоящее время при микроэлементном анализе используются методы атомно-эмиссионного анализа (АЭА) с дуговым и плазменным (ICP-AES) возбуждением; атомно-абсорбционный анализ (ААА) с пламенной и электротермической атомизацией (ПА и ЭТА); инструментальный нейтронно-активационный анализ (ИНАА) и масс-спектрометрический с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) [9]. Эти методы в наибольшей степени отвечают требованиям к пределу обнаружения, точности, скорости и экономичности.

Низкими пределами обнаружения для большинства элементов обладает инструментальный нейтронно-активационный метод. Кроме того, этим методом возможно определение до 30 элементов, снижена вероятность загрязнения за счет отсутствия этапа химического разложения пробы (недеструктивный метод). Высокой чувствительностью обладает и масс-спектрометрический метод элементного анализа, источником ионов в ко-

тором служит индуктивно связанная плазма. Недостатком обоих указанных методов является необходимость сложного оборудования и высокая стоимость анализов.

Атомно-эмиссионный анализ (АЭА) с дуговым возбуждением — наиболее старый среди методов многоэлементного эмиссионного анализа, получил широкое применение благодаря относительной простоте операций, экономичности и доступности. Основным достоинством АЭА является возможность одновременного определения с довольно высокой чувствительностью большого числа элементов. В оптимальных условиях при количественном анализе обычно определяют 10–15 элементов из одной пробы. Недостатком метода является сравнительно плохая воспроизводимость результатов, обусловленная нестабильностью дугового источника. Нестабильность дугового источника возбуждения устранена в моделях с индуктивно связанной плазмой (ICP). В настоящее время это самый передовой метод в аналитической химии. По своим возможностям он уступает только хроматомасспектрометрии. Однако биологические ткани являются наиболее сложными объектами АЭА в смысле селективности и достижения низких пределов обнаружения. Это объясняется составом матрицы препаратов, содержащих в высоких концентрациях соединения кальция. Поэтому анализ проб без одновременного использования аттестованных стандартных образцов тканей не имеет смысла. В то же время количество стандартных образцов биологических материалов, аттестованных на необходимый набор микроэлементов, ограничено проблемами их адекватности анализируемым пробам и сохранения их стабильности во времени.

Атомно-абсорбционный анализ (ААС) отличается высокой чувствительностью и избирательностью. Высокая чувствительность достигается тем, что элемент в атомизаторе при температуре 2500–3500 °С превращается в атомный пар. В этом температурном интервале почти все атомы находятся в основном (невозбужденном) состоянии, при котором значение сигнала абсорбции слабо зависит от температуры и оказывается достаточно высоким. Для атомно-абсорбционной спектрометрии характерна гораздо меньшая вероятность совпадения спектральных линий разных элементов и соответственно более высокая селективность определений. Кроме того, для ламп с полым катодом характерны весьма простые спектры, имеющие малый фон. Возможности ААС ограничены, прежде всего, одноэлементным характером анализа и недостаточными пределами обнаружения для наиболее распространенного варианта с плазменным возбуждением. Применение электротермической атомизации снижает пределы обнаружения на 1–2 порядка. Важнейшим условием для получения правильных результатов является учет неселективного поглощения (коррекция фона).

Пределы обнаружения разными инструментальными методами представлены в таблице 1.

По результатам определения наиболее жизненно важных эссенциальных микроэлементов (Fe, Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Mo), а также основных токсикантов (Hg, Pb, Cd) в биосубстратах, проведенных разными аналитиками различными инструментальными методами, нами определен диапазон ожидаемого содержания микроэлементов в крови, моче, волосах, грудном молоке (табл. 2).

Оценив пределы чувствительности методов, количество определяемых элементов, тип образцов, возможное количество пробы и стоимость анализов, следует допустить, что при проведении гигиенического мониторинга более приемлемым методом является атомно-эмиссионный анализ, т.к. он позволяет с меньшими затратами времени и количества биологического материала получить данные о большем числе элементов, хотя и с меньшей точностью. Атомно-абсорбционный метод лучше применять при более углубленных исследованиях с относительно небольшим количеством проб. Этим методом предусмотрены несколько вариантов условий проведения анализа. Применение электротермического атомизатора позволяет повысить чувствительность на 1–2 порядка. Ис-

пользуя разную температуру пламени можно в некоторых случаях уменьшить влияние фонового поглощения и тем самым повысить селективность определения. Таким образом, сочетание различных ААС-методов позволяет проводить определения в более широком диапазоне концентраций.

Метрологическое обеспечение представляет собой систему оценки результатов проведения аналитических работ. Общепринятое определение метрологии дано в МИ 2247-93: «метрология – наука об измерениях, методах, средствах обеспечения их единства и способах достижения требуемой точности» [3].

Поскольку на основании полученных данных часто принимаются ответственные заключения и выводы, экспериментально найденные значения должны максимально приближаться к действительным и содержать приближенную оценку истинного значения величины, найденную путем измерения. Если результаты измерения не содержат их оценку, нельзя судить о качестве этих измерений. Оценка результатов проведения аналитических работ является предметом метрологического обеспечения методики. Метрологическое

Таблица 1

Пределы обнаружения элементов разными методами (мкг/л)

Элемент	АЭА-ИСР	ААС с пламенным атомизатором	ААС с электротермическим атомизатором	Нейтронно-активационный анализ
Железо	1,5	50	3	10
Медь	2	30	0,5	3
Цинк	0,9	8	0,35	1
Кобальт	0,1	10	5	0,05
Марганец	0,3	20	1,5	0,4
Хром	4	50	3,5	0,4
Молибден	4	300	0,35	0,6
Ртуть	13	0,3*	–	1
Свинец	14	10	0,3	–
Кадмий	1,5	10	0,01	1

Примечание: * – метод «холодного» пара.

Таблица 2

Диапазон ожидаемого содержания элементов в биосубстратах

Элемент	Моча (мкг/л)	Кровь (мкг/л)	Волосы (мкг/г)	Молоко (мкг/л)
Железо	100–600	600–1600	11–40	20–4500
Медь	32–100	500–1000	9–55	200–700
Цинк	200–600	4800–12800	80–230	390–9800
Кобальт	–	4–35	0,05–5	–
Марганец	40–70	0–500	200–3000	следы
Хром	1–170	0,075–0,16	0,5–0,9	следы
Молибден	–	0–10	–	следы
Ртуть	2–50	6–50	0,5–50	1,6
Свинец	10–70	140–290	6–26	10–180
Кадмий	1–20	2–5	0,1–3,5	2–19

обеспечение методики определяет достоверность результатов химического анализа.

Метрологическая база представляет собой наличие системы аттестованных методик. В настоящее время под аттестованной методикой анализа понимают не только описание процедуры анализа, но и экспериментально оцененные погрешности во всем диапазоне определяемых концентраций. Причем необходимо рассчитать не только суммарную погрешность, но и по всем ее структурным компонентам, т.е. систематическую и случайную составляющие. Способы оценивания характеристик погрешности должны обеспечивать проявление влияния основных источников погрешности результатов количественного анализа, выполненных по данной методике. Кроме этого, по современным требованиям в аттестованной методике необходим раздел по обеспечению контроля качества аналитических работ в конкретной лаборатории для обеспечения гарантируемой точности результата анализа. С этой целью устанавливаются нормативы контроля в условиях сходимости, воспроизводимости и точности.

Для описания точности результатов измерений по последним нормативным документам [7] используют два термина: правильность и прецизионность. Правильность характеризует степень близости среднего арифметического значения к истинному или принятому опорному значению, т.е. является характеристикой систематической погрешности лаборатории. Прецизионность – степень близости результатов измерений друг к другу. Необходимость рассмотрения прецизионности объясняется неизбежными случайными погрешностями, присущими каждой измерительной процедуре, а факторы, оказывающие влияние на результат измерения, не поддаются полному контролю.

Методики определения микроэлементов в биопробах, отвечающие перечисленным требованиям, отсутствию, и их появление в ближайшем будущем не предвидится. Это объясняется тем, что аттестация методики химического анализа по полной форме занимает немалое время, требует высокой квалификации персонала и имеет высокую стоимость. Заказчика, способного оплатить такие исследования, в настоящее время нет.

Для проведения процедуры оценки систематической погрешности физико-химических измерений чрезвычайно перспективным средством проверки качества работ является применение стандартных образцов. Согласно ГОСТ 8.315-97 «ГСИ. Стандартные образцы состава, свойств веществ и материалов» стандартные образцы – это средства измерения в виде вещества, состав или свойства которого установлены аттестацией [6]. Стандартные образцы не являются изделиями, они реализованы в виде части однородного материала, который является полноценным носителем воспроизводимой величины. Стандартные образцы характеризуются значительным влиянием неинформативных параметров (примесей, структуры материала и др.) [4].

Имеющиеся в других видах измерений эталоны и стандартные образцы для биологических материалов ограничены и часто недоступны, как в России, так и за рубежом. Обычно это объясняется трудностями аттестации микроэлементов в стандартах, приготовленных из биологического материала, обеспечение их адекватности анализируемым объектам, сохранение их стабильности во времени. Ситуацию на 90-е годы иллюстрирует таблица 3.

Таким образом, определение микроэлементов в биосубстратах является вполне самостоятельным направлением в системе аналитических работ гигиенического мониторинга наравне с традиционным анализом воздуха рабочей зоны, атмосферного воздуха, почвы, питьевой воды и т.п. Данному виду исследований присущи свои особенности, которые определяют методологические подходы к каждому этапу проведения работ. Тщательное планирование общей программы исследований и аналитических измерений является залогом получения адекватных результатов. Хотя важен каждый этап работы, наиболее ответственным является выбор метода анализа. Правильный выбор метода анализа с учетом его достоинств позволяет оптимизировать планирование исследований. Ни от одного аналитического метода невозможно ожидать получения «правильных» результатов об абсолютных концентрациях микроэлементов, если анализы не контролируются путем использования эталонного материала со структурой матрикса, близкой к таковой у изучаемого ма-

Таблица 3

Стандартные образцы биологических материалов

Индекс стандартного образца	Состав	Аттестованные элементы	Страна-изготовитель
A-13	Кровь животных, высушенная вымораживанием	Br, Ca, Cu, Fe, Na, Rb, S, Se, Zn	Международное агентство по атомной энергии (IAEA) Вена, Австрия
A-12	Кости животных	Br, Ca, Cl, Fe, K, Mg, P, Ba, Sr, Zn, Cr	Международное агентство по атомной энергии (IAEA) Вена, Австрия
V-10	Волосы	Ba, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mo, Ni, P, Pb, Rb	Международное агентство по атомной энергии (IAEA) Вена, Австрия
A-11 IAEA-153	Сухое молоко	As, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, Mo, Na, F, Pb, Rb, Se, Zn	Международное агентство по атомной энергии (IAEA) Вена, Австрия
SRM-1577	Бычья печень	Ag, As, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Pb, Rb, Se	Национальное бюро стандартов (NBS или NIST) Вашингтон, США

териала. Обоснованные заключения не могут быть сделаны на основании результатов, полученных различными лабораториями, если в них не использовались одни и те же эталонные материалы или же не проводился обмен пробами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. — М.: Медицина, 1991. — 496 с.
2. Ветров В.А. Микроэлементы в природных средах региона озера Байкал / В.А. Ветров, А.И. Кузнецова. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1997. — 234 с.
3. ГСИ. Метрология. Термины и определения. МИ 2247-93. Рекомендация. — СПб., 1994. — 60 с.
4. Использование стандартных образцов для контроля качества результатов количественного химического анализа: Методическое пособие. — М., 1998. — 20 с.
5. Кислота азотная. Технические условия. ГОСТ 4461-77.
6. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. ГОСТ 8.315-97. ГСИ. — М.: Госстандарт, 1997.

7. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. — М.: Госстандарт России, 1997.

8. Человек. Медико-биологические данные. — М.: Медицина, 1977. — 173 с.

9. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа / Г. Юинг. — М.: Мир, 1989. — 602 с.

10. ACS Committee on Environmental Improvement. «Guidelines for data Acquisition and data quality evaluation in Environmental chemistry» // Anal. Chem. — 1980. — Vol. 52. — P. 2242–2248.

11. Behne D. Problems of trace elements analysis in medicine // E. Gladtko, G. Heimann, I. Eckert ed. Trace elements. — Stuttgart: George Thieme, 1979. — P. 42–52.

12. Mertz W. Chromium occurrence and function in biological systems / W. Mertz // Physiol. Rev. — 1969. — Vol. 49. — P. 163–239.

13. Skogerboe R.K. Monitoring trace metal particulates: an evaluation of the sampling and analysis problems / R.K. Skogerboe // Instrumentation for monitoring air quality. — Philadelphia, 1974.

14. Tolg G. Recent problems and limitations in analytical characterization of high-purity material / G. Tolg // Talanta. — 1974. — Vol. 21. — P. 327–345.