

MEDLINE.RU, ТОМ 20, КЛИНИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 22 ЯНВАРЯ 2019

**ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РЕФЕРЕНТНЫХ МАТЕРИАЛОВ
СОСТАВА МОЧИ, СОДЕРЖАЩЕЙ РТУТЬ, КАДМИЙ И СВИНЕЦ**

Малов А.М., Сибиряков В.К., Глушков Р.К., Шемаев М.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Россия, Санкт-Петербург, 192019, ул. Бехтерева, д.1.

Резюме

Представлены результаты многолетней работы в ФГБУН ИТ ФМБА России по созданию стандартных образцов состава биологических сред, содержащих ртуть, кадмий и свинец. Изложен технологический процесс получения этих образцов. Особое внимание уделено трудностям, с которыми встречаются разработчики данного вида стандартного материала.

Ключевые слова: стандартные материалы, моча, ртуть, кадмий, свинец, технология

**FEATURES OF TECHNOLOGY OF DEVELOPMENT OF REFERENCE MATERIAL
THE URINE CONTAINING MERCURY, CADMIUM OR LEAD**

Malov A.M., Sibiryakov V.K., Glushkov R.K., Shemaev M.E.

“Institute of Toxicology” of Federal Medico-Biological Agency,

Russian Federation, Saint – Petersburg, 192019, Bekhtereva street,1.

E-mail: malexmish@rambler.ru

Abstract

The results of many years of work at «Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency of the Federal Medical and Biological Agency of Russia are presented by the creation of standard samples of the composition of biological materials, particularly in urine containing mercury, cadmium and lead. The technological process is outlined in general terms. Particular attention is paid to the difficulties encountered by the developers of this type of standard material.

Key words: standard materials technology, urina, mercury, cadmium, plumbum

Введение

Анализ мочи на содержание свинца, кадмия или ртути, как средство неинвазивного обследования пациентов представляет значительный интерес как для эпидемиологических исследований, так и в конкретных случаях обследования и лечения пациентов при подозрении на соответствующие отравления. Актуален и исключителен такой подход при обследовании и лечении детей. Следует принимать во внимание, что именно моча, а не кровь, как наиболее частый объект анализа, в ряде случаев является более информативным источником состояния почек. Именно почки, в первую очередь, подвергаются негативному действию токсичных металлов (ТМ).

Известен ряд методов и имеется соответствующее высокочувствительное оборудование для обнаружения свинца, кадмия и ртути, как правило, эти приборы и методы рассчитаны на водные растворы солей соответствующих металлов. Но даже в этом, близком к идеальному случаю, нередко требуются специальные условия и особые приемы, чтобы правильно определить содержание аналита [1].

Несмотря на то, что моча является сильно разбавленным водным раствором некоторых минералов и органических соединений (примерно 0,024 г сухого вещества на 1 см³ объема), она далека по своему составу и свойствам от растворов, в частности калибровочных, на которые рассчитан соответствующий анализатор. Более того, аналит лишь частично может находиться в свободном ионизованном состоянии в моче, чаще он инкорпорирован в матрицу этой биологической среды, т.е. находится в соединении с органическими и неорганическими компонентами мочи. Требуется специальная и тщательная пробоподготовка мочи, чтобы приблизить ее по своим свойствам к калибровочным растворам. Это достигается некоторыми приемами, использованием ряда процедур, позволяющих избавиться от примесей, мешающих анализу. При этом в мочу привносятся дополнительные ингредиенты, например, кислоты, щелочи. Нередко одной из стадий пробоподготовки является высокочастотное воздействие, нагревание и т.п. т.д. Результатом пробоподготовки может явиться возникновение систематической погрешности при измерении.

Учесть эту погрешность, иногда весьма значительных размеров, позволяет применение стандартных материалов. В данном случае это могут быть стандартные образцы (СО) состава мочи, содержащие ТМ – свинец, ртуть и кадмий или все три металла одновременно. Такие материалы за рубежом производятся и широко используются при выполнении соответствующих анализов, ссылка на примененные СО является обязательной при опубликовании результатов измерений. Из наиболее известных зарубежных производителей стандартных материалов (SRM, CRM, RM)

следует указать американский Национальный институт стандартов и технологий (NIST), [2], немецкий Федеральный институт исследования и тестирования материалов (BAM) [3], европейский Институт стандартных образцов и измерений (IRMM) [4], выпускающие в том числе и стандарты медико-биологического характера. Таможенные, санитарные, санкционные и другие ограничения официально не допускают зарубежные СО к применению в РФ. Эти SRM, CRM и иные зарубежные СО не сертифицированы в РФ, их стоимость, к тому же, достаточно велика при необходимости регулярного использования. В ряде случаев негативной стороной зарубежных СО является неопределенность состава матрицы референтного материала или ее несоответствие матрице анализируемого биоматериала.

В Российской Федерации стандартные материалы состава биологических сред, содержащие ТМ практически не производятся и не используются. В начале двухтысячных годов в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России) совместно с Федеральным государственным унитарным предприятием «Уральский научно-исследовательский институт метрологии» (ФГУП «УНИИМ») были разработаны СО состава крови, содержащие свинец, ртуть, кадмий, бериллий и таллий. - ГСО 9104-2008, ГСО 9653-2010, ГСО 10128-2012, ГСО 10129-2012, ГСО 10236-2013. Были произведены опытные партии этих продуктов [5]. Достоинством этих продуктов и как основной технологический принцип производимых во ФГБУН ИТ ФМБА России СО и референтных материалов в том, что они предполагают использование их как контрольных материалов при любых адекватных методах количественного определения аналита. Металлы в этих продуктах находятся в естественной матрице биосреды (кровь, моча). Во ФГБУН ИТ ФМБА России в 2012 году были начаты работы по созданию СО состава мочи, содержащей ртуть, кадмий и свинец.

Несмотря на накопленный опыт разработки СО состава крови, содержащей токсичные металлы, работа с мочой потребовала учета особенностей этой биосреды, новых требований к создаваемому продукту, освоения специальных приемов работы и технологических решений.

Материалы и методы

Для получения образцов мочи, содержащей ртуть, кадмий и свинец, были использованы белые крысы-самцы линии Wistar из питомника «Рапполово» РАМН, Ленинградская область. Для кормления животных использовалась кормосмесь К-58 по ТУ 9296-00101538658-95. Для питья животным давали водопроводную воду. После содержания в течение нескольких дней в виварии с целью адаптации и выбраковки

больных животных крысы были взвешены и разделены на опытные и контрольные группы. В экспериментах использовали самцов, вес которых в начале эксперимента составлял 180 -200 г.

Животным опытных групп вводили в/м однократно ежедневно в течение первых трех суток растворы ацетатов ртути, кадмия и свинца.

На основании результатов предварительных исследований для получения образцов мочи, содержащей требуемые концентрации металлов, были определены дозы затравки для ртути, кадмия и свинца: 0,5 мг/кг, 3 мг/кг и 45 мг/кг по металлам, соответственно, и срок сбора образцов мочи – восьмые сутки после последнего введения токсиканта. При исследовании со свинцом отбор образцов мочи проводился на восьмые и девятые сутки. Инъекционные растворы вводили поочередно в мышцы бедра левой и правой задних конечностей крысы. Крысам контрольных групп в таком же режиме внутримышечно вводили физиологический раствор Рингер-Локка. Все растворы вводили из расчета 0,1 см³ на 100 г массы крыс.

Сбор проб мочи проводился путем помещения животных в обменные клетки фирмы «Foldex». В каждой обменной клетке в течение суток содержалось по две крысы для получения усредненной суточной мочи двух животных. Кормление животных в день сбора мочи не проводилось, чтобы частицами корма не загрязнять мочу. Моча самотеком поступала в пластиковый контейнер объемом 20 см³.

Аналогичным образом на восьмые сутки после третьего введения физиологического раствора Рингер-Локка проводился сбор мочи у контрольной группы крыс.

Полученные образцы мочи подвергали общему анализу на анализаторе мочи Combylizer 13 и анализу на содержание металлов:

- ртуть на анализаторе ртути «Юлия-2» в соответствии с МУК 4.1.1470-03 «Атомно-абсорбционное определение массовой концентрации ртути в биоматериалах (моче, волосах, конденсате альвеолярной влаги) при гигиенических исследованиях»;

- кадмий на анализаторе «МГА-915⁺» в соответствии с МУК 4.1.1896-04 «Атомно-абсорбционное определение массовых концентраций свинца, кадмия, цинка и никеля в моче»;

- свинец на приборе «АВА-3» в соответствии с «Методикой выполнения измерений содержания кадмия, свинца, меди, цинка в биообъектах (кровь, моча) методом инверсионной вольтамперометрии» (свидетельство об аттестации методики выполнения измерений № 36-03 от 14.12. 2003 г.).

Результаты технологических решений.

После проведения анализов полученных образцов мочи создавали банки мочи с предусмотренными для последующего получения референтных материалов концентрациями ртути, кадмия и свинца. Опыт проведенных исследований показал, что для создания подобных банков мочи следует отбирать образцы с высокими концентрациями металлов в моче, чтобы их можно было в случае необходимости разбавить мочой контрольных животных, то есть мочой не содержащей или содержащей в минимальных количествах необходимый металл.

В таблице 1 представлены основные условия постановки экспериментов и полученные значения концентраций ртути, кадмия и свинца в моче крыс.

Таблица 1 Дозы ртути, кадмия и свинца и концентрации этих элементов в моче крыс

Металл	Диапазон предусмотренных концентраций, (мкг/дм ³)	Затра- вочная доза металла, (мг/кг)	Сроки сбора мочи, (сутки)	Концентрация металла в образцах мочи, (мкг/дм ³)		Средний объем выделен- ной мочи, (см ³)	Концентрация металла в банках опытной мочи, (мкг/дм ³)
				мини- мальная	макси- мальная		
Ртуть	10 – 60	0,5	8	17,7	50, 2	15,3±10,3 (n=25)	25,6±1,2 (n=12)
Кадмий	3 – 30	3,0	8	4,18	16,5	8,4±2,8 (n=19)	10,0± 0,8 (n=8)
Свинец	150 – 600	45,0	8-9	98,3	557	13,0±2,3 (n=22)	246,6±40,8 (n=11)

Мочу из банков расфасовывали по 3 – 5 см³ в виалы вместимостью 20 см³. В мочу добавляли 50 – 100 мм³ изопропилового спирта, содержимое перемешивали и помещали для замораживания (-10 °С) на 4 – 6 часов.

К подготовленной лиофильной установке – температура ниже -45 °С и вакуум выше 0,100 mBar, подсоединяли виалы с замороженной мочой. В зависимости от объема мочи, процесс лиофилизация может продолжаться 48 – 72 часа. Опыт показал, что имеет смысл использовать два режима лиофилизации, первый – высокая производительность при относительно небольшом вакууме и второй – высокий вакуум при низкой производительности. Лيوфилизацию осуществляли до постоянной массы флаконов

Отмечена высокая гидрофильность лиофилизата, в открытом виде он быстро набирает влагу и из порошкообразного продукта превращается в студенистую массу. Следует минимизировать время нахождения флаконов в открытом виде, например, при взвешивании, необходима достаточно быстрая герметичная укупорка емкости.

В результате проведенных исследований и полученных в ходе этих исследований результатов разработаны и утверждены руководством ФГБУН ИТ ФМБА России методика «Получение образцов референтного материала мочи для создания СО состава

мочи, содержащей ртуть» [6] и методика «Получение образцов референтного материала мочи для создания СО состава мочи, содержащей кадмий» [7]. В итоге работ, проведенных в 2017-2018 гг., разработана и утверждена директором ФГБУН ИТ ФМБА России методика «Способ приготовления образцов референтного материала мочи, содержащей свинец» [8]. Эта методика является основой для создания метода получения образцов референтного материала мочи для создания СО состава мочи, содержащей свинец.

Логическим развитием разработки моноэлементных СО состава мочи является получение мультиэлементного референтного состава мочи и создание на этой основе соответствующего СО. Методической основой для этого может служить технологическая разработка, изложенная в патенте [9]. Из нескольких моноэлементных продуктов одинакового матричного состава путем смешивания возможно получить референтный материал состава мочи, содержащей необходимые ТМ в необходимых соотношениях.

В качестве развития технологии создания РМ состава биосред содержащих ТМ (мульти или моно) следует оценить использование кроликов вместо крыс в качестве доноров соответствующих биосред. Определенным затруднением в технологическом продвижении в этом направлении является отсутствие отработанной технологии получения образцов мочи этих животных.

Значительно большие, чем у крыс, объемы биоматериала, которые можно получать от одного животного сделали бы технологию создания СО на этой основе гораздо более рентабельной.

Таким образом, разработанная технология, с учетом указанных выше особенностей, позволяет получать референтные материалы состава мочи, содержащей в необходимых концентрациях ртуть, кадмий и свинец или все три металла вместе, пригодные для создания соответствующих СО.

Статья опубликована в журнале Medline.ru, том 20, ст.6 2019 год.

Литература

1. Соловьев Н.Д. Прямое определение ртути в крови на уровне токсической концентрации методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией /Соловьев Н.Д., Иваненко А.А., Рутковский Г.В., Иваненко Н.Б., Носова Е.Б.// Микроэлементы в медицине. – 2009. – № 10 (1-2). – С.79-84.
2. NIST: Standard Reference Materials: [сайт Национального института стандартов и технологий США]. – Дата обращения 29.12.2018. – Режим доступа: URL:www.nist.gov/srm/index.cfm, свободный.
3. Reference Materials//BAM [сайт Федерального института исследования и тестирования материалов (Германия)]. – Дата обращения 29.12.2018. – Режим доступа: URL:www.bam.de/en/fachthelement/referenzmaterialen/index.htm, свободный.
4. Reference Materials//Joint Centre: The European Commission's in-house science service [IRMM. Европейский союз]. – Дата обращения 29.12.2018. – Режим доступа: URL:irmm.jrc.europa.eu/reference_materials-catalogue/Pages/index.aspx, свободный.
5. Сибиряков В.К. Разработка стандартных образцов состава крови, содержащей токсичные металлы: свинец, ртуть, кадмий, бериллий и таллий /Сибиряков В.К., Малов А.М., Глушков Р.К., Марченко М.В., Рутковский Г.В., Горяева Л.И. // Медицина экстремальных ситуаций. – 2017. – № 4. – С. 80-94.
6. Экспериментальное обоснование получения образцов мочи с заданными концентрациями ртути с целью создания стандартного образца (СО) состава мочи, содержащей ртуть. Разработка методики получения образцов референтного материала СО мочи, содержащей заданные концентрации ртути [Текст]: отчет о НИР (заключит.) : 616-07 / ФГБУН ИТ ФМБА России; рук. В.А. Кашуро; исполн.: А.М. Малов, В.К. Сибиряков [и др.]. – СПб, 2014. – 71 с.– Библиогр.: с. 17-18. – № ГР 01201260979. – Инв. № 499.
7. Экспериментальное обоснование получения образцов мочи с заданными концентрациями кадмия с целью создания стандартного образца (СО) состава мочи, содержащей кадмий. Разработка методики получения образцов референтного материала СО мочи, содержащей заданные концентрации кадмия [Текст]: отчет о НИР (закл.) : 616-07 / ФГБУН ИТ ФМБА России; рук. А.В. Носов; исполн.: А.М. Малов, В.К. Сибиряков [и др.]. – СПб, 2016. – 69 с.– Библиогр.: с. 18. – № ГР 01201459135. – Инв. № 534.
8. Экспериментальное обоснование получения образцов мочи с заданными концентрациями свинца с целью создания стандартного образца (СО) состава мочи, содержащей свинец. Экспериментальное обоснование выбора оптимального образца мочи (животных или человека) для приготовления референтного материала СО мочи, содержащей свинец [Текст]: отчет о НИР (промежут.) : 543.62 / ФГБУН ИТ ФМБА России; рук. А.М. Малов; исполн.: В.К. Сибиряков [и др.].– СПб, 2018. – 35 с. – Библиогр.: с. 17. – Рег. № НИР АААА-А17-117040510233-9.– Инв. № 563.
9. Малов А.М. Способ получения биологического референтного материала для производства стандартных образцов состава жидкой биологической среды и материал, полученный этим способом. /Малов А.М., Сибиряков В.К., Глушков Р.К., Иванов М.Б. // Патент на изобретение № 2646161. Заявка № 2016148783. Приоритет изобретения 12.12.2016 г. Дата гос. регистрации в Гос. реестре изобретений РФ 01.03.2018.