

ПИРОЛИТИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РТУТИ В КРОВИ

Малов А.М., Щеголихин Д.К., Шемаев М.Е., Сибиряков В.К.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»,

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

Тел./факс (812) 365-06-80 E-mail: institute@toxicology.ru

Резюме. На основании патента РФ № 269695 RU разработан способ определения одного из приоритетных персистентных экотоксикантов – ртути – в крови. Способ основан на лиофилизации биоматериала, не нуждается в пробоподготовке и практически является прямым. Эти обстоятельства обеспечивают ему более высокую чувствительность и точность по сравнению с имеющимися методами определения ртути.

Ключевые слова: ртуть, кровь, метод определения, лиофилизация

PYROLYTIC METHOD OF DETECTING MERCURY IN BLOOD

Malov A.M., Shchegolikhin D.K., Shemaev M.E., Sibiryakov V.K.

«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency of Russia,

192019, Saint Petersburg, ul. Bekhtereva, 1,

Tel./fax (812) 365-06-80; E-mail: institute@toxicology.ru

Abstract. A method for determining of the priority persistent ecotoxicants of mercury in blood has been developed based on Russian patent No. 269695 RF. The method is based on the lyophilization of the biomaterial, does not need sample preparation and is practically direct. These circumstances provide it with a higher sensitivity and accuracy than existing methods for determining mercury in blood.

Key words: mercury, blood, determination method, lyophilization

Введение

Ртуть является одним из приоритетных персистентных неорганических экотоксикантов, однако, случаи острого отравления этим металлом при воздействии больших доз ртути в настоящее время – явление достаточно редкое. Актуальность медицинским (токсикологическим) и научным исследованиям, связанным со ртутью, придают данные о негативных последствиях для организма, наступающие при хроническом действии ртути и ее соединений в концентрациях, ранее считавшихся незначительными, например, в крови 1,0 мкг/дм³ и менее [1]. В связи с этим в

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 14 МАЯ 2020

медицинской практике появилось понятие «меркуриализм» и более того – «микромеркуриализм» [2, 3]. Информация о содержании ртути в крови, моче и других биосредах организма имеет исключительно важное, если не решающее, значение при постановке диагноза «токсическое действие ртути и ее соединений» (МКБ-10, Т56.1) [4].

Потребности медицинской практики, развитие научных исследований стимулируют совершенствование методов анализа содержания ртути в биосредах и прежде всего в крови, как интегрирующей среде организма, и моче, как средстве неинвазивного обследования организма; требуются надежные и чувствительные методы определения ртути.

Существуют физические и химические технологии и приборы, позволяющие обнаруживать ртуть в очень небольших количествах, но каждый из них имеет те или иные ограничения, требует принятия ряда условий, интерпретация получаемых данных анализа предполагает определенные исключения. Между паспортной чувствительностью анализаторов ртути и реальной чувствительностью методов определения ртути в биосредах существует большая разница не в пользу последнего. Пробоподготовка биоматериала, наличие сложной матричной структуры на порядок, а иногда и более заглубляют фактическую чувствительность анализа, снижают точность анализа.

Камнем преткновения при разработке этого направления исследований является стадия пробоподготовки биологического материала, обладающего сложной органоминеральной матрицей, в которую ртуть может быть инкорпорирована в виде металлической, органических и неорганических форм [5]. Методы пробоподготовки биоматериала для анализа на содержание ртути в основном сводятся к разрушению матрицы с помощью сильных реагентов, окислению ртути до Hg^{++} и/или восстановлению ее до Hg^0 , при воздействии высокой температуры, микроволнового и/или ультразвукового облучения. Процедуры, связанные с использованием реагентов, возможно загрязняющих пробу в той или иной степени как ртутью, так и другими мешающими анализу компонентами, и разбавление исходного материала увеличивают ошибку измерения, снижают чувствительность методов анализа. Воздействие высоких температур приводит к испарению металлической формы ртути и некоторых ее органических соединений, т.е. в конечном итоге к искажению результатов анализа.

Пробоподготовка является нежелательной стадией аналитического процесса, ее стремятся свести к минимуму и предпочитают, если это возможно, использовать прямые методы анализа, при которых биоматериал непосредственно помещается в измерительную ячейку анализатора.

Принципиальной особенностью подавляющей части биоматериалов является их высокая влажность, содержание сухого вещества, в т.ч. минералов, колеблется от 10% до 20 %. Исключение составляют костная ткань и волосы. Значительное уменьшение концентрации аналита за счет его разбавления водной фазой ухудшает условия анализа, усложняет, например, процесс атомизации ртути, как необходимой фазы анализа.

Методы инструментального анализа являются относительными по своей природе, требующими соотнесения получаемых условных (относительных) значений аналита с подобными данными, получаемыми при анализе эталонных (контрольных, стандартных) материалов. По этой причине обязательной стороной всех способов определения содержания ртути является необходимость использования соответствующих стандартных образцов (СО), т.е. аналогичных анализируемому материалу биосред, содержащих определенное количество ртути. Известные СО биоматериалов, содержащие ртуть, представляют собой лиофилизированные продукты, кровь - ГСО 9653-2010 (МСО 1823-2013), мышцы - ГСО 9055-2008 и DORM2, молоко - СОП 343-036-2010, гомогенат рыбы - IAEA-407, печень акулы - DOLT2.

Корректное проведение анализа предполагает, что анализируемый и стандартный материалы имеют одно и то же агрегатное состояние, т.е. анализируемый материал должен быть представлен в лиофилизированной форме, поскольку стандартные материалы биологических сред, содержащие ртуть, также представляет собой лиофилизированный биологический материал.

Известны способы относительно прямого определения ртути в крови методом атомно-абсорбционной спектроскопии электротермической атомизации с использованием Зеемановской модуляционной поляризации (ААС-ЭТА), при которых жидкую кровь пипеткой вносят непосредственно в особым образом подготовленную ячейку (печку, графитовую кювету), в которой она сначала высыхает при высокой температуре [6]. Высушенную кровь сжигают и спектральным методом определяют содержание ртути [7, 8]. У этих способов имеются существенные недостатки:

- предварительное высушивание биоматериала путем нагрева до 80 °С сопряжено с возможной потерей как самой металлической ртути, так и ее легколетучих органических соединений, например, метилртути, которые проскакивают аналитическую ячейку без детектирования,

- наилучшая заявленная приборная чувствительность составляет 1 мкг/дм³, что недостаточно в ряде случаев для работы с кровью,

- точная объемная дозировка малых количеств крови (микролитры), представляющей собой вязкую субстанцию, сопряжена с ошибкой при разбавлении и внесении материала в пещку (графитовую кювету),

- анализ осуществляется на мультифункциональном атомно-абсорбционного спектрометре, требует особой тщательной обработки графитовой кюветы редкими реактивами (вольфрамом натрия и гексагидратом платинохлороводородной кислоты).

- не предусматриваются нормирование получаемых условных значений по данным анализа соответствующих стандартных материалов (СО, ОСО, ГСО) и стадия построения градуировочной характеристики, как необходимой процедуры перевода относительных значений спектрометра в абсолютные содержания аналита в крови.

Целью стала разработка способа определения ртути в крови, лишенная указанных выше недостатков.

Материалы и методы

Способ определения ртути в биосредах состоит из лиофилизации крови, и таким образом сохранении всех компонентов биосреды и форм ртути за счет низкой температуры – -50°C , концентрировании аналита, его весовом дозировании и последующей пиролитической атомизации на ртутном селективном спектрометре типа РА-915 с пиролитической приставкой.

Весовое количество крови подвергают лиофильной сушке при -50°C . При недостатке крови и для повышения точности анализа материал возможно наносить непосредственно на ложечку атомизатора. Для последующих расчетов лиофилизат взвешивают. Концентрация ртути в лиофилизате в результате удаления влаги повышается примерно в 10 раз по сравнению с сырым материалом.

Важным техническим результатом, достигаемым при реализации предлагаемого способа является приведение крови в агрегатное состояние (лиофилизат) подобное таковому у имеющихся стандартных материалов, стандартных образцов.

Аликвоту лиофилизата помещают в ртутный селективный спектрометр для пиролитической атомизации и получения аналитического сигнала, выраженного в относительных единицах. В качестве ртутного селективного спектрометра могут быть использованы анализатор ртути РА-915⁺/РА-915М с пироприставкой ПИРО-915⁺ или аналогичные приборы [9, 10].

Зарегистрированный прибором относительный аналитический сигнал сравнивают с градуировочной характеристикой, полученной в результате пиролитической атомизации стандартного материала (СО), например, ГСО 9653-2010 (МСО 1823-2013), находящегося

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 14 МАЯ 2020
в том же агрегатном состоянии (лиофилизат) на том же ртутном селективном спектрометре. Рассчитывают значение содержания ртути в абсолютных величинах.

Результаты

Для построения градуировочной характеристики из стандартного образца утвержденного типа ГСО 9653-2010 было сделано восемь навесок лиофилизата с известным содержанием ртути. Из Инструкции и Паспорта на тип ГСО 9653-2010 следует, что при растворении навески лиофилизата крови 150 ± 3 мг в дистиллированной воде объемом 4 см^3 получается восстановленная кровь с содержанием ртути в ней, равным $7,9 \text{ мкг/дм}^3$, т.е. 210 мкг ртути в 1 кг лиофилизата (210 мкг/кг).

Навески ГСО 9653-2010 были проанализированы в соответствии с предлагаемым способом на анализаторе ртути с пироприставкой, и были получены значения соответствующих оптических плотностей (отн. ед.) (Таблица 1).

Таблица 1. Данные для построения градуировочной характеристики на основе СО лиофилизата крови (ГСО 9653-2010)

Навеска лиофилизата	Масса ртути	Оптическая плотность
(мг)	(нг)	(отн. ед.)
0,7	0,145	1,72
1,0	0,207	3,43
1,4	0,290	3,44
1,9	0,393	4,47
2,0	0,414	5,65
2,6	0,538	4,72
3,8	0,787	8,68
4,6	0,952	11,5

Это позволило построить градуировочную характеристику «оптическая плотность - количество ртути» (Рисунок 1), которая может быть аналитически выражена уравнением $Y = 0,086 \cdot x - 0,003$, где Y - масса ртути в образце (нг), x - оптическая плотность образца (отн. ед.). Эта зависимость и это уравнение были использованы для расчетов содержания ртути в опытных образцах крови.

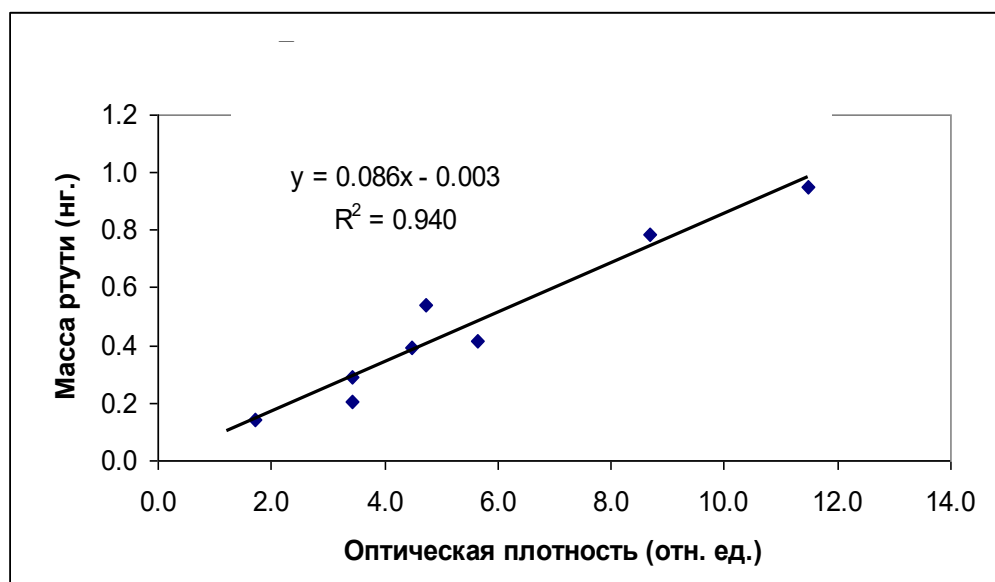


Рисунок 1. Градуировочная характеристика для лиофилизата крови

Известным способом [11] была получена кровь крыс, которая была расфасована по $0,2 \text{ см}^3$, что в среднем составило $0,199 \pm 0,0044 \text{ г}$ ($n=23$) и обезвожена путем лиофильной сушки до постоянного веса при температуре -50°C и давлении менее $0,2 \text{ mBar}$ в течение 4-х часов на установке лиофильной сушки фирмы Labconco (США) - FreeZone® 4,5 Liter Freeze Dry Systems. Средний вес лиофилизата составил $21,1 \pm 1,8 \text{ мг}$ ($n=23$).

Результаты анализа (оптической плотности) и расчет содержания ртути на основе градуировочной характеристики (Рисунок 1) в трех образцах крысиной крови представлены в таблице 2. Анализы выполнены на анализаторе ртути РА-915⁺ с пироприставкой ПИРО-915⁺.

Таблица 2. Данные анализа содержания ртути в образцах крысиной крови.

Образец крысиной крови	Масса лиофилизата (мг)	Расчетный объем пробы крови (см^3)	Оптическая плотность (отн. ед.)	Концентрация ртути в лиофилизате (мкг/кг)	Концентрация ртути в исходной крови (мкг/ дм^3)
№1	2,0	0,0190	1,96	83	8,7
№2	1,7	0,0161	1,11	54	5,7
№3	1,8	0,0170	1,19	55	5,8
Примечание – Пробы №2 и №3 представляют собой аликвоты одного и того же образца крови, отличие менее 2%.					

Образцы донорской крови были расфасованы по $0,2 \text{ см}^3$, что в среднем составило $0,203 \pm 0,0057 \text{ г}$ ($n=6$), и обезвожена в лиофильной сушке до постоянного веса при температуре -50°C и давлении менее $0,2 \text{ mBar}$ в течение 4-х часов на установке

MEDLINE.RU, ТОМ 21, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 14 МАЯ 2020
 лиофильной сушки фирмы Labconco (США) - FreeZone® 4,5 Liter Freeze Dry Systems.
 Средний вес лиофилизата составил $20,2 \pm 1,1$ мг (n=6).

Результаты анализа донорской крови, выполненные предлагаемым способом представлены в таблице 3.

Таблица 3 Данные анализа содержания ртути в образцах донорской крови

Пациент	Масса лиофилизата (мг)	Расчетный объем пробы крови (см ³)	Оптическая плотность (отн. ед.)	Концентрация ртути в лиофилизате (мкг/кг)	Концентрация ртути в исходной крови (мкг/дм ³)
№1	5,2	0,0515	0,182	2,4	0,25
№ 2 а	6,8	0,0673	0,107	0,91	0,1
№ 2 б	5,4	0,0535	0,093	0,93	0,093
№ 3	6,3	0,0624	0,678	8,7	0,89
№ 4	2,1	0,0210	3,396	138	14,0
№ 5	6,5	0,0644	0,452	5,5	0,56
№ 6	2,0	0,0190	3,448	0,145	15,2
Примечание – Образцы крови № 2а и № 2б взяты у одного и того же пациента, отличие в результатах анализа 1,5%					

В таблице 3 представлены результаты анализа (оптической плотности) и расчет содержания ртути в образцах донорской крови на основе градуировочной характеристики (Рисунок 1).

Важно отметить, что у метода относительно небольшой разброс данных. Пробы крови 2а и 2б соответствуют одному и тому же пациенту и, несмотря, на различные навески лиофилизата – 6,8 мг и 5,5 мг, концентрация ртути в исходном образце крови практически одна и та же – 0,092 мкг/дм³ и 0,093 мкг/дм³, отличие менее 1,5%. Этот же результат демонстрирует высокую чувствительность предлагаемого способа.

Заключение

Таким образом, предлагаемый способ определения ртути в крови путем лиофилизации биоматериала решает несколько задач, значительно повышающих качество анализа и расширяющих возможности этого метода исследования, а именно:

- за счет концентрирования аналита повышается чувствительность метода анализа ртути по сравнению с другими методами, появляется возможность расширить диагностические врачей-токсикологов

- осуществляется адаптация исследуемого биоматериала по агрегатному состоянию к имеющимся СО,

- происходит консервация биоматериала, лиофилизат подлежит длительному хранению,

- расчеты производятся на вес сухого материала (лиофилизат), что более корректно (правильно) чем объемное дозирование, поскольку кровь может иметь разную влажность. что позволяет сопоставлять результаты измерений в различных лабораториях и выполненных различными методами,

- отсутствие стадии пробоподготовки сводит до минимума систематические ошибки измерения.

Способ запатентован в РФ 07 августа 2019 г., № 2696958 RU [12].

Литература

1 Батоцыренова Е.Г., Вакуненко О.А., Золотоверхая Е.А., Кашуро В.А., Кострова Т.А., Кубарская Л.Г., Лапина Н.В., Щепеткова К.М. Показатели антиоксидантной системы в отдаленный период после острого отравления нитратом ртути в эксперименте // Токсикологический вестник. – 2020. – № 2. – С. 36-41.

2 Соболев М.Б. Методы оценки и снижения токсического действия ртути в дозах малой интенсивности у детей. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. СПб.. 1999. –145 с.

3 Малов А.М., Карпова Л.С., Петров А.Н., Семенов Е.В. – Содержание ртути в крови женщин с различными сроками беременности г. Санкт-Петербурга // Токсикологический вестник. – 2001. – № 5. – С. 5 – 11.

4 МКБ-10 – Международная классификация болезней. Десятый пересмотр.

5 Осипов К.Б., Серегина И.Ф., Большов М.А. Устранение матричных неспектральных помех при элементном анализе биологических жидкостей на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой // Аналитика и контроль. – 2014. –Т. 18. № 2. – С. 150-163.

6 Соловьев Н.Д., Иваненко Н.Б., Иваненко А.А., Кашуро В.А. Определение микроэлементов в биологических жидкостях методом ААС-ЭТА с Зеемановской коррекцией фона // Вестник ОГУ. – 2011. – №34 (15). – С. 127-130.

7 Методики выполнения измерений массовой концентрации ртути в пробах крови человека методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией в модифицированной графитовой печи. Свидетельство об аттестации МВИ № 224.11.06.095/2009.

8 Методика измерений массовой концентрации ртути в материале стандартного образца крови, содержащей ртуть, методом атомно-абсорбционной электротермической атомизацией в модифицированной графитовой печи». Свидетельство об аттестации МВИ № 224.0123/01.00258/2010.

9 Руководство по эксплуатации. 951.00.00.00.00. РЭ. Анализатор ртути РА - 915⁺. Санкт-Петербург. 2016.

10 Руководство по эксплуатации. 951-07-00-00-00 РЭ. Приставка ПИРО-915⁺ к анализатору ртути РА - 915⁺. Санкт-Петербург. 2016.

11 Малов А.М., Сибиряков В.К., Семенов Е.В. Распределение ртути в некоторых органах и тканях крыс //Токсикологический вестник. – 2009. – № 5. –С. 34 – 37.

12. Малов А.М., Сибиряков В.К., Кашуро В.А., Шемаев М.Е., Щеголихин Д.К. «Способ определения ртути в биологических материалах» Патент на изобретение № 2696958.