

УДК 620.11:006.065:615.099.

**ОПЫТ РАЗРАБОТКИ РЕФЕРЕНТНЫХ МАТЕРИАЛОВ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ СОСТАВА МОЧИ,
СОДЕРЖАЩЕЙ ТОКСИЧНЫЕ МЕТАЛЛЫ**

А.М. Малов, В.К. Сибиряков, Р.К. Глушков,
Р.И. Глухова, М.В. Марченко, Н.Б. Иваненко

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического агентства»,
Россия, 192019, Санкт-Петербург,
ул. Бехтерева, д. 1 . тел. (812) 365-06-80 E-mail: malexmish@rambler.ru*

Резюме

Представлена запатентованная технология для изготовления референтного материала состава мочи, содержащей токсичные металлы. Технология состоит из следующих стадий: 1. - парентеральное (внутримышечное) инъекционное введение водорастворимой соли токсичного металла, 2. - выдерживание крыс в обменных клетках с целью получения мочи, 3. - смешивание мочи, 4. - лиофилизации мочи. На всех стадиях работы с мочой проводили химические анализы материала.

Keywords: toxic metals, urine, standard reference material

THE EXPERIENCE OF DEVELOPING OF STANDARD REFERENCE MATERIAL OF URINE, CONTAINING TOXIC METALS

A.M. Malov, V.K. Sibiryakov, R.K. Glushkov,
R.I. Glukhova, M.V. Marchenko, N.B. Ivanenko

FGBUN Institute Toxicology FMBA Russia

Resume

Presented patented technology for the production of reference material composition of urine containing toxic metals. The technology consists of the following steps: 1 - The parenteral (intramuscular) injection of a water-soluble salt of a toxic metal in the rat 2 - exposing rats in metabolic cells to produce urine, 3. - mixing urine, 4. - urine lyophilization. Chemical analysis of the materials were performed on all technology stages.

Ключевые слова: токсичные металлы, моча, референтный материал, стандартный образец.

Введение

Токсичные металлы (ТМ) как приоритетные неорганические экотоксиканты, несмотря на многочисленные исследования их действия на живые организмы, продолжают интересовать представителей различных научных дисциплин и медицинской практики.

Будучи персистентными экотоксикантами, ТМ постоянно воздействуют на живую материю. Остроту интереса к этой проблеме придает с одной стороны увеличивающееся антропогенное загрязнение окружающей среды этими экотоксикантами, а с другой – данные о влиянии на некоторые биологические функции более низких концентраций ТМ, чем это предполагалось ранее [1]. Прогрессу в этой области в немалой степени способствовало совершенствование аналитических возможностей. Во-первых, появление более чувствительной, чем прежде, аналитической техники, во-вторых, появление за рубежом широкого спектра стандартных образцов (СО) состава биологических сред, содержащих ТМ.

Если аналитическая аппаратура, в принципе, доступна отечественным исследователям, то отсутствие отечественных СО состава биологических сред, содержащих ТМ, является препятствием прогресса в этой области аналитических исследований в стране.

Наиболее востребованными в практической медицине являются результаты анализа крови и мочи пациентов, содержание ТМ в этих биосредах служит одним из, если не главным, диагностических показателей воздействия ТМ на организм. Данные анализов

этих двух биосред дополняют друг друга, но в ряде случаев каждый из них исключительно необходим или исключительно возможен. В большинстве случаев анализ мочи на содержание в ней ТМ более предпочтителен, как неинвазивный метод обследования пациентов, и исключителен – при диагностировании почечной патологии, например. Анализ мочи на содержание ТМ является относительным, т.е. предполагает наличие СО состава мочи, соответствующих референтных материалов.

Имеющиеся за рубежом СО (CRM, SRM и другие), как правило, представляют собой раствор соли аналита в донорской ректифицированной моче. Некорректность такого подхода состоит в том, что, во-первых, донорская, человеческая моча по российским медицинским нормативам является потенциально инфицированным биологическим материалом [2] и как она сама, так и продукты ее переработки предполагают особые меры обращения, что накладывает дополнительные ограничения на производство соответствующих СО, их применение и их трансграничное перемещение. Во-вторых, есть сомнения и доказательства тому, что раствор аналита в моче тождественен моче, в которую аналит введен в результате метаболических процессов, присущих живому организму. Во втором случае есть уверенность, что аналит внедрен в матрицу мочи естественным образом и наличествуют естественным образом полученные формы аналита.

Во ФГБУН ИТ ФМБА России в рамках бюджетного финансирования уже много лет ведутся исследования в этом направлении [3,4].

Цель

Учитывая потребности отечественного здравоохранения и научных исследований была поставлена цель разработать методические подходы к созданию референтного материал состава мочи животных, содержащей ТМ, как материальной основы соответствующих СО.

Материалы и методы

Для получения мочи использовали лабораторных животных – белых крыс, которых высаживали в обменные клетки. При таком подходе имелась возможность как контролируемо вводить раствор ТМ в организм животного, так и впоследствии без потерь собирать чистую мочу. Масса крыс была от 180 до 220 г., от более крупных животных получали большее количество мочи. Для введения ТМ в организм животного был избран парентеральный способ – внутримышечная инъекция. В течение первых трех дней эксперимента животным вводили ацетатные соли ТМ суточными дозами этих ТМ в зависимости от вида металла и его необходимой концентрации в моче. Распределенная на три дня доза, позволяла делать введение ТМ в организм животного более физиологичным. Крысы переносили эту процедуру без видимых последствий для здоровья. Общий анализ мочи на анализаторе Combilyzer 13 практически не выявил отличий в моче контрольных и опытных животных. В зависимости от динамики накопления ТМ в моче, крыс через несколько дней извлекали из террариумов, где они содержались в обычных условиях

обеспеченности кормом и водой, и помещали в обменные клетки, где выдерживали некоторое время, обычно сутки, для получения мочи.

Собранную мочу хранили непродолжительное время, до трех суток, в герметично укупоренной посуде в холодильнике при температуре 3 ± 2 °С. Аликвоты образцов мочи подвергали анализу на содержание в них ТМ. В зависимости от конкретного ТМ были использованы следующие методы анализа [5-10] – атомно-абсорбционный, инверсионной вольтамперометрии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, т.е. следующие анализаторы – МГА-915⁺, Юлия-2, РА-915⁺, АВА-2 и АВА-3, ELEMENT-2. В качестве аналитических стандартов были использованы отечественные водные растворы соответствующих экотоксикантов и зарубежные СО состава мочи, содержащие ТМ.

Полученные порции мочи отдельных крыс отличалась как по содержанию металлов, объему и в меньшей мере по показателям общего анализа. В зависимости от конкретных целей образцы мочи смешивали в определенных пропорциях, в т.ч. с мочой контрольных животных, для получения банка т.н. «композитной мочи», с необходимой концентрацией ТМ. Подобный подход позволяет сохранить однообразие матрицы биосреды независимо от концентрации аналита.

«Композитную мочу» расфасовывали по флаконам, добавляли в качестве пеногасителя изопропиловый спирт и помещали для заморозки до -15 °С и ниже в морозильную камеру. В таком виде моча может храниться неограниченно долго. Чтобы придать моче более технологичное состояние при использовании в качестве референтного материала, ее подвергали лиофильной сушке до постоянного веса. В данном исследовании была использована установка лиофильной сушки – Labconco FreeZone[®] 4,5L, температура теплообменника ≤ -49 °С, вакуум $\leq 0,250$ mBar. В зависимости от стадии лиофилизации для оптимизации процесса использовали различные режимы Gas-ballast control и селектора.

В зависимости от режима сушки и объема материала во флаконе процесс лиофилизации занимает от 10 до 20-ти часов. В результате получали рыхлый белесоватый осадок на стенках виал – лиофилизат, пригодный для использования в качестве референтного материала, способного длительно храниться в укупоренном виде при пониженных температурах без изменения своих свойств.

При добавлении воды в виалу с лиофилизатом получали мочу с известным содержанием ТМ, т.н. «восстановленную мочу», которая собственно и будет использоваться для усовершенствования и стандартизации лабораторной диагностики в здравоохранении, ветеринарии, а также при проведении научных медико-биологических исследований.

Статистическая обработка экспериментальных данных и их графическое представление выполнены с помощью прикладных программ W7 - Excel и Biostat.

Результаты

Ртуть

Суточная доза ртути составила 0,5 мг/кг (по металлу). Динамика объемов получаемой мочи представлена на рисунке 1.

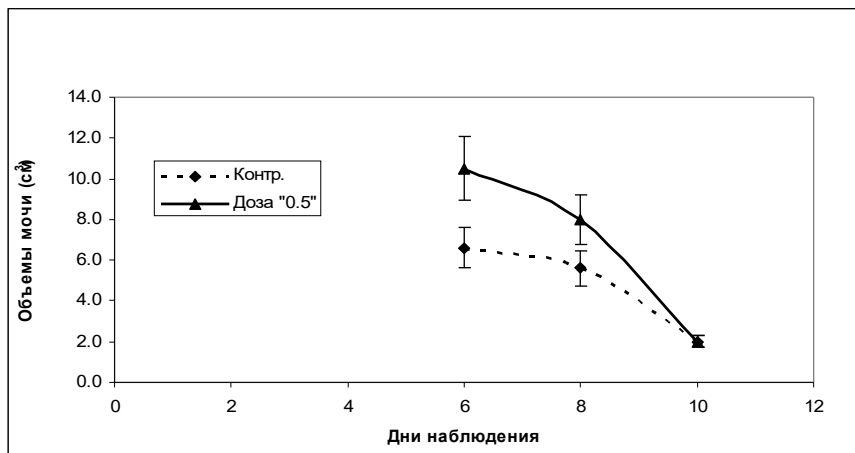


Рисунок 1 – Усредненные объемы мочи, выделяемой крысой при в/м введении ацетата ртути в суточной дозе 0,5 мг/кг в зависимости от срока наблюдения

При этом концентрация общей ртути изменялась во времени как показано на рисунке 2.

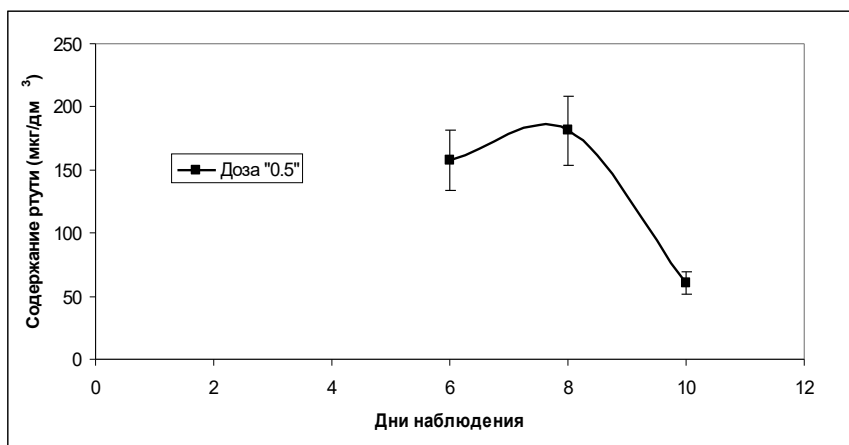


Рисунок 2 – Концентрация общей ртути в моче крыс в зависимости от сроков сбора при в/м введении ацетата ртути в суточной дозе 0,5 мг/кг

Восьмые сутки наблюдения явились пиковыми для концентрации ртути в моче, они и были выбраны для сбора мочи.

Анализируя величины содержания ртути в моче, следует принимать во внимание несколько обстоятельств.

Во-первых, приведенные значения содержания ртути отражают т.н. общую ртуть, без разделения ее на компоненты, т.е. органическую, неорганическую и металлическую [3, 11]. Рутинные методы пробоподготовки и анализа ртути не выделяют эти компоненты, более того, можно полагать, что при некоторых некорректных операциях

пробоподготовки, а возможно и анализа, они утрачиваются. Результатом явится не только неверная величина содержания ртути в биоматериале, но и неправильное представление о механизмах и последствиях возможного действия ртути. Использованный в настоящем исследовании подход дробной пробоподготовки и метод анализа – метод холодного пара, позволили выявить различные формы соединений ртути в моче – неорганическую, органическую и металлическую.

Во-вторых, моча не является простым растворителем ТМ и соединений ртути, в частности. Будучи гетерогенной структурой, она даже на первый взгляд состоит из двух фаз - надосадочной и осадка, который образуется вскоре после получения мочи. Анализ показывает, что эти фазы содержат различное количество ртути в различных формах. В частности, в осадке удельное содержание органической формы ртути больше, чем в надосадочной фазе мочи.

В этом свете, попытки использовать водные растворы солей, ртути в том числе, или даже растворы солей в донорской очищенной моче в качестве полноценного референтного материала при изготовлении СО представляются не совсем корректными. Матрица биоматериала, мочи в данном случае, может играть немаловажную роль в процессе анализа [7], так же как не всякий анализ может выявить возможное многообразие форм аналита. Удовлетворительным решением вопроса, по-видимому, является использование СО состава мочи, содержащей ТМ, созданный на основе мочи, в матрицу которой естественным образом, в результате метаболических процессов введен ТМ и который присутствует там в тех же формах, что и в нативной моче.

Процесс лиофилизации, как заключительная стадия создания референтного материала состава мочи, содержащей ТМ, сохраняет гетерогенность нативной мочи. Лيوфилизат в герметичной таре – укупоренные резиновыми пробками флаконы, может, в принципе, храниться достаточно долго и не требует особых предосторожностей при транспортировке. После добавления в лиофилизат воды получали т.н. «восстановленную мочу». На рисунке 3 представлены диаграммы распределения форм ртути в одном из экспериментов до и после лиофильной сушки. Исходная моча содержала $37,0 \pm 4,1$ мкг/дм³ общей ртути, в «восстановленной моче» содержание общей ртути осталось практически тем же – $37,5 \pm 3,4$ мкг/дм³, но соотношение форм изменилось – по-прежнему большую часть составляет органическая форма ртути, но ее стало меньше за счет увеличения неорганической формы. Абсолютно и относительно уменьшилось количество металлической ртути.

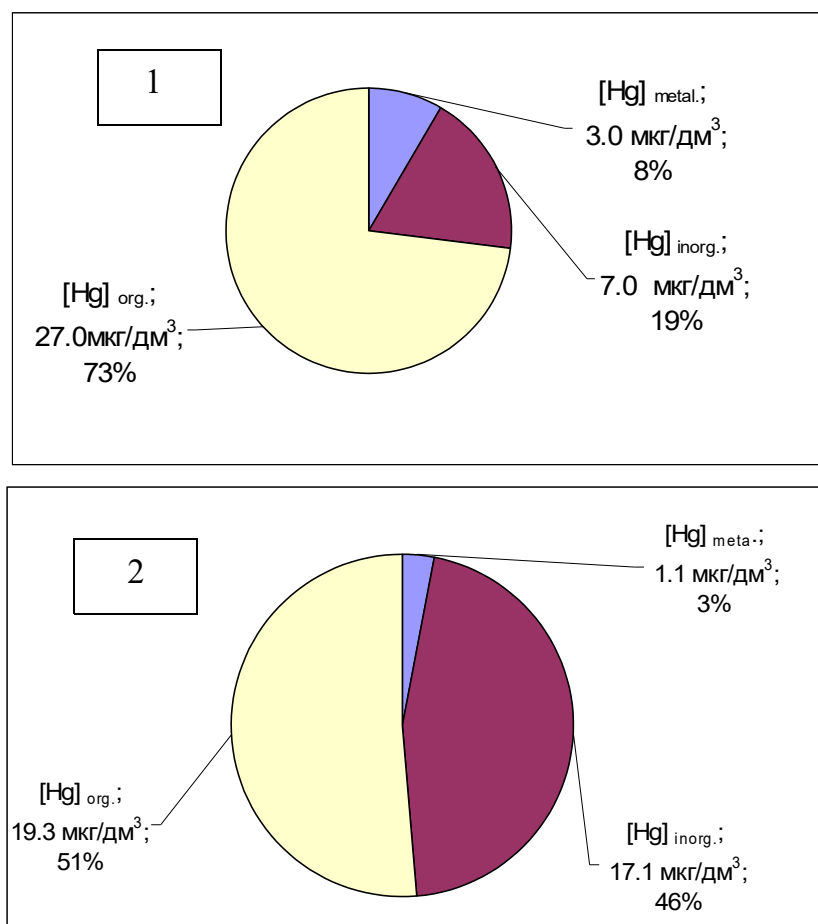


Рисунок 3 – Распределение ртути по формам в крысиной моче до лиофилизации (1) и после лиофилизации, в «восстановленной моче» (2). [Hg]_{metal.} – металлическая форма, [Hg]_{inorg.} – неорганическая форма, [Hg]_{org.} – органическая форма

Важно, что количество общей ртути осталось прежним, так же как наличие всех трех форм, обнаруженных в исходной моче. Изменение соотношения форм ртути, произошедшее в результате лиофилизации и последующего растворения лиофилизата не представляется неожиданным, т.к. известна лабильность форм ртути, их способность переходить из одной формы в другую [12]. Интересно отметить, что распределение ртути по формам в «восстановленной моче» крыс практически совпадает с таковым в донорской моче пациентов, имевших контакт с парами ртути (рисунок 4).

Кадмий

Подобным образом была проведена работа по получению рефернтного материала состава мочи, содержащей кадмий. Доза затравки в данном случае была 3,0 мг/кг (по металлу). Содержание токсиканта в одних и тех же пробах мочи определяли несколькими методами – инверсионной вольтамперометрии, (анализатор АВА-2), атомно-абсорбционной спектроскопии (анализатор МГА-915⁺) и масс-спектрометрией с ион-связанной плазмой (анализатор Element-2).

Динамика накопления кадмия в моче (рисунок 5) несколько отличается от таковой для ртути (рисунок 2) – кадмий гораздо медленнее выходит из организма с мочой, чем ртуть.

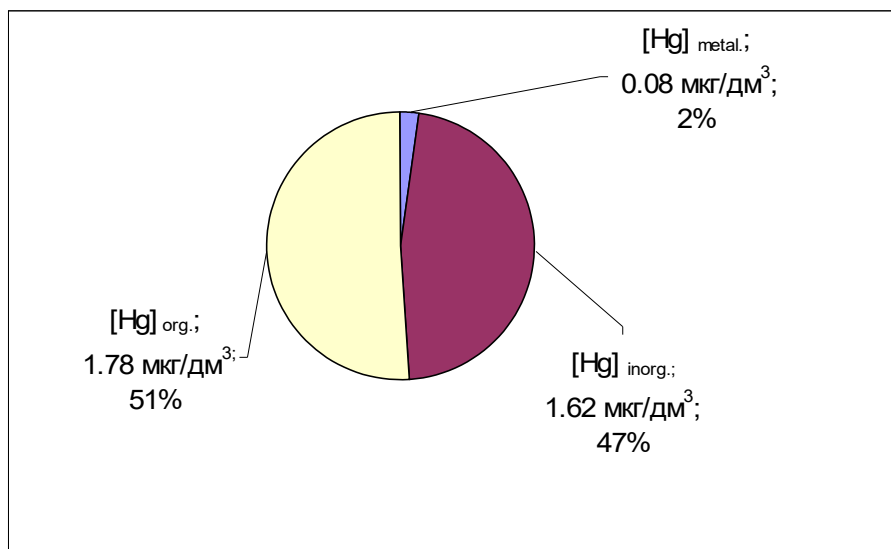


Рисунок 4 – Распределение ртути по формам в донорской моче.
 [Hg]_{metal.} – металлическая форма, [Hg]_{inorg.} – неорганическая форма,
 [Hg]_{org.} – органическая форма

Другое отличие работы с кадмием – этот токсикант определяли без разделения его на возможные формы, например, органическую и неорганическую.

Из рисунка 5 видно, что на протяжении всего периода наблюдения метод ААС дает более высокие значения по сравнению с вольтамперометрическим. Сопоставление данных этих двух методов приемами непараметрической статистики [10] показывает, что метод атомно-абсорбционной спектроскопии дает достоверно ($P \geq 0,95$) более высокие значения содержания кадмия в моче, чем метод инверсионной вольтамперометрии. Какой из использованных методов анализа дает более правильные результаты, по-видимому, предстоит разобраться аналитикам.

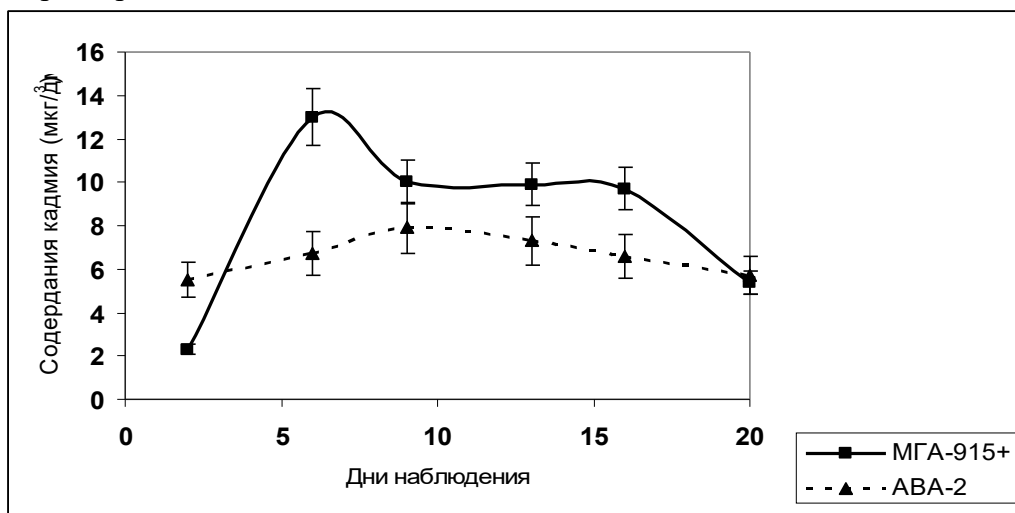


Рисунок 5 – Концентрация кадмия в моче крыс в зависимости от сроков сбора при в/м затравке ацетатом кадмия в дозе 3,0 мг/кг, данные анализаторов МГА-915⁺ и АВА-2.

Последующая обработка мочи – расфасовка, заморозка, лиофилизация и растворение лиофилизата, позволили получить «восстановленную мочу» с нужной концентрацией кадмия, которая явится необходимым и обязательным средством контроля точности измерений содержания кадмия в моче. Полученный референтный материал может быть использован как адекватный продукт при градуировке измерительных приборов, как средство при внутрилабораторном контроле и при внешней проверке технической компетентности лабораторий.

Таким образом, предложен способ получения полноценного референтного материала состава мочи, содержащей в нужных концентрациях и в присущих нативному материалу формах ТМ. При необходимой метрологической проработке из полученных таким образом референтных материалов могут быть изготовлены полноценные СО состава мочи, содержащие ТМ, пригодные для любого из методов пробоподготовки и анализа. На основе материалов разработки референтного материала для создания стандартного образца состава мочи, содержащей токсичные металлы, зарегистрирован патент[11].

Литература

- 1 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.
- 2 Организация работы клиничко-диагностических лабораторий по предупреждению инфицирования пациентов и персонала вирусами гепатитов В и С и иммунодефицита человека. Методические рекомендации № 13-10-3-1 от 05.01.2001.
- 3 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 (заключительный): 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.– № ГР 01201260979.– Инв. № 499.
- 4 Экспериментальное обоснование получения образцов мочи с заданными концентрациями кадмия с целью создания стандартного образца (СО) состава мочи, содержащей кадмий. Экспериментальное обоснование выбора оптимального образца мочи (животных или человека) для приготовления референтного материала СО мочи, содержащей кадмий [Текст]: отчет о НИР (промеж.): 616-07 / ФГБУН ИТ ФМБА России; рук. А.В.Носов, исполн.: А.М. Малов, В.К. Сибиряков [и др.]– СПб, 2015.– 41 с.– Библиогр.: с. 20. – № ГР 01201459135.– Инв. № 512.
- 5 Методика выполнения измерений массовой концентрации ртути в моче атомно-абсорбционным методом. Свидетельство об аттестации методики № 2420/76-99 от 30.04.99 г.

6 МУК 4.1.1470-03 «Атомно-абсорбционное определение массовой концентрации ртути в биоматериалах (моче, волосах, конденсате альвеолярной влаги) при гигиенических исследованиях».

7 Иванеко А.А., Ганеева А.А., Иванеко Н.Б., Носова Е.Б., Молодкина Е.В. Прямое определение кадмия в крови и плазме крови человека методом атомной абсорбции с электротермической атомизацией. Тез. докл. на II Всероссийской конференции «Аналитические приборы». СПб., - 2005. – С. 245 - 246.

8 Ivanenko N.B., Ivanenko A.A., Solovyev N.D., Zeimal' A.E., Navolotskii D.V., Drobyshev E.J. Biomonitoring of 20 trace elements in blood and urine of occupationally exposed workers by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry // Talanta. – 2013. – Vol. 116. – P. 764-769.

9 МУК 4.1.1896-04 «Атомно-абсорбционное определение массовых концентраций свинца, кадмия, цинка и никеля в моче».

10 Методика 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.)

11 Малов А.М., Сибиряков В.К. Металлическая ртуть в моче. //Донозология® и здоровый образ жизни. № 23(15) - 2014. –С. 43 - 46

12 Лапердина Т.Г. Определение ртути в природных водах. Новосибирск. Наука, 2000. – 222 с.

13 Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических следованиях. Л. Медицина, 1973. – 154 с.

14 Малов А.М., Сибиряков В.К. Патент на изобретение № 2567047 от 01.10.15. Способ получения биологического референтного материала для производства стандартных образцов состава мочи, содержащей токсичный металл и материал, полученный этим способом.