



**Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт токсикологии
Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУН ИТ ФМБА России)**



Методы элементного анализа в токсикологии. Возможности и перспективы

**Ганеев А.А., Иваненко Н.Б., Зубакина Е.А., Столярова Н.В.,
Безручко М.М.**



Введение

- Анализ заболеваний в Российской Федерации, проведенный в Институте токсикологии Федерального Биологического агентства в течение последнего десятилетия показал, что наиболее частые случаи интоксикации металлами связаны с кадмием, хромом, ртутью, свинцом, марганцем и никелем. Однако определение ряда других элементов, в том числе эссенциальных, также представляет интерес для токсикологов.
- Элементы, содержание которых и их формы в организме человека исследуются в области токсикологии: Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, Mn, Tl, Be, Pt, Co, Se, Cu, Zn, Fe.
- Основные методы элементного анализа биологических проб рассматриваемые в настоящем докладе: Зеемановская атомно-абсорбционная спектрометрия (ЗААС), индуктивно-связанная плазма с масс-спектральным окончанием - ИСП МС, лазерная абляция с ИСП МС – ЛА-ИСП-МС и капиллярный электрофорез с ИСП-МС).



ААС с электротермической атомизацией

(Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry GFAAS)

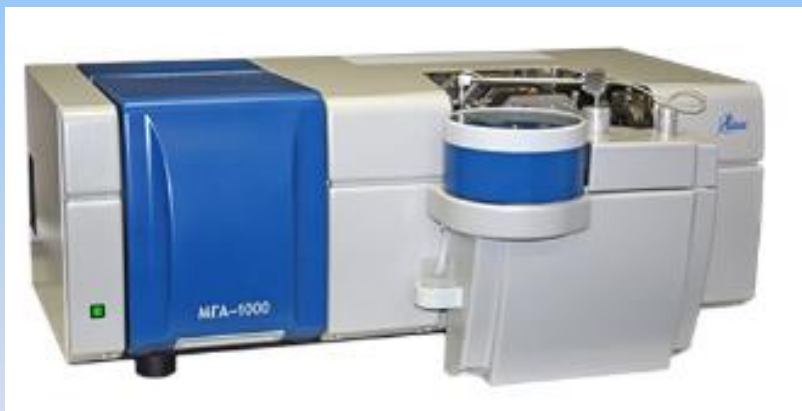
- Вариант этого метода с зеемановской коррекцией неселективного поглощения позволяет определять очень низкие содержания широкого круга элементов в биожидкостях без их разложения.
- Пределы обнаружения, достигнутые для GFAAS достаточно низки для определения в биожидкостях всех элементов, представляющих интерес в токсикологических исследованиях.



ААС с электротермической атомизацией

Зеемановские атомно-абсорбционные спектрометры с модуляцией поляризации, выпускаемые ООО «Люмэкс» (г.Санкт-Петербург)

МГА-1000



МГА-915М





ААС с электротермической атомизацией

- В ФГБУН ИТ ФМБА России разработаны Методические Указания (МУК) по прямому определению Tl, Se Pb, Mn, Cr, Al, Ti, Ni, Be, Cd в пробах крови человека.
- Методические указания уникальны, поскольку позволяют проводить анализ проб крови без ее минерализации, используя только разбавление проб деионизированной водой. Такой подход позволяет избежать возникновения систематических погрешностей на стадии пробоподготовки.
- Возможности метода GFAAS в сочетании с зеемановской спектрометрией можно проиллюстрировать на примере, проведенного в институте токсикологии определения As и Tl и крови. Удалось достичь низких пределов обнаружения в крови как для Tl (0,3 мкг/л), так и для As (0,1 мкг/л), что лучше пределов, получаемых в методе ICP MS.

Ivanenko N.B., Solovyev N.D., Ivanenko A.A., Navolotskii D.V. Biological monitoring of arsenic pollution based on whole blood arsenic atomic absorption assessment with in situ hydride trapping. J. Anal. At. Spectrom. 2014; 29:1850-1857.

Solovyev N.D., Ivanenko N.B., Ivanenko A.A. Whole Blood Thallium Determination by GFAAS with High-Frequency Modulation Polarization Zeeman Effect Background Correction. [Biological Trace Element Research](#). 2011; 143: 591-599.



ААС с электротермической атомизацией ⁵

- Метод GFAAS в сочетании с зеемановской модуляционной поляризационной спектрометрии при определении 1-2 элементов в настоящее время является высококонкурентным в области аналитической элементной токсикологии.
- Отметим, что разработанные методики регулярно применяют в рутинной клинической диагностике воздействия металлов в поликлинике ФГБУН ИТ ФМБА России.
- Методика определения таллия в крови была успешно применена для подтверждения факта интоксикации таллием, а также мониторинга текущего состояния пациента и контроля над ходом лечения.
- Методики определения свинца, кадмия, марганца также использовали при проведении биомониторинга на предприятиях, подведомственных Федеральному медико-биологическому агентству.
- Наряду с высокой чувствительностью и селективностью современные зеемановские спектрометры с электротермической атомизацией при анализе биопроб позволяют избежать пробоподготовки, что в ряде случаев существенно улучшает правильность анализа и уменьшает экспериментальную ошибку.



ААС с электротермической атомизацией ⁶

Определение ртути

- Высокий потенциал ионизации ртути (10 эВ) и ее высокая упругость паров существенно повлияли на конструкцию и специфику работы атомно-абсорбционных анализаторов, предназначенных исключительно для определения ртути. В воздухе почти вся ртуть находится в виде атомных паров, она легко восстанавливается в растворах до атомного состояния с возможным последующим выделением атомарной ртути обычной прокачкой анализируемого раствора воздухом или другим газом, температура диссоциации самых прочных соединений ртути не превышает 800° С и при этой температуре ртуть не окисляется на воздухе.
- Все это позволяет использовать атомизаторы, прокачиваемые обычным воздухом и работающие при относительно низкой температуре атомизации.
- Высокая токсичность ртути, даже при ее малых содержаниях в окружающей среде и организме человека, потребовала создания специализированных ртутных анализаторов.
- Один из самых эффективных в мире специализированных ртутных анализаторов является зеемановский ртутный спектрометр РА-915М и его различные модификации,



Ртутный зеемановский спектрометр РА-915М и его модификации

РА-915М



РА-915М / РП-92



РА-915М / ПИРО-915+





Ртутный зеемановский спектрометр РА-915М и его модификации

- РА-915М / РП-92 применяется определения концентрации ртути в любых пробах (питьевые, сточные и природные воды, смывы с поверхностей, биопробы, продукты питания и т.д.) методом холодного пара. Использование многоходовой кюветы позволяет достичь ультранизких инструментальных пределов обнаружения (0,5 нг/л).
- РА-915М / ПИРО-915+ предназначен для прямого (без предварительной химической пробоподготовки) определения ртути в жидких и твердых образцах самого разнообразного состава. Низкие пределы обнаружения ртути на уровне единиц мкг/кг позволяют проводить фоновый контроль почв, контроль пищевых продуктов на соответствие нормам ПДК.
- Отметим, что в последние годы исследователи все большее внимание уделяют изучению влияния низких содержаний ртути на организм человека. В институте токсикологии разработана методика прямого определения ртути в крови человека и проведена ее апробация при исследовании влияния низких содержаний ртути на состояние здоровья беременных женщин. В результате проведенных исследований была выявлена связь между содержанием ртути в крови беременных женщин с вероятностью раннего прерывания беременности.
- *Зубакина Е.А., Иваненко Н.Б., Столярова Н.В., Ганеев А.А., Кашуро В.А., Байбуз Д.В., Безручко М.М. Прямое определение содержания ртути и свинца в крови беременных женщин и влияние их уровня на возникновение потерь беременности ранних сроков. Токсикологический вестник. 2019; 6 (159): 56-61.*



ИСП МС

- Достоинства данного метода общеизвестны: высокая чувствительность, широкий динамический диапазон, хорошая воспроизводимость результатов, применимость для детектирования большинства химических элементов, в том числе при их параллельном определении, возможность работать в on-line режиме. При анализе биосубстратов, в первую очередь, это относится к таким объектам, как сыворотка и плазма крови, моча, спинномозговая и амниотическая жидкости, экстракты цитозоля клеток, низкие содержания микроэлементов в которых ограничивают применение каких-либо других детекторов, метод ИСП-МС обычно не имеет альтернативы.
- При использовании индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионизации необходимо учитывать возможные спектральные помехи – наложение сигналов полиатомных и двухзарядных ионов, изобарные наложения. Эффективным способом коррекции помех полиатомных ионов в квадрупольной масс-спектрометрии является их фрагментация в результате ионно-молекулярных реакций в столкновительно-реакционных ячейках, но наиболее оптимальное разделение ионных сигналов определяемых элементов и полиатомных ионов достигается при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения (ВР - ИСП -МС).



Методы определения химических форм элементов

- Сравнительно недавно возникло, а в настоящее время интенсивно развивается новое междисциплинарное научное направление Металломика.
- Металломика объединяет области биологии, химии и медицины, связанные с определением химических форм элементов в живых клетках, изучением их функций и распределения в организме, выяснением молекулярных механизмов металлозависимых биологических процессов. В рамках металломики изучают функции и распределение химических элементов в биологических системах, а также молекулярные механизмы металлозависимых биологических процессов.
- Важнейшая область металломики – методы элементного, вещественного и структурного анализа, поскольку только достоверное определение химических форм элементов в биологических средах может обеспечить успешное развитие этого научного направления.
- Для определения химических форм элементов используются несколько методов, но основными являются два из них – ВЭЖХ-МС и КЭ-ИСП МС.



ВЭЖХ – ИСП-МС

- Одним из наиболее распространенных вариантов ВЭЖХ при определении форм микроэлементов является обращеннофазовая жидкостно-абсорбционная хроматография (ОФЖАХ), с использованием в качестве стационарных фаз силикагеля, модифицированного прививкой силанольных групп С18. ОФЖАХ обеспечивает разделение неполярных и малополярных форм элементов.
- Из других вариантов ВЭЖХ для разделения форм микроэлементов, присутствующих в биологических объектах, чаще всего применяется ионная (ИХ) и ионпарная хроматография (ИПХ). Первая обеспечивает возможность разделения непосредственно ионных форм микроэлементов, присутствующих в биологических жидкостях. Вариант ИПХ позволяет повысить селективность разделения форм элементов за счет использования ион-парных реагентов, образующих электронейтральные, как правило, неполярные ассоциаты только с одной из определенных форм, которые далее определяют методом ОФЖАХ.
- Основное применение ИПХ, при решении задач токсикологии, находит для определения форм As [I, II], и Se. ИПХ используют также для определения Cr (III) / Cr (VI) и валентных форм других элементов, например Sb (III) / Sb (V).



КЭ-ИСП-МС

- Существенным дополнением, а иногда альтернативой хроматографическим методам в вещественном анализе биологических объектов в последние годы становится капиллярный электрофорез (КЭ).
- КЭ позволяет разделять простые неорганические ионы, элементарноорганические соединения, комплексы элементов с органическими лигандами и биомолекулами. По сравнению с ВЭЖХ КЭ, как правило, обеспечивает более высокое разрешение, уменьшение объемов пробы и времени разделения.
- При изучении распределения химических форм и метаболизма элементов в живом организме в условиях капиллярного электрофореза по сравнению с ВЭЖХ значительно проще моделировать условия, существующие в живой клетке.
- Вместе с тем метод КЭ ограничен по чувствительности. Содержание многих форм элементов в ряде случаев оказывается ниже пределов обнаружения (ПО) наиболее чувствительных систем детектирования, что требует дополнительной стадии концентрирования аналитов перед разделением.

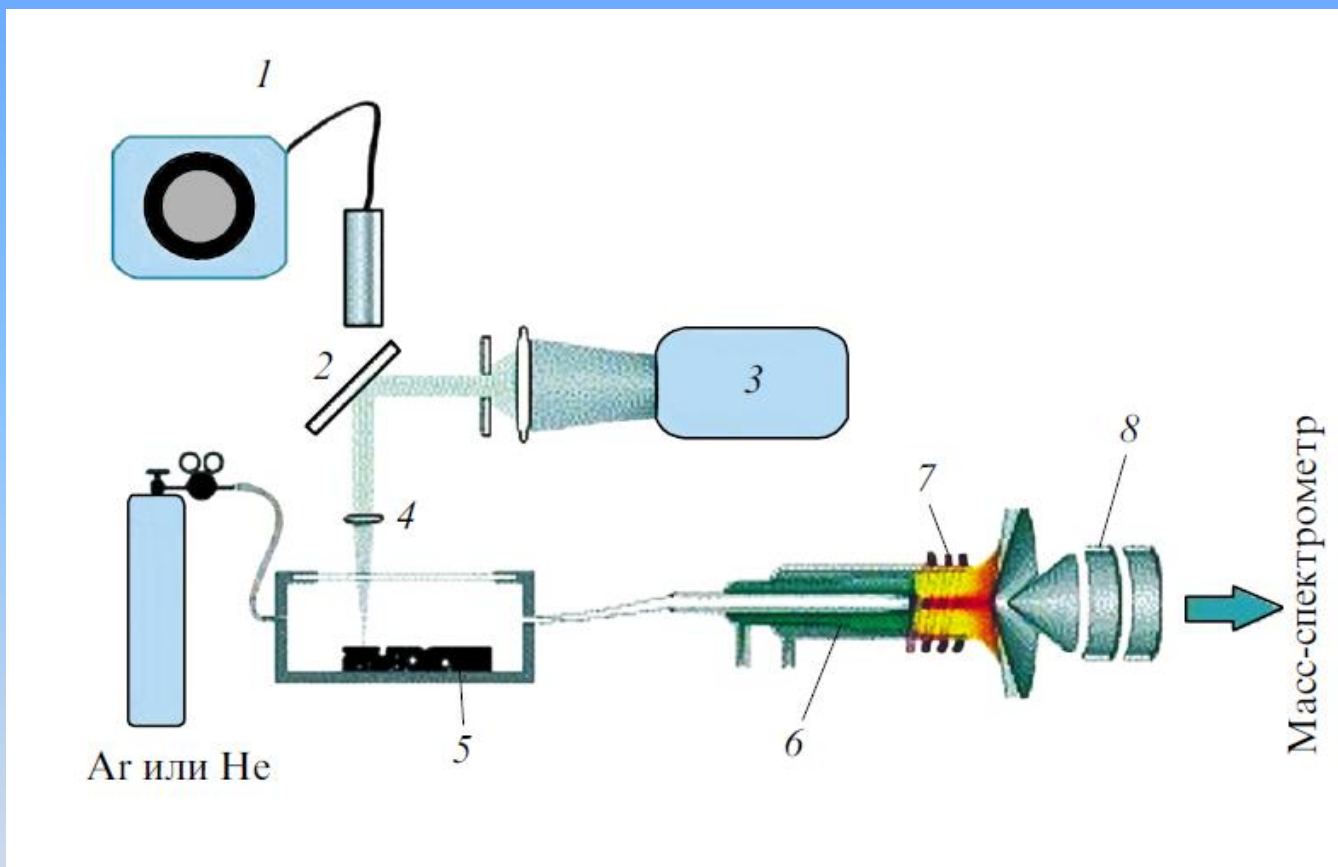


Схема метода LA-ICP-MS

1 – видеокамера, 2 – зеркало, 3 – лазер, 4 – линза, 5 – камера абляции, 6 – горелка, 7 – высокочастотная катушка, 8 – ион-оптическая система



- В настоящее время LA-ICP-MS – широко используемый метод определения большого круга элементов в твердотельных пробах. Области применения этого метода весьма широки – от геохимии до анализа объектов окружающей среды, медицины и токсикологии.
- Совершенствование метода LA-ICP-MS связано с созданием новых методик анализа широкого круга объектов, в первую очередь биологических и созданием вариантов 2D- и 3D-картирования пробы. Совершенствование самого метода идет по пути внедрения коротковолновых фемтосекундных лазеров, позволяющих получить при распылении частицы меньшего размера, и улучшить правильность анализа
- Источником лазерного излучения в методе LA-ICP-MS в большинстве случаев являются твердотельный лазер NdYAG, работающий на 4-й (266 нм) или 5-й (213 нм) гармонике, и эксимерные лазеры, в первую очередь ArF с длиной волны генерации 193 нм.
- Весьма эффективным оказывается определения распределения элементов в срезах тканей животных и человека (например печень и мозг, ткани глаза, почки). В частности, система LA-ICP-MS с лазером с длиной волны излучения 213 нм позволяет проводить планарное сканирование с определением элементного распределения в биопrobe с разрешением порядка микрона, а в ряде случаев и долей микрона. Это дает возможность в ряде случаев определять распределение элементов внутри клетки



- Еще одной новой областью применения LA-ICP-MS при анализе биопроб является изотопный анализ. Он применяется как для исследования распределения изотопных маркеров в организме, так и для изучения и использования для диагностических целей изотопного фракционирования, возникающего в различных обменных процессах.
- Использование LA-ICP-MS при анализе биопроб не ограничивается упомянутыми направлениями. Отметим еще некоторые:
 1. Фармакокинетика и контроль процесса доставки лекарств.
 2. Исследование накопления токсичных металлов в тканях растений и животных вследствие естественной или искусственной экспозиции
 3. Имиджинг контрастирующих агентов (маркеров), в частности Gd при диагностике и терапии опухолей, разработке лекарственных средств.
 4. Определение распределения металлов из противораковых лекарств, как правило платины, но также Os, Ru.
 5. Определение распределения в тканях микроэлементов, ассоциированных с различными заболеваниями (болезнь Альцгеймера (Al)).
 6. Исследование токсичности противораковых наночастиц с РЗЭ, цисплатина и других лекарств
 7. Исследование проникновение опухоли в ткани и клетки.
 8. Детектирование распределения специфически связанных белков в тканях по распределению металлов в тканях, при использовании наночастиц и антител



Спасибо за внимание!