

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИКО-АНАЛИТИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА



Т.С. Уланова,
*доктор биологических наук,
заведующая отделом химико-
аналитических методов
исследования,
ФГУН «Федеральный научный
центр медико-профилактических
технологий управления рисками
здоровью населения»
Роспотребнадзора*



Т.В. Нурисламова,
*доктор биологических наук,
заведующая лабораторией
методов газовой хроматографии,
ФГУН «Федеральный научный
центр медико-профилактических
технологий управления рисками
здоровью населения»
Роспотребнадзора*



Т.Д. Карнажицкая,
*кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией
методов жидкостной
хроматографии,
ФГУН «Федеральный научный
центр медико-профилактических
технологий управления рисками
здоровью населения»
Роспотребнадзора*



Е.В. Стенно,
*заведующая лабораторией
методов атомно-абсорбционного
и электрохимического анализа,
ФГУН «Федеральный научный
центр медико-профилактических
технологий управления рисками
здоровью населения»
Роспотребнадзора*

Рассматриваются современные подходы к оценке степени неблагоприятного экологического воздействия на состояние здоровья и диагностики экозависимых изменений состояния здоровья человека. На основе проведенных работ сформировано новое научно-практическое направление – диагностические химико-аналитические исследования по определению органических соединений и ряда тяжелых металлов в биологических средах групп населения, проживающих в условиях различной антропогенной нагрузки.

На современном этапе одним из приоритетных направлений государственной политики является укрепление здоровья населения. Вместе с тем стремительные темпы развития промышленного производства и увеличивающийся уровень антропогенного воздействия ведут к загрязнению окружающей среды и возникновению различного рода заболеваний, поэтому рассмотрение экологических аспектов

здоровья населения является одной из важнейших проблем, стоящих перед человечеством [1, 5, 6, 10].

Одним из подходов оценки степени неблагоприятного экологического воздействия и диагностики экозависимых изменений состояния здоровья является определение химических соединений в биосредах человека. В докладах экспертов Всемирной организации здравоохранения

по критериям качества окружающей среды в связи с воздействием на организм человека наиболее токсичных соединений рекомендуется проводить биомониторинг с определением содержания химических соединений в биосредах, позволяющих решать проблемы обеспечения экологической безопасности населения, проводить исследования по оценке рисков антропогенного воздействия экологических факторов на здоровье населения и т.д. [2, 3, 4, 10].

В современной лабораторной практике выполнение биомониторинга напрямую связано с развитием и совершенствованием методических подходов при обнаружении контаминантов в биосредах населения, обеспечивающих высокую чувствительность и селективность определения, а также высокую степень точности и воспроизводимости результатов анализа [11, 12].

На основании многолетних исследований, выполненных сотрудниками Центра в развитии биомониторинга, разработана новая система научно-методических принципов химико-аналитического определения ряда соединений классов предельных и ароматических углеводородов (гексана, гептана, бензола, толуола, этилбензола, о-, м-, п-ксилола), алифатических спиртов (метилового, этилового, пропилового, изопропилового, бутилового, изобутилового), алифатических альдегидов (формальдегида, ацетальдегида, масляного, пропионового), фенолов (фенола), кетонов (ацетона), ароматических аминов (анилина, N-метиланилина, N,N-диметиланилина, N-этиланилина, N,N-диэтиланилина, о-толуидина), ряда тяжелых металлов и микроэлементов (свинца, марганца, хрома, никеля, меди, цинка, магния, железа, ванадия) в биологических средах (моча, кровь) [8, 9].

Предельные и ароматические углеводороды. Методические приемы определения ряда предельных и ароматических углеводородов при совместном присутствии, разработанные на примере анализа биосред детей, основаны на предварительном изолировании этих соединений из биологического материала путем на-

гревания исследуемой биопробы в замкнутом объеме и последующего анализа равновесной паровой фазы методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. Диапазон определяемых концентраций составляет от 0,005 до 0,2 мг/дм³ в крови и от 0,03 до 4,1 мг/дм³ в моче, с погрешностью от 7,1 до 23,8 %.

Стирол. Для определения стирола в крови наиболее оптимальным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектором ($\lambda=254$ нм). В процессе разработки метода, учитывая влияние других ароматических углеводородов, обосновано определение методом обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке, заполненной сорбентом с привитыми алкилсилильными группами – сепароном SGX C18. Экспериментально определено оптимальное соотношение ацетонитрила и воды, при котором достигнуто селективное разделение смеси, выбраны оптимальные условия для разделения: соотношение фазы «ацетонитрил : вода» – 60 : 40; скорость движения элюента – 0,6 мл/мин. В качестве растворителя-экстрагента обосновано использование гексана с добавлением 0,2 мл 10 %-ного раствора гидроксида натрия с последующей экстракцией. Диапазон измеряемых концентраций: 0,09–5 мг/дм³, с максимальной погрешностью 23,2 % (рис. 1, 2).

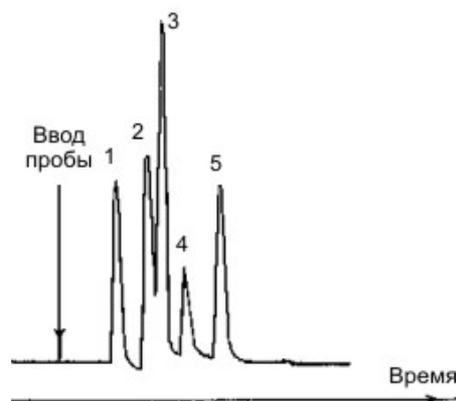


Рис. 1. Хроматограмма разделения стандартной смеси стирола в присутствии ароматических углеводородов, выполненная на колонке с сепароном C₁₈ при использовании элюента ацетонитрил:вода (60:40): 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – стирол (1 мг/дм³), 4 – ксилол, 5 – этилбензол

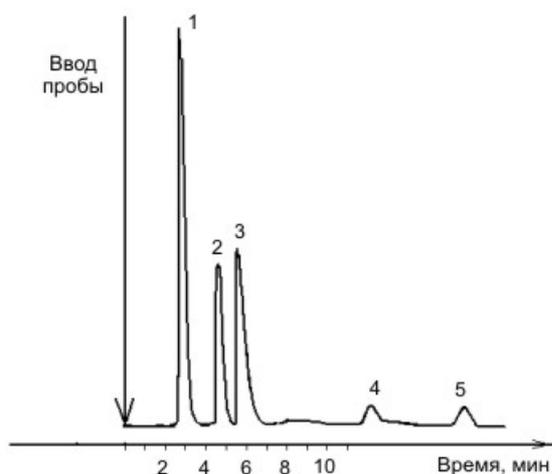


Рис. 2. Хроматограмма крови пациента: 1 – бензол, 2 – толуол, 3 – стирол ($C = 0,336 \text{ мг/дм}^3$), 4, 5 – неидентифицированные пики

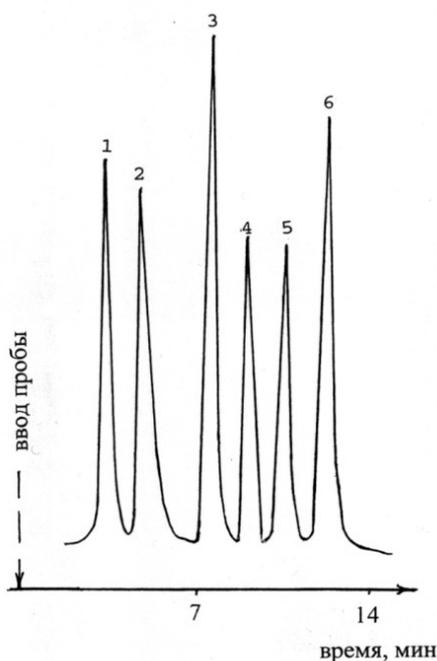


Рис. 3. Хроматограмма смеси алифатических спиртов $C_1 - C_4$, полученная в режиме программирования температуры колонки: 1 – метанол, 2 – этанол, 3 – изопропанол, 4 – пропанол, 5 – изобутанол, 6 – бутанол

Алифатические спирты. Определение алифатических спиртов в крови и моче основано на газохроматографическом анализе равновесной паровой фазы. Диапазон определяемых концентраций в крови составляет $0,003-2 \text{ мг/дм}^3$; в моче – $0,002-1 \text{ мг/дм}^3$ погрешность определения не превышает 24,2 % (рис. 3, 4).

Хлорорганические соединения. Экстракция. Метод определения хлорорганических соединений (хлороформ, 1,2-дихлорэтан) основан на предварительном концентрировании анализируемых соеди-

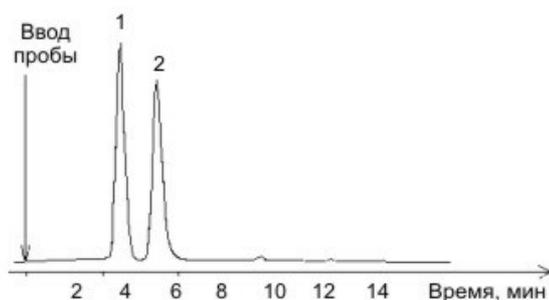


Рис. 4. Хроматограмма мочи обследованного пациента: 1 – метанол ($C = 3,2 \text{ мг/дм}^3$), 2 – этанол ($C = 1,62 \text{ мг/дм}^3$)

нений из мочи экстракцией гептаном и гексаном (тетрахлорметан, хлорбензол), из крови – диэтиловым эфиром и последующем газохроматографическом анализе экстракта. Средние значения полноты экстракции хлорорганических соединений из крови и мочи составили 90–100 %.

Достигнутые пределы обнаружения в крови и моче (мкг/см^3) составили соответственно: хлороформа – 0,002 и 0,012, тетрачлорметана – 0,0002 и 0,001, 1,2-дихлорэтана – 0,025 и 0,06, хлорбензола – 0,011 и 0,044. Погрешность методов – 12,6–23,7 %.

Хлорорганические соединения. Парофазный анализ. Для определения алифатических хлорорганических соединений (хлороформ, тетрачлорметан, 1,2-дихлорэтан) в биологическом материале (моча, кровь) использован парофазный анализ с последующим газохроматографическим разделением. Для повышения полноты извлечения анализируемых соединений отработан прием высаливания хлоридом натрия ($0,5 \text{ г}$ на 5 см^3 биопробы). При этом удалось увеличить чувствительность определения хлорорганических соединений в биосредах в 1,5–2 раза. Средняя полнота извлечения изучаемых соединений из крови и мочи составила 90–96 %.

Модифицированные применительно к анализу крови и мочи методы позволили выполнять определение с пределом обнаружения (мкг/см^3) для крови и мочи соответственно: хлороформ – 0,005 и 0,0015, тетрачлорметан – 0,0006 и 0,0004, 1,2-дихлорэтан – 0,05 и 0,0125. Погрешность определения – 9,09–28,9 %.

При сопоставлении метрологических параметров двух аналитических способов

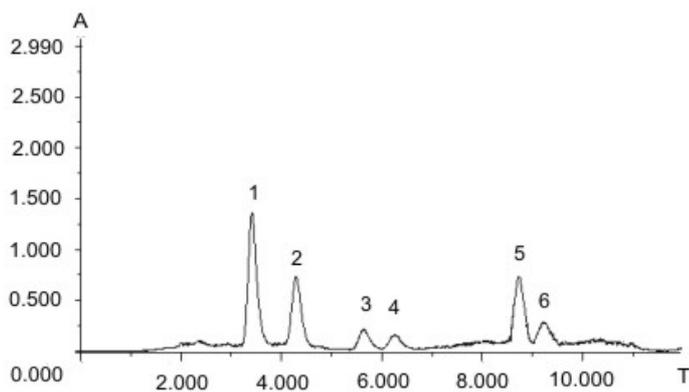


Рис. 5. Хроматограмма стандартной смеси 2,4-динитрофенилгидразонов. Колонка (80×3 см). Диасорб С₁₆:
1 – формальдегид, 2 – ацетальдегид, 3 – ацетон,
4 – пропионовый альдегид, 5 – метилэтилкетон,
6 – масляный альдегид

концентрирования можно сделать заключение о более высоких характеристиках при использовании для анализа хлорорганических соединений метода экстракции.

Фенол и алкилфенолы (о-, м-, п-крезол). Методические подходы при определении фенола и алкилфенолов в биосредах основаны на получении производных по гидроксильной группе – метилфенилового эфира (кровь) и фенилацетата (моча) с последующей экстракцией органическим растворителем. Экспериментальным путем подобраны оптимальные газохроматографические параметры определения фенола и алкилфенолов в биологических средах. Высокие параметры экстракции изучаемых соединений из крови (96,4–97,0 %) получены при применении в качестве экстрагента диэтилового эфира и нагревании экстракта при температуре 35–40 °С.

Разработанные газохроматографические методы позволяют выполнять определение фенола и алкилфенолов в крови и моче с нижним пределом обнаружения (мкг/см³) соответственно: фенол 0,027 и 0,022, о-, м-, п- крезолы – 0,05 и 0,004. Погрешность методов определения 9,75–24,8 %.

Ацетон. Разработан метод определения ацетона, основанный на газохроматографическом анализе равновесной паровой фазы над исследуемой биологической жидкостью. Диапазон определяемых концентраций (кровь, моча) составляет 0,01–0,2 мг/дм³, максимальная погрешность

определения 22,9 %.

Алифатические альдегиды. Для определения микроколичеств алифатических альдегидов в биосредах на фоне сложной биологической матрицы, содержащей большое число примесей, наиболее оптимальным вариантом является использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с дериватизацией исследуемых карбонильных соединений с 2,4-динитрофенилгидразином и экстракцией продуктов дериватизации (2,4-динитрофенилгидразонов соответствующих альдегидов) гексаном (степень извлечения 88,5 %). Диапазон определяемых концентраций алифатических альдегидов в исследуемых биосредах (кровь, моча) составляет 0,001–1 мг/дм³ с максимальной погрешностью определения 26,5 % (рис. 5, 6).

Ароматические аминсоединения.

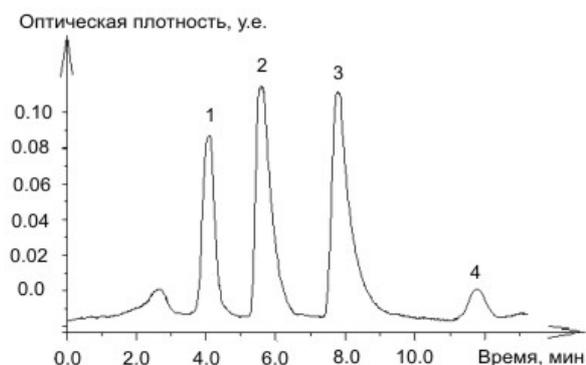


Рис. 6. Хроматограмма крови пациента:
1 – формальдегид ($C = 0,33 \text{ мг/дм}^3$);
2 – ацетальдегид ($C = 0,14 \text{ мг/дм}^3$); 3 – ацетон,
4 – масляный альдегид ($C = 0,001 \text{ мг/дм}^3$)

Методические подходы при определении в биосредах ароматических аминов – анилина и ряда N-алкиламинов (N-метиланилина, N,N-диметиланилина, N-этиланилина, N,N-диэтиланилина, о-толуидина) основаны на использовании экстракционно-хроматографического метода, заключающегося в предварительной экстракции анализируемых аминокислотных соединений из биологического материала в хлороформ и последующем газохроматографическом анализе хлороформенного экстракта. Диапазон определяемых концентраций ароматических аминокислотных соединений в крови составляет 0,03–4,2 мг/дм³, в моче – 0,04–0,5 мг/дм³ с погрешностью определения не более 21,4 %.

Разработаны методы определения ряда тяжелых металлов и микроэлементов в биологических средах на основе специальных приемов пробоподготовки и использовании атомно-абсорбционного анализа, который в настоящее время является наиболее распространенным селективным методом определения металлов, используемым в современной аналитической практике для выполнения массовых анализов.

Основными вопросами, которые были реализованы в процессе разработки методов определения металлов в биосредах атомно-абсорбционным анализом в режиме пламенной атомизации, являлись обоснование выбора основных параметров метода, достижение минимальной величины характеристической концентрации и получение удовлетворительных характеристик измерения воспроизводимости, сходимости и точности.

Для жидких биосред (моча, желчь, желудочный сок) отработан вариант прямого атомно-абсорбционного определения, позволяющий проводить элементометрию для всех исследуемых металлов из одной пробы, минуя стадию предварительного перевода биологического материала в анализируемый раствор.

На основании использования атомно-абсорбционного анализа в режиме пламенной атомизации и прямой элементометрии в условиях влияния матричной основы разработаны методы определения

марганца, свинца, цинка, никеля, меди, хрома, кадмия, железа в моче, желчи, желудочном соке с относительной погрешностью определения от 2,9 до 19,5 % для каждого ингредиента.

Для таких биосред, как волосы и кровь, разработаны способы перевода исследуемого биологического материала в анализируемый раствор: с помощью сильных неорганических окислителей (способ кислотной минерализации), термическим озолением, сочетанием способов термического разложения и кислотной минерализации.

Способ термического разложения использовался при определении в крови таких элементов, как никель, медь, цинк, хром. Установлено, что полное разложение биоматериала происходит при температурах не ниже 450–500 °С, данные условия позволяют получить растворимый зольный остаток белого цвета, который при последующей минерализации переводят в анализируемый раствор. Отработаны температурно-временные этапы озоления, общее время термического разложения – 9 часов.

По результатам элементометрии, выполненной с использованием различных способов пробоподготовки (с помощью кислотной минерализации и термического разложения), установлено, что для определения ряда элементов (никеля, цинка, меди, железа, хрома, марганца и свинца) в пробах волос и крови оптимальным является вариант сочетания этих способов.

Результаты элементометрии, выполненные различными способами пробоподготовки, позволяют выбрать оптимальный вариант проведения исследований при определении необходимого спектра элементов в исследуемом биоматериале.

При определении ванадия в биосредах (кровь) разработан метод прямой элементометрии атомно-абсорбционным анализом с электротермической атомизацией. Экспериментально обоснованы основные этапы аналитической программы и аналитических параметров прибора МГА-915 для выбора оптимальных условий элементопределения; для полного устране-

ния эффекта матрицы экспериментально обосновано использование химических модификаторов, оптимальным из которых является 1 % раствор нитрата палладия в сочетании с восстановителем (1 % раствор аскорбиновой кислоты), применение которых уже на стадии озоления позволяет эффективно разрушить матрицу биопробы.

Установленные экспериментально аналитические параметры, температурно-временные этапы работы электротермического атомизатора, использование оптимальных условий пробоподготовки позволили получить высокие значения аналитического сигнала при определении ванадия в крови, соответствующего 4,0 пг при воспроизводимости 6 % в диапазоне концентраций 0,0015–0,0150 мг/дм³ с погрешностью определения 25 %.

Таким образом, в развитии биомониторинга для определения широкого спектра химических соединений, тяжелых металлов и микроэлементов на основе современных физико-химических методов анализа разработана новая эффективная

система высокочувствительных и селективных методов определения органических соединений – представителей классов ароматических углеводородов, алифатических спиртов, алифатических альдегидов, фенолов, кетонов, ароматических аминов, тяжелых металлов и микроэлементов в диагностических средах человека (кровь, моча).

На основе проведенных исследований сформировано новое научно-практическое направление – диагностические химико-аналитические исследования по определению химических соединений, тяжелых металлов и микроэлементов в биосредах отдельных групп населения, проживающих в условиях высокой антропогенной нагрузки. Диагностические химико-аналитические исследования выполняются при проведении обследования населения, проживающего в зонах экологического риска, при оценке эффективности комплекса лечебно-профилактических технологий, как доказательная база экологически обусловленной заболеваемости и т.д.

Библиографический список

1. *Беляев Е.Н.* Роль санэпидслужбы в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации // Издательско-информационный центр Госкомитета сан.-эпид. надзора РФ. – М., 1996. – 416 с.
2. *Зайцева Н.В.* Диагностика и коррекция экологически обусловленных состояний у детей. Региональные проблемы // Материалы пленума «Экологически обусловленные заболевания человека: методологические проблемы и пути их решения». – М., 2000. – С. 3–5.
3. *Зайцева Н.В., Аверьянова Н.И., Корюкина И.П.* Экология и здоровье детей Пермского региона // Пермь: ИПК «Звезда», 1997. – 146 с.
4. *Зайцева Н.В., Уланова Т.С., Плахова Л.В.* Влияние полиметаллических загрязнений объектов окружающей среды на изменение микроэлементного состава биосред у детей // Гигиена и санитария. – 2004. – № 3. – С. 11–15.
5. Интегрирующая роль медицины окружающей среды в профилактике, ранней диагностике и лечении нарушений здоровья, связанных с воздействием факторов среды обитания человека / *Ю.А. Рахманин* [и др.] // Гигиена и санитария. – 2005. – № 6. – С. 3–6.
6. *Майстренко В.Н., Клюев Н.А.* Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. М.: Биомон. Лаборатория знаний, 2004. – 323 с.
7. *Онищенко Г.Г.* Окружающая среда и состояние здоровья населения. Экологическая доктрина России в контексте общенациональной стратегии устойчивого развития // Гигиена и санитария. – 2001. – № 5. – С. 4–10.
8. Определение вредных веществ в биологических средах: сб. метод. указ. – МУК 4.1.2102-4.1.2116-06. : сб. метод. указ. – М., 2008.
9. Определение химических соединений в биологических средах: сб. метод. указ. – МУК 4.1.763-4.1.779-99. – МЗ РФ. – М., 2000.
10. *Ревич Б.А.* Биомониторинг токсичных веществ в организме человека // Гигиена и санитария. – 2004. – № 6. – С. 26–31.
11. *Уланова Т.С.* Научно-методические основы химико-аналитического обеспечения гигиенических и медико-биологических исследований в экологии человека // Дис. ... д-ра биол. наук. – Пермь, 2006. – 407 с.
12. *Юдина Т.В.* Теоретические и методические основы физико-химического контроля в гигиенической донозологической диагностике // Дис. ... д-ра биол. наук. – М., МНИИГ им. Эрисмана, 1992. – 322 с.