раздел **БИОЛОГИЯ и ЭКОЛОГИЯ**

УДК 543.054, 543.061, 543.062, 619:612.284(04)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В МИНЕРАЛИЗАТАХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© Р. Р. Ильясова[1]*, Л. М. Саптарова[2], Э. Н. Когина[2], Ю. Н. Саптаров[2], А. Д. Насибуллин[2], Г.И. Каримова[2], А. Ю. Юрасов[2]

[1]Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.

[2]Башкирский государственный медицинский университет
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, ул. Пушкина, 96/98.

Тел.: +7 (927) 315 55 71.
**Email: Ilyasova_R@mail.ru*

Изучено содержание ряда ионов тяжелых металлов в динамике в минерализатах тканей почек белых беспородных крыс в результате интоксикации порошком медно – цинковой колчеданной руды, добыча и переработка которой осуществляется на ряде предприятий Республики Башкортостан. Количественный анализ на содержание ионов тяжелых металлов: Cu (II), Fe (III), Co (II), Cd (II), Zn (II) и Pb (II) выполнено методом атомно-абсорбционной спектроскопии по известным методикам. Установлено, что ионов тяжелых металлов постепенно увеличиваются в тканях почек исследованных животных. При этом в период ремиссии наблюдается повышенное содержание ионов тяжелых металлов в исследованных тканях.

***Ключевые слова**: атомно-абсорбционная спектроскопия, тяжелые металлы, ткани почек.*

Введение

Одними из наиболее распространенных загрязнителей биосферы являются соединения тяжелых металлов с атомным весом больше 40. К возможным источникам загрязнения биосферы соединениями тяжелых металлов относят предприятия черной и цветной металлургии, по добыче и переработке металлосодержащих руд и др. В природную среду соединения тяжелых металлов могут попасть с аэрозольными выбросами, сточными водами промышленных предприятий [1–2].

Многие из ионов тяжелых металлов биологически активны. При этом биологическое действие ионов металлов на организм человека и животных различно и зависит от природы металла, его соединения, формы нахождения в окружающей среде и концентрации. В водных средах ионы тяжелых металлов образуют большое количество самых разнообразных комплексов, состав которых зависит от pH среды.

В ряду тяжелых металлов одни необходимы для жизнедеятельности человека и животных. Биогенные металлы являются макро- и микроэлементами, участвуют в окислительно – восстановительных реакциях; в реакциях катализа, гидролиза и др. [3–7]. В избытке соединения биогенных металлов, проникая в клетки живых организмов, нарушают процессы обмена веществ, влияют на активность жизненно важных веществ – гормонов и ферментов и т.д.

Другая часть тяжелых металлов – ксенобиотики, чуждые для биоты, попадая в организм человека или животного, вызывают отравления и при постепенном накоплении хронические заболеваний печени, почек и др. органов, а также могут привести к летальному исходу.

Известно, что основной путь поступления соединений тяжелых металлов в организм – это желудочно-кишечный тракт с водой и пищей. Поступая через пищеварительную систему в ткани почек, печени и др., они запускают механизмы формирования экологически зависимого патологического процесса. В результате страдает функционирование работы ряда биологических систем: желудочно-кишечной, иммунной, эндокринной, центральной нервной систем человека и животных и др. [3–7].

Транспорт ионов тяжелых металлов происходит в виде ионов или комплексов с аминокислотами, жирными кислотами и, в большей степени, с белками, образующими с ними прочную связь. Проникая в избытке в клетки тканей, они блокируют тиоловые группы мембранных протеинов, из которых около 35% являются ферментами и нарушают стабильность белково-липидных комплексов клеточной мембраны и ее проницаемость. Распределение и депонирование тяжелых металлов происходят практически во всех органах. Особый интерес представляет способность этих веществ накапливаться в почках как основного органа выделительной системы организма человека и животных.

В настоящее время для количественного анализа соединений металлов используются методы спектроскопии, вольтамперометрии, ферментативные методы и др. При анализе сложных по составу

биообразцов достаточно эффективно можно использовать метод атомно – абсорбционной спектроскопии ААС. Достоинствами ААС являются универсальность и экспрессность, что важно при анализе большого количества образцов [8].

Целью настоящей работы явилось решение вопросов, связанных с изучением оптимальных условий методики предварительной подготовки и последующий анализ образцов минерализатов тканей почек методом атомно-абсорбционной спектроскопии на содержание ионов тяжелых металлов с учетом специфики биомедицинских образцов при интоксикации животных в течение 3 месяцев медно-цинковой колчеданной рудой.

Экспериментальная часть

Для количественного анализа тканей почек белых крыс при интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой методом атомно-абсорбционной спектроскопии использованы водные растворы ряда соединений тяжелых металлов, таких как, Cu (II), Zn (II), Fe (III), Co (II), Cd (II), Pb (II).

Содержание указанных металлов в растворах после вскрытия образцов тканей почек проводили атомно-абсорбционным методом на спектрометре «Шимадзу» (Япония), при электротермическом способе атомизации пробы, условия определения приведены в *табл.* 1.

Стандартные растворы вышеуказанных соединений тяжелых металлов готовили разбавлением государственных стандартных образцов с концентрацией 100 мкг/мл бидистиллированной водой. Для приготовления водных растворов использовали: ГСО 10495–2011 ионов кадмия (II); ГСО 10278–2011 ионов свинца (II); ГСО 9947–2011 ионов железа (III); ГСО 10496–2011 ионов меди (II), ГСО 10497–2011 ионов цинка; ГСО 8089–94/8091–94 ионов кобальта (II).

Таблица 1

Условия проведения анализа на содержание ионов тяжелых металлов при электротермическом способе атомизации

Элемент	Длина волны, нм
Cd (II)	228.8
Co (II)	240.7
Cu (II)	324.8
Pb (II)	283.3
Fe (III)	248.3
Zn (II)	213.9

Взвешивание проб проводили на аналитических весах OHAUS Pioneer PA (Китай).

Результаты измерения концентраций металлов регистрировали по показаниям прибора, откалиброванного согласно концентрациям рабочих стандартных растворов определяемого металла.

Расчет концентрации содержания металла *(C)* в подготовленных минерализатах образцов тканей почек проводили по следующему выражению:

$$C = a \times V / V_1,$$

где a – концентрация иона по калибровочному графику, мкг/мл,

V – общий объем анализируемого образца, мл,

V_1 – объем минерализованного образца, мл.

Оценку погрешности полученных результатов проводили с использованием критериев Стьюдента (t) и уровня значимости (p). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Размер частиц медно – цинковой колчеданной руды, вводимой в пищу изученных животных, определен с помощью лазерного анализатора SALD 7071 фирмы «Шимадзу» (Япония).

Всего изучено 45 животных массой 250–300 г, которые были разделены на 3 группы по 15 особей. Первую группу составили контрольные животные. Вторую и третью группы – животные, которым ежедневно с помощью специального зонда внутрижелудочно вводилась взвесь порошка медно - цинковой колчеданной руды (Учалинское месторождение, Республика Башкортостан) в 2% водном растворе крахмала из расчета 60 мг на 100 г массы животного в течение трех месяцев.

Подготовка образцов тканей почек животных и количественный анализ на содержание ионов металлов до и после проведенного эксперимента осуществляли методом атомно-абсорбционной спектроскопии по известной методике [9–11].

Результаты исследования и их обсуждение

Измерение размеров частиц вводимого в рацион животных порошка медно-цинковой колчеданной руды, показало, что размер частиц порошка находится в микрометровом диапазоне: от 4 мкм до 50 мкм.

Известно, что ткани почек содержат большое количество сложных органических соединений, поэтому требуется тщательная предварительная пробоподготовка анализируемого объекта.

С целью подготовки почек крыс к анализу образцы объекта анализа предварительно измельчали и гомогенизировали. Для уменьшения расхождения результатов между параллельными пробами применяли аналитические навески не менее 0.25–0.50 г.

Согласно литературным данным, для предварительной обработки проб биологических материалов необходимо провести минерализацию. Цель минерализации – ликвидировать органическую матрицу, не потеряв при этом определяемые компоненты [9–11].

В частности, одним из методов пробоподготовки биотканей является «сухое» озоление анализируемого образца, которое заключается в прокаливании пробы почки в муфельной печи при температуре 1150–1200^{0}C и дальнейшем растворении в кислотах, например, в соляной кислоте HCl. В соответствии с литературными данными, при сухом озолении происходит достаточно большая потеря ряда летучих ионов: Hg (II), As (III), Mn (II), Cr (III), Pb (IV) – до 10–25% анализируемого вещества.

«Мокрое» озоление – наиболее распространенный способ минерализации, который заключается в обработке пробы концентрированными кислотами-окислителями, например азотной, серной, иногда хлорной. При этом кислоту добавляют непосредственно к свежему или высушенному образцу ткани, который затем нагревают. При проведении «мокрой» минерализации потери анализируемых элементов в некоторой степени снижаются – до 5–7% анализируемого компонента образца.

«Мягкое» окисление навески заключается в добавлении к образцу гомогенизированных тканей почек 1–2 мл горячей конц. HNO_3, выдерживании в колбе 5–10 минут. В данном случае происходит медленное окисление белков. Далее колбу помещают в микроволновую печь при температуре 210^0С, времени удерживания 5 мин. при максимальной мощности. После чего смесь в колбе охлаждают до комнатной температуры, разбавляют пробы водой до объема 5 мл. При необходимости проводят дополнительное разбавление анализируемого раствора.

Как показали исследования, оптимальные условия микроволнового разложения пробы обеспечивают полное окисление органической матрицы и перевод ионов металлов в анализируемый раствор. Азотная кислота без добавления других реагентов (пероксида водорода, серной или соляной кислот) эффективно окисляет органическую матрицу. При этом, удаляя хлорид-ионы из раствора, предотвращает потери легколетучих соединений и устраняет негативное влияние хлорид-иона на аналитический сигнал определяемых элементов.

Подготовленные минерализаты образов тканей почек были использованы для атомно-абсорбционного анализа на содержание ионов тяжелых металлов.

Согласно литературным данным, в ряде случаев при атомно-абсорбционном анализе ряда ионов металлов необходимо добавление химических модификаторов, роль которых в деталях до конца не установлена.

Известно, что основное предназначение модификатора: улучшение воспроизводимости аналитического сигнала компонентов образца – сигнал становится менее зависимым от химического окружения аналита, что во многих случаях упрощает процесс градуировки и дальнейшего анализа пробы [9].

Как было установлено, особенно важным становится введение химического модификатора в случае атомно-абсорбционного определения Cd (II) и Pb (II). Без введения модификатора в подготовленный к анализу раствор определяемого вещества, построение калибровочного графика и дальнейший анализ становятся невозможными (*табл.* 2).

Таблица 2

Химические модификаторы в электротермическом атомно-абсорбционном анализе Cd (II) и Pb (II)

Определяемый компонент	Химический модификатор
Cd (II)	Комплекс Pd(II) с ксиленоловым оранжевым
Pb (II)	Нитрат Pd (II)

Для подавления эффекта ионизации элементов в атомной абсорбции в данном случае в качестве спектроскопического буфера подходят именно растворы солей палладия, поскольку потенциал ионизации палладия (около 7.1 эВ) меньше потенциала ионизации определяемых элементов (от 7.5 до 19.9 эВ). Палладий (II), совместно присутствующий с определяемым элементом с более низким значением потенциала ионизации, будет являться донором электронов (вследствие собственной ионизации), что приводит к подавлению ионизации определяемого элемента и, как следствие, к увеличению аналитического сигнала определяемого вещества.

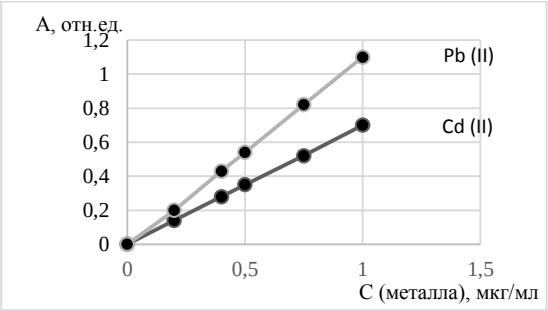

Рис. 1. Концентрационные зависимости ионов Pb (II) и Cd (II) в условиях атомно-абсорбционного анализа с электротермической атомизацией в присутствии модификатора – 1%-ного раствора солей палладия.

Таблица 3

Содержание ряда ионов тяжелых металлов в минерализатах тканей почек крыс в динамике при интоксикации ионами тяжелых металлов в составе медно-цинковой колчеданной руды Учалинского месторождения Республики Башкортостан

Группа животных	Содержание ионов металла в тканях почек, мг/л					
	Cu (II)	Zn (II)	Fe (III)	Co (II)	Cd (II)	Pb (II)
Контроль	3.69±0.61	17.26±2.85	56.39±5.54	0.05±0.001	0.12±0.08	0.17±0.02
1 месяц интоксикации	3.81±0.46	17.82±2.12	57.13±4.12	0.07±0.002	0.13±0.07	0.18±0.34
3 месяца интоксикации	4.34±0.72	18.91±2.82	61.15±6.61	0.09±0.011	0.44±0.02	0.75±0.23
1 месяц ремиссии	3.97±0.28	17.99±1.34	60.43±6,55	0.08±0.004	0.34±0.00	0.65±0.15
3-х месячная ремиссия	3.89±0.49	17.44±4.00	58.82±8.92	0.07±0.004	0.23±0.02	0.58±0.06

Эксперименты показали, что применение 2%-ых водных растворов солей палладия вызвало искажение калибровочных зависимостей Cd (II) и Pb (II). Поэтому в качестве оптимального варианта выбран 1%-ный раствор солей палладия в обоих случаях, в присутствие которого происходило увеличение аналитического сигнала ионов Cd (II), Pb (II) и выравнивание калибровочной прямой. Таким образом, применение ионизационного буфера (модификатора) позволило получить правильные и воспроизводимые результаты.

На *рис.* 1 в качестве примера приведены концентрационные зависимости ионов Cd (II) и Pb (II) в условиях атомно-абсорбционного анализа с электротермической атомизацией. Во всех остальных случаях градиуировочные прямые аналогичны.

В остальных случаях добавление химического модификатора не требовалось.

В *табл.* 3 приведены результаты количественного анализа образцов минерализатов тканей почек крыс на содержание ионов тяжелых металлов, полученных при интоксикации медно-колчеданной рудой с Учалинского месторождения РБ.

Как видно из приведенных результатов, при интоксикации животных смесью, содержащей взвесь медно-цинковой колчеданной руды, через 1–3 месяца затравки в тканях почек постепенно увеличилась концентрация каждого из ионов в среднем в 1.1–1.8 раз.

В то же время наблюдалось резкое увеличение содержания ионов Cd (II) в ~ 3.7 раз и Pb (II) в ~ 4.4 раза в образцах к 3 месяцу интоксикации. Следует отметить, что в период ремиссии наблюдалось небольшое уменьшение концентрации ионов Cd (II) и Pb (II) в по сравнению с другими ионами металлов. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с более высокими значениями молярных масс ионов Cd (II) и Pb (II), соответственно, более выраженной способностью накапливаться в тканях почек в виде нерастворимых в водной среде соединений (12).

После 1 месяца ремиссии концентрации ионов несколько уменьшились в среднем от 10 до 20%.

Через 3 месяца ремиссии содержание изученных ионов в минерализатах тканей почек уменьшилось, но не достигло контрольных значений, которые наблюдались у животных без введения затравки.

Выводы

Таким образом, методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией образцов можно с высокой точностью определить количественно содержание ионов тяжелых металлов в биологических материалах.

Добавление модификатора в случае аналитического определения Cd (II) и Pb (II) является необходимым этапом атомно-абсорбционного анализа, т.к. способствует увеличению аналитического сигнала исследуемых ионов и устранению помех.

Изучение биомедицинских образцов на содержание ионов тяжелых металлов в процессе интоксикации в минерализатах тканей почек белых крыс показало, что поступление в организм избытка соединений тяжелых металлов, содержащихся в медно – цинковой колчеданной руде, приводит к постепенному накоплению токсикантов. При этом уровень концентраций тяжелых металлов в изученных образцах в процессе ремиссии в течение 3 месяцев не восстанавливается до прежнего уровня и остается достаточно высоким длительное время.

Согласно литературным данным, кумуляция ионов тяжелых металлов в тканях почек представляет опасность, в т.ч. онкогенную [4–5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисов В. В. Экология города. М.: МарТ, 2008. 832 с.
2. Коробкин В. И. Экология. Ростов н/Д: Феникс, 2009. 602 с.
3. Егоров В. В. Бионеорганическая химия. М.: Лань. 2017. 412 с.
4. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия. М.: Медпресс–информ. 2009. 400 с.
5. Куценко С. А. Основы токсикологии. М.: Академа. 2011. 410 с.
6. Чиркин А. А., Данченко Е. О. Биохимия. М.: Академа. 2010. 515 с.
7. Лелевич В. В. Биологическая химия. Гродно. ГрГМУ. 2009. 275 с.
8. Беляцкий В. Н. Основы атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионой спектроскопии. Минск. изд-во БГМУ. 2015. 47 с.
9. Алемасова А. С., Рокун А. Н., Шевчук И. А. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. Донецк, изд-во ДГУ. 2003. 327 с.
10. Кутяков В. А. Комплексный подход к оценке воздействия соединений свинца и цинка при судебно-химических исследованиях. Красноярск: изд-во КГУ. 2016.
11. Онищенко Г. Г., Зайцева Н. В, Уланова Т. С. Контроль содержания химических соединений и элементов в биологических средах. Пермь: Книжный формат. 2011. 520 с.
12. Пупышев А. А. Пламенный и электротермический атомно-абсорбционный анализ с использованием спектрометра. Екатеринбург: изд-во ГОУ ВПО УГТУ – УПИ. 2008. 101 с.
13. Добрынина Н. А. Бионеорганическая химия. М.: МГУ. 2007. 37 с.
14. Ильясова Р. Р., Саптаров Ю.Н., Князева Л. М., Саптарова О.А., Когина Э. Н. Определение ионов тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии в плазме крови при интоксикации медно – цинковой колчеданной рудой // Вестник БашГУ. 2018. №2. С. 311–315.
15. Ермаченко Л. А. Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях. М.: Химия, 2007. 274 с.
16. Майстренко В. Н., Ильясова Р. Р., Кудашева Ф. Х., Садретдинов М. А., Майстренко Т. В. Количественный анализ α-аминокислот в моче нейрохирургических больных методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Армсорб» // Вестник Башкирского университета, 2008. Т. 13. №2. С. 265–269.
17. Майстренко В. Н., Ильясова Р. Р., Кудашева Ф. Х., Садретдинов М. А., Майстренко Т. В. Определение α-аминокислот в крови нейрохирургических больных методом тонкослойной хроматографии // Башкирский химический журнал. 2007. Т. 14. №5. С. 140–144.

Поступила в редакцию 21.01.2019 г.

THE CONTENT OF HEAVY METALS IN THE KIDNEYS OF RATS IN THE PROCESS OF CHRONIC INTOXICATION WITH COPPER-ZINC PYRITE ORE

© R. R. Ilyasova[1]*, L. M. Saptarova[2], E. N. Kogina[2], Yu. N. Saptarov[2], A. D. Nasibullin[2], G. I. Karimova[2], A. Yu. Yurasov[2]

[1]*Bashkir State University*
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

[2]*Bashkir State Medical University*
96/98 Pushkin Street, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

Phone: +7 (927) 315 55 71.
**Email: ilyasova_r@mail.ru*

The quantitative content of heavy metals in the kidneys in the process of three-month intoxication of animals with copper-zinc pyrite ore and after remission was studied. It is shown that an excess of these elements causes damage to the kidneys. Salts of metals, entering the body, break down into ions, form difficultly soluble hydroxides, phosphates, and other stable complexes that are poorly absorbed in the gastrointestinal tract. Free ions are quickly removed from the blood; they are also quickly released or accumulated in the tissues of organs, deposited in the form of complex compounds with proteins, amino acids. However, their distribution is uneven, in some cases selective, and the ways of transformation of the initial metal compounds may be different. The main way to detoxify the body from heavy metals is to excrete them through the kidneys. The kidneys filter toxins, heavy metals, and substances resulting from the process of protein breakdown out of the blood; then all these substances are removed from the body with urine.

Keywords: atomic absorption spectroscopy, heavy metals, kidney tissues.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Denisov V. V. Ekologiya goroda. Moscow: MarT, 2008.
2. Korobkin V. I. Ekologiya. Rostov n/D: Feniks, 2009.
3. Egorov V. V. Bioneorganicheskaya khimiya. Moscow: Lan'. 2017.
4. Vergeichik T. Kh. Toksikologicheskaya khimiya. Moscow: Medpress–inform. 2009.
5. Kutsenko S. A. Osnovy toksikologii. Moscow: Akadema. 2011.
6. Chirkin A. A., Danchenko E. O. Biokhimiya. Moscow: Akadema. 2010.
7. Lelevich V. V. Biologicheskaya khimiya. Grodno. GrGMU. 2009.
8. Belyatskii V. N. Osnovy atomno-absorbtsionnoi i atomno-emissionoi spektroskopii. Minsk. izd-vo BGMU. 2015.
9. Alemasova A. S., Rokun A. N., Shevchuk I. A. Analiticheskaya atomno-absorbtsionnaya spektroskopiya. Donetsk, izd-vo DGU. 2003.
10. Kutyakov V. A. Kompleksnyi podkhod k otsenke vozdeistviya soedinenii svintsa i tsinka pri sudebno-khimicheskikh issledovaniyakh. Krasnoyarsk: izd-vo KGU. 2016.
11. Onishchenko G. G., Zaitseva N. V, Ulanova T. S. Kontrol' soderzhaniya khimicheskikh soedinenii i elementov v biologicheskikh sredakh. Perm': Knizhnyi format. 2011.
12. Pupyshev A. A. Plamennyi i elektrotermicheskii atomno-absorbtsionnyi analiz s ispol'zovaniem spektrometra. Ekaterinburg: izd-vo GOU VPO UGTU – UPI. 2008.
13. Dobrynina N. A. Bioneorganicheskaya khimiya. Moscow: MGU. 2007.
14. Il'yasova R. R., Saptarov Yu.N., Knyazeva L. M., Saptarova O.A., Kogina E. N. Vestnik BashGU. 2018. No. 2. Pp. 311–315.
15. Ermachenko L. A. Atomno-absorbtsionnyi analiz v sanitarno-gigienicheskikh issledovaniyakh. Moscow: Khimiya, 2007.
16. Maistrenko V. N., Il'yasova R. R., Kudasheva F. Kh., Sadretdinov M. A., Maistrenko T. V. Vestnik Bashkirskogo universiteta, 2008. Vol. 13. No. 2. Pp. 265–269.
17. Maistrenko V. N., Il'yasova R. R., Kudasheva F. Kh., Sadretdinov M. A., Maistrenko T. V. Bashkirskii khimicheskii zhurnal. 2007. Vol. 14. No. 5. Pp. 140–144.

Received 21.01.2019.