

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ ДОЛИ КАЛЬЦИЯ
В ВОЛОСАХ****Е.В. Моисеева, И.А. Потапова***ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт
гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора,
ул. Семашко, д. 20, 603950, Нижний Новгород, Россия

РЕЗЮМЕ. Кальций – один из важнейших макроэлементов в организме человека. Изменение его уровня может быть результатом различных нарушений обмена веществ и некоторых заболеваний. Контроль содержания кальция в организме человека является актуальной задачей, для решения которой наиболее оптимален анализ волос, поскольку волосы указывают на клеточный метаболизм и сводят к минимуму риск инфицирования при заборе проб. Кроме того, волосы имеют фиксированную динамику роста (0,3–0,5 мм/сутки), а значит, содержат «запись» не только о настоящем времени, но и об отдаленном периоде. Это позволяет контролировать уровень элементов в организме, в частности кальция, на протяжении всего лечения. В настоящее время существуют аналитические методы определения кальция в волосах, однако утвержденными являются только метод атомной эмиссионной спектрометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Цель исследования – разработка методики измерения массовой доли кальция в волосах с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). В результате исследования выбраны оптимальные условия для обнаружения кальция в волосах с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии. Изучены различные температурно-временные условия минерализации образца: 1 час при 160 °С, влияние концентрации азотной кислоты на аналитический сигнал, воздействие добавления соли лантана к образцу на сигнал поглощения. Показано, что десятимолярный раствор оказался менее агрессивным для устройства. Добавление соли лантана в образцы изменило повторяемость, которая составила 4,1–5,2% вместо 15,5–26,0% соответственно. По результатам исследования разработана методика определения массовой доли кальция в волосах методом ААС в диапазоне концентраций 200–2000 мкг/г с погрешностью 21%. Методика предназначена для выявления дефицита кальция у людей, принимающих препараты, работающих во вредных условиях труда, и у населения, проживающего в условиях загрязнения окружающей среды различными токсичными металлами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кальций, волосы, анализ, атомно-абсорбционная спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших макроэлементов организма человека является кальций. Его общее содержание составляет около 1,4% от массы тела (1000 г на 70 кг массы тела), при этом на костную ткань приходится 99%, оставшийся 1% содержится в других тканях (1 г в плазме крови, 6–8 г в мягких тканях). Многими исследователями отмечается важность контроля за содержанием кальция в организме: изменение уровня данного макроэлемента может быть связано не только с его избытком/недостатком, но и с нарушением метаболических процессов (Бурцева, Баранова, 2006; Евстафьева и др., 2012; Лохматова, 2018).

В связи с этим в последние годы много работ посвящено изучению физиологического баланса кальция в организме человека (Скальная и др., 2003; Бурцева, Баранова, 2006; Евстафьева и др., 2012; Загорский, Мельнов, 2012; Лохматова, 2018). Однако нередко возникает вопрос выбора оптимального биоматериала (Гресь и др., 2013; Харламов и др., 2014). Одним из наиболее перспективных являются волосы, которые, как и любая другая ткань, отражают метаболизм клеток, но при этом отбор пробы у пациента проводится без риска получить какую-либо инфекцию, что, в свою очередь, позволяет наблюдать больно-го без его травмирования и контролировать со-

* Адрес для переписки:
Потапова Ирина Александровна
E-mail: PIA@nniigp.ru

держание кальция на протяжении всего лечения. Кроме того, волосы характеризуются фиксированной динамикой роста (0,3–0,5 мм/день), а значит, содержат «запись» не только о настоящем времени, но и об отдаленном периоде.

Статистика показывает, что анализ волос помогает диагностировать хронические заболевания до четко выраженной клинической картины, а поэтому представляется актуальной разработка новых методов определения их состава (Евстафьева и др., 2012; Загорский, Мельнов, 2012; Лохматова, 2018).

Ключевую роль в элементном анализе биологических объектов отводят спектрально-аналитическим методам, среди которых самыми распространенными являются: атомно-абсорбционный (ААС), атомно-эмиссионный (АЭС) и масс-спектральный (МС) (Агаджанян и др., 2011; Гресь и др., 2013; Забокрицкий, Сабуров, 2014; МУК 4.1.1482-03, 4.1.483-03). Они обладают значительной селективностью определений и поэтому редко требует отделения сопутствующих элементов: их присутствие обычно не вызывает заметной систематической погрешности. Однако каждый из этих методов имеет ряд преимуществ и недостатков (Забокрицкий, Сабуров, 2014).

Наиболее чувствительными методами являются АЭС и МС, которые позволяют определять содержание кальция в диапазоне концентраций 0,01–10 000 мкг/г (МУК 4.1.1482-03, 4.1.483-03). Физиологическое содержание кальция в волосах в среднем варьируется в диапазоне от 200 до 2000 мкг/г (Скальная и др., 2003; Скальный, 2003; Залата, 2010; Агаджанян и др., 2011). Для выявления такого уровня концентраций кальция нет необходимости в использовании специальных возможностей АЭС и МС, требующих очень высоких материальных вложений, что не всегда оправдано в условиях проведения потоковых анализов на ограниченное число элементов в рамках диагностических лабораторий. В этом случае для исследования содержания кальция в волосах более подходящим является метод ААС, который более доступен, прост в реализации и относительно недорог.

В аналитической практике известны также работы, посвященные определению микро- и макроэлементов методом рентгенофлуоресцентного анализа (РФА), неоспоримым преимуществом которого является отсутствие необходимости проведения предварительной минерализации пробы, а значит и существенное сокращение

временных затрат (Максимова и др., 2008; Загорский, Мельнов, 2012; Лохматова, 2018). Однако этот метод в основном применяется для анализа макроэлементов и имеет довольно большую погрешность определения по сравнению с методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

Таким образом, вопрос определения содержания кальция в волосах является весьма значимым. В настоящее время существуют аналитические методы, позволяющие устанавливать уровень концентраций кальция в волосах, но утвержденными являются только методы атомной эмиссионной спектрометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МУК 4.1.1482-03, 4.1.483-03), тогда как наиболее оптимальным для поставленной задачи является метод ААС.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка методики измерения массовой доли кальция в волосах с помощью метода атомно-абсорбционной спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на атомно-абсорбционном спектрометре «Квант-2А» с предварительной автоклавной минерализацией пробы и атомизацией полученного раствора в пламени ацетилен-воздух. Обработку результатов измерений осуществляли с помощью программного обеспечения «Квант-2А», позволяющего автоматически производить расчет концентрации кальция в растворе (мг/дм³) на основании установленной градуировочной характеристики.

Пробы волос отбирали с затылочной части головы от корней с 4–5 участков длиной не более 3 см. С целью герметизации пробы помещали в маркированные бюксы (ГОСТ 25336-82). Перед анализом волосы измельчали ножницами до 3–5 мм, обезжиривали смесью диэтилового эфира и этилового спирта (1:1), затем высушивали до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при температуре 60 °С в течение 1 ч. Пробы взвешивали на аналитических весах специального класса точности по $0,1 \pm 0,0002$ г, помещали в тефлоновые стаканы автоклавного модуля, добавляли по 3 мл азотной кислоты (плотность 1,143 г/см³), 1 мл перекиси водорода медицинской и проводили минерализацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики по определению массовой доли кальция в волосах осуществлялась по

следующим этапам: выбор оптимальных условий температурно-временного режима минерализации пробы, изучение стабильности градуировочных растворов от величины рН раствора, влияние добавки соли лантана на величину абсорбции и повторяемость результатов анализа. Проведение эксперимента по выделенным направлениям не подразумевало получения информации интегрального характера, отражающего состояние биохимических процессов в период формирования (роста) определенного участка волоса. В связи с этим для постановки эксперимента использовали измельченную объединенную пробу волос по всей длине. Зона среза также не имела значения.

Исследование процесса минерализации заключалось в выборе оптимального температурно-временного режима. Для этого пробу волос

минерализовали при температуре от 160 °С до 180 °С, варьируя время выдержки от 0 до 2 ч. Описание температурно-временных режимов представлено в табл. 1.

Исследование проводили в семи повторностях. Полученные для каждого режима данные были усреднены; для всех средних рассчитан коэффициент вариации, который составил 4,17%, что говорит об однородности результатов. Следует отметить, что, несмотря на сопоставимость концентраций, полученных при использовании различных условий минерализации, максимальная близость результата к среднему арифметическому значению наблюдается для режима № 4 – 0,1%, в связи с чем он был выбран для дальнейших исследований (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика исследуемых режимов автоклавной минерализации

Вариант опыта	Первый этап минерализации		Второй этап минерализации	
	Температура, °С	Время выдержки, ч	Температура, °С	Время выдержки, ч
Режим № 1	160	2	180	2
Режим № 2		2		1
Режим № 3		1		1
Режим № 4		1		0

Таблица 2. Содержание кальция в одной и той же пробе волос, полученное при разных режимах автоклавной минерализации

Показатель	Режим № 1	Режим № 2	Режим № 3	Режим № 4
Содержание Са, мкг/г	374	380	411	389
Отклонение от среднего арифметического, %	3,7	2,2	5,8	0,1

После минерализации пробу количественно переносили в мерную пробирку с добавлением соли лантана и проводили атомизацию полученного раствора на ААС «Квант-2А».

В процессе разработки методики дополнительно изучали стабильность градуировочных растворов в зависимости от кислотности среды. Для этого готовили три серии стандартных образцов кальция, утвержденного типа ГСО 8065-94, на растворах азотной кислоты разной концентрации с содержанием кальция 1, 2, 4, 8, 10 мг/л. Серию градуировочных растворов готовили на базе децимолярного, одномолярного и двухмолярного фоновых растворов. Каждый раствор анализировали не менее пяти раз. На основе полученных результатов строили три градуировочные зависимости, стабильность которых оценивали через одну неделю, две недели и месяц путем расчета степе-

ни расхождения аттестованного значения массовой концентрации раствора стандартного образца C_0 и концентрации, определенной с помощью градуировочной характеристики $C_{гр}$:

$$\left| \frac{C_0 - C_{гр}}{C_0} \right| \cdot 100\% .$$

В результате было установлено, что абсорбция и стабильность градуировки не зависят от величины рН раствора. Поэтому для рабочих растворов предпочтительнее применять децимолярную азотную кислоту, как менее агрессивную для прибора. При этом основной стандартный раствор для градуировки все же следует готовить на основе 2 М азотной кислоты, поскольку это позволит продлить срок его хранения до 6 мес. при комнатной температуре.

Известно, что кальций сложен в определении из-за нестабильности сигнала абсорбции, поэтому дополнительно проводились исследования по установлению влияния спектроскопического буферного раствора на повторяемость (близость) результатов анализа.

В качестве спектроскопического буферного раствора применяли раствор соли лантана с концентрацией 50 мг/л, который добавляли в градуировочные растворы и в пробы (1:9). Анализ каждой пробы волос проводили с добавкой и без добавки соли лантана в двух повторностях. Полученные результаты оценивали по величине относительного размаха ρ_x между двумя параллельными определениями – повторяемости:

$$\rho_x = \frac{(x_{\max} - x_{\min}) \cdot 2}{x_{\max} + x_{\min}} \cdot 100\% ,$$

где x_{\min} и x_{\max} – минимальное и максимальное значения концентрации кальция соответственно.

Для оценки результатов экспериментов было проанализировано 17 проб волос. Полученные данные представлены в табл. 3, из которой видно, насколько снижается размах параллельных определений с введением в пробу буферного раствора. Так, без добавки соли лантана повторяемость результатов измерения содержания кальция варьировалась в диапазоне 15,5–26,0%, с добавкой – в диапазоне 4,1–5,2%.

Контроль качества измерений при разработке методики проводили путем оценки прецизионности (воспроизводимости) и правильности результатов анализа в соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009 «Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики (методы) измерений».

Таблица 3. Влияние добавки $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на результаты определения кальция в волосах

№ пробы	Содержание Са без добавки соли лантана, мкг/г		Повторяемость, %	Содержание Са с добавкой соли лантана, мкг/г		Повторяемость, %
1	506	433	15,5	411	390	5,2
2	655	794	19,2	689	723	4,8
3	328	418	24,1	352	368	4,4
4	970	829	15,7	918	875	4,8
5	1013	1194	16,4	1053	1104	4,7
6	573	452	23,6	569	541	5,0
7	895	739	19,1	884	839	5,2
8	424	549	25,7	397	381	4,1
9	396	465	16,0	458	439	4,2
10	538	694	25,3	628	658	4,7
11	349	274	24,1	291	304	4,4
12	980	837	15,7	921	875	5,1
13	1153	943	20,0	1007	1054	4,6
14	637	523	19,7	571	601	5,1
15	486	388	22,4	445	424	4,8
16	1026	1207	16,2	1175	1116	5,2
17	485	579	17,7	498	524	5,1

Для контроля внутрилабораторной прецизионности использовали рабочие пробы. Две параллельные пробы анализировали при максимально варьированных условиях: в разное время, разными исполнителями, разными партиями реактивов и наборов мерной посуды.

Контроль точности результатов измерений проводили методом добавок в рабочие пробы волос. Предварительно проанализированную пробу волос делили на две части, первую из которых анализировали в точном соответствии с прописью методики, а во вторую вносили добавку стандартного раствора кальция, приготовленного из ГСО 8065-94. Содержание добавки составляло 50–150% от содержания кальция в пробе.

В процессе метрологической оценки методики проведено 75 элемент-определений. Метрологическую аттестацию осуществляли на базе ФБУ «Нижегородский ЦСМ». На представленную методику получено свидетельство об аттестации №763/01.00269/2012 от 13.12.2012. Метрологические характеристики приведены в табл. 4.

Метрологические характеристики методики

Таблица 4. Метрологические характеристики методики

Диапазон анализируемых массовых долей кальция, мкг/г	Показатель повторяемости, %	Показатель воспроизводимости, %	Показатель правильности, %	Показатель точности ($p = 0,95$), %
200–2000	4,2	6,0	17	21

Как видно из табл. 4, разработанная методика позволяет определять массовую долю кальция в волосах методом ААС в диапазоне концентраций 200–2000 мкг/г с погрешностью 21%, что ниже по сравнению с погрешностью, утвержденной на сегодняшний день методики МУК 4.1.1482-03, 4.1.1483-03 (25% для указанного диапазона концентраций).

Предложенная методика по определению массовой доли кальция в волосах была апробирована на базе поликлиники ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии» Роспотребнадзора. Среди обследованных выявлено только два случая аномально низкого содержания кальция в волосах, которые коррелировали с клиническими показателями пациентов. В остальных случаях содержание кальция в волосах находилось в диапазоне значений 200–2000 мкг/г.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований разработана методика определения массовой до-

ли кальция в волосах методом ААС в диапазоне концентраций 200–2000 мкг/г с погрешностью 21%.

Методика предназначена для выявления дефицита кальция у людей, принимающих препараты, а также работающих во вредных условиях труда и проживающих в зонах, подверженных загрязнению окружающей среды свинцом, магнием, натрием, цинком, кобальтом, фосфором, стронцием, барием и др.

Предложенная методика обладает наиболее низкими значениями погрешности определения, не требует длительной пробоподготовки, относительно недорогая, поэтому она может быть рекомендована для лечебных и научных учреждений, работающих в области медицины труда, промышленной экологии и окружающей среды с целью организации социально-гигиенического мониторинга в различных профессиональных группах и среди населения для включения в традиционный перечень диагностических и корректирующих процедур при проведении медицинских осмотров.

ЛИТЕРАТУРА

Агаджанян Н.А., Лысенков С.П., Егорова Г.А., Ожева Р.Ш. Сравнительный анализ содержания макро- и микроэлементов в волосах детей и подростков, проживающих в южных и северных регионах России. Новые технологии. 2011; 3:175–179.

Бурцева Т.И., Баранова О.В. К вопросу о влиянии различных факторов на обмен кальция в организме человека. Вестник ОГУ. 2006; 12:50–51.

Гресь Н.А., Юрага Т.М., Романюк А.Г., Хамад Саид, Сокол В.П. Информативность спектроскопии волос при изучении микроэлементных нарушений в организме человека. Медицинские новости. 2013; 4:77–80.

Евстафьева Е.В., Залата О.А., Слюсаренко А.Е. Особенности содержания кальция, железа, марганца, молибдена, никеля, стронция и свинца в организме детей с разным уровнем психического развития. Здоровье ребенка. 2012; 6(41):45–49.

Забокрицкий М.П., Сабуров В.В. Критерии выбора спектрального метода применительно к анализу микроэлементов в биологических объектах. *Микроэлементы в медицине*. 2014; 15(4):29–38.

Загорский С.Э., Мельнов С.Б. Особенности элементного состава волос у детей и подростков с рефлюкс-эзофагитом. *Проблемы здоровья и экологии*. 2012; 2(32):123–128.

Залата О.А., Евстафьева Е.В., Слюсаренко А.Е., Слюсаренко А.В., Козлов К.П. Содержание химических элементов (кальций, стронций, свинец) в волосах детей 12–13 лет из разных регионов Украины. *Здоровье ребенка*. 2010; 4(25):58–62.

Лохматова И.А. Особенности элементного профиля у детей школьного возраста с аскаридозом. *Медицинский альманах*. 2018; 3(54):97–102.]

Максимова Т.В., Плетенева Т.В., Попов П.И. Экспресс-определение содержания цинка и железа в волосах методом рентгенофлуоресцентного анализа. *Вестник РУДН. Сер. Медицина*. 2008; 3:5–9.

МУК 4.1.1482-03, 4.1.1483-03 Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2003; 56 с.

Скальная М.Г., Демидов В.А., Скальный А.В. О пределах физиологического (нормального) содержания Са, Mg, P, Fe, Zn и Cu в волосах человека. *Микроэлементы в медицине*. 2003; 4(2):5–10.

Скальный А.В. Референтные значения концентрации химических элементов в волосах, полученные методом ИСП-АЭС (АНО Центр биотической медицины). *Микроэлементы в медицине*. 2003; 4(1):55–56

Харламов А.В., Фролов А.Н., Завьялов О.А., Мирошников А.М. Информативность биосубстратов при оценке элементного статуса сельскохозяйственных животных (обзор). *Вестник мясного скотоводства*. 2014; 4(87):53–58.

METHOD FOR DETERMINING THE MASS FRACTION OF CALCIUM IN HAIR

E.V. Moiseeva, I.A. Potapova

FBSI «Nizhny Novgorod Research Institute of hygiene and occupational pathology» Rosпотrebnadzor,
Semashko str., 20, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

ABSTRACT. Calcium is one of the most important macronutrients in the human organism. A change in its level can be the result of different metabolic disorders and some diseases, i.e. control of its content in the organism is a topical task. Hair analysis is the most optimal to decide this problem, because hair indicates cellular metabolism and minimizes the risk of infection during sampling. Hair has a fixed growth dynamics (0,3–0,5 mm/day), i.e. it contains a "record" not only about the present time, but also about the distant period. This allows controlling the level of elements in the organism, in particular calcium, throughout the treatment period. Currently, there are analytical methods for the determination of calcium in hair, but only atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry are approved. The purpose of this study is developing a method for measurement the mass fraction of calcium in hair using the method of atomic absorption spectroscopy (AAS). The selection of optimal conditions for the detection of calcium in hair by atomic absorption spectroscopy was made. Various temperature-time conditions of the sample's mineralization were studied. Optimal conditions for mineralization was 1 hour at 160 °C. The influence of the nitric acid's concentrations on the analytical signal was investigated. The decimolar solution was found to be less aggressive for the device. In addition, the effect of adding a lanthanum salt to the sample on the absorption signal was studied. The addition of lanthanum salt to the samples changed the repeatability, which was 4,1–5,2% instead of 15,5%–26,0%, respectively. The determined range of calcium concentrations in hair was 200–2000 µg / g with an error of 21%. The method is designed to detect calcium deficiency in different population groups.

KEYWORDS: calcium, hair, analysis, atomic absorption spectroscopy.

REFERENCES

Agadzhanian N.A., Lysenkov S.P., Egorova G.A., Ozheva R.SH. The comparative analysis of the maintenance of macro- and microcells in hair of children and teenagers living in the southern and northern regions of Russia. *Novye tekhnologii*. 2011; 3:175–179 (in Russ.).

Burceva T.I., Baranova O.V. To the question of the influence of various factors on calcium metabolism in the human body. *Vestnik OGU*. 2006; 12:50–51 (in Russ.).

Gres' N.A., YUraga T.M., Romanyuk A.G., Hamad Said, Sokol V.P. The information content of spectroscopy of hair by investigation of disorder of minor elements in human organism. *Medicinskie novosti*. 2013; 4:77–80 (in Russ.).

Evstaf'eva E.V., Zalata O.A., Slyusarenko A.E. Features of content of calcium, iron, manganese, molybdenum, nickel, strontium and lead in the organisms of children with different level of mental development. *Zdorov'e rebenka*. 2012; 6(41):45–49 (in Russ.).

Zabokrickij M.P., Saburov V.V. Criteria for choosing the spectral method in relation to the analysis of trace elements in biological objects. *Mikroelementy v meditsine*. 2014; 15(4):29–38 (in Russ.).

Zagorskij S.E., Mel'nov S.B. The features of the elemental hair structure in children and adolescents with reflux-esophagitis. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2012; 2(32):123–128. (in Russ.).

Zalata O.A., Evstaf'eva E.V., Slyusarenko A.E., Slyusarenko A.V., Kozlov K.P. Chemical elements' content (calcium, strontium, lead) in the hair of 12-13 year old children from different regions of Ukraine. *Zdorov'e rebenka*. 2010; 4(25):58–62 (in Russ.).

Lohmatova I.A. Features of the elemental profile in school-age children with ascariasis. *Medicinskij al'manah*. 2018; 3(54):97–102 (in Russ.).

Maksimova T.V., Pleteneva T.V., Popov P.I. Rapid determination of the content of zinc and iron in hair using X-ray fluorescence analysis. *Vestnik RUDN serii Meditsina*. 2008; 3:5–9 (in Russ.).

MUK 4.1.1482-03, 4.1.1483-03 Determination of chemical elements in biological media and preparations by atomic-emission spectrometry with inductively coupled plasma and mass spectrometry with inductively coupled plasma: Metodicheskie ukazaniya. M.: Federal'nyj centr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii. 2003; 56 p. (in Russ.).

Skal'naya M.G., Demidov V.A., Skal'nyj A.V. About the limits of physiological (normal) content of Ca, Mg, P, Fe, Zn and Cu in human hair]. *Mikroelementy v medicine*. 2003; 4(2):5–10 (in Russ.).

Skal'nyj A.V. Reference values of chemical elements concentration in hair, obtained by means of ICP-AES method in ANO Centre for Biotic Medicine. *Mikroelementy v medicine*. 2003; 4(1):55–56 (in Russ.).

Harlamov A.V., Frolov A.N., Zav'yalov O.A., Miroshnikov A.M. Informative value of biosubstrates in assessing the elemental status of farm animals (review). *Vestnik myasnogo skotovodstva*. 2014; 4(87):53–58. (in Russ.).