

УДК 543.05; 543.51

СРАВНЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА КРОВИ В ИНТАКТНОМ И СУХОМ ВИДЕ. ПОРИСТЫЕ МЕМБРАНЫ КАК НОВЫЙ ФОРМАТ ОТБОРА ПРОБ

С.В. Дрогобужская^{1*}, С.Э. Кондаков², Н.К. Белишева³, А.И. Новиков¹,
Е.С. Ихалайнен⁴

(¹Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья имени И.В. Тананаева (обособленное подразделение ФИЦ КНЦ РАН), г. Апатиты; ²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической кинетики; ³Научно-исследовательский центр медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике ФИЦ КНЦ РАН, г. Апатиты; ⁴Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова; *e-mail: s.drogobuzhskaia@ksc.ru)

Показана возможность применения сухих образцов крови на пористых стекловолоконных мембранных носителях для количественного элементного анализа крови с применением метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Независимо от состояния проб (влажные и сухие), а также от способа пробоподготовки (разные объемы элюирующего раствора) содержание соответствующих элементов в сухих образцах полностью соответствует содержанию элементов в цельной крови и референсным литературным значениям.

Ключевые слова: технология DBS, карточки DBS нового формата, стекловолоконный носитель, кровь цельная, стрипованные сухие образцы цельной крови, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой.

Первоначально технология анализа на основе высушенных пятен крови (*Dried Blood Spot, DBS technology*), была разработана для скрининга патологий новорожденных [1]. Популярность DBS-технологий обусловлена рядом их преимуществ: снижение количества крови, которое требуется для проведения анализа (обычно 10–25 мкл) или микросэмплинг, снижение затрат на хранение и транспортировку биологических образцов без холодной цепи, снижение риска биологической опасности. Однако применение в качестве сорбирующего материала целлюлозной подложки (матрицы) для технологии количественного DBS-анализа связано с некоторыми ограничениями, в частности, с наличием неспецифической сорбции для различных субстратов и эффектом гематокрита, который варьирует от образца к образцу и [1, 2]. Преимущества и недостатки применения DBS-технологии хорошо описаны в обзоре [3].

В последние годы были предложены новые подходы для преодоления этих ограничений: новый формат предварительной обработки образца [4], новый пробоотборник [5], а также новый подход и материал для отбора проб [6]. Новый подход, основанный на использовании тонкой полоски стекловолоконного мембранного мате-

риала для приготовления цельной крови в виде сухих проб, в настоящее время нашел практическое применение при транспортировке сухих биообразцов для эпизотоологического мониторинга в ветеринарии. Он используется для количественного анализа при выявлении ДНК, антител и гормонов [7].

Цель работы состояла в расширении спектра анализов, где возможно применение технологии DBS на примере изучения соответствия между содержанием микроэлементов в интактной крови и на стрипованном пористом стекловолоконном мембранном носителе с применением элементного анализа методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП МС).

Материалы и методы

В работе использовали образцы венозной цельной крови одного донора. Носитель DBS для отбора проб представлял собой узкую полосу стекловолоконной мембраны шириной 0,5 см и длиной 4,5 см с черными метками через каждые 0,5 см, фиксированную на специальной карточке для хранения и транспортировки биологических жидкостей в сухом виде (производство ООО «Иммуновед»). Сухие стрипованные образцы получали нанесением цельной крови на

полоску путем погружения ее конца в жидкий образец и дальнейшего капиллярного поднятия.

Часть образцов использовали в день отбора, другие высушивали и хранили в плотно закрытых полипропиленовых пробирках. От мембран с образцами, согласно инструкции и нанесенной маркировке, отрезали ножницами полоски одинаковой длины. Эти полоски помещали в полипропиленовые пробирки, добавляли необходимый объем концентрированной азотной кислоты и проводили растворение в закрытых пробирках. Для изучения влияния пробоподготовки одну полоску обрабатывали 1 мл концентрированной азотной кислоты, другие – 2 или 3 мл. Одна часть образцов была обработана кислотой в день пробоотбора, другая – после трех дней хранения, остальные – через десять дней хранения в сухом виде.

Для сравнения 1 мл цельной крови помещали в полипропиленовую пробирку, добавляли 5 мл азотной кислоты, а затем растворяли без нагревания и использования микроволновых систем, в отличие от методики [8]. Для проведения измерений образцы разбавляли в 10, 100 и 500 раз 2%-м раствором азотной кислоты.

Для очистки кислоты использовали установку изотермической перегонки «Berghof» («Berghof», Германия). Воду очищали с помощью установки «Millipore Element» («Millipore», США).

После проведения подготовки пробы на приборе ELAN 9000 DRC-e («Perkin Elmer», США) осуществляли элементный анализ образцов крови методом масс-спектрометрии с индук-

тивно связанной плазмой. Для градуировки прибора использовали многоэлементные стандартные растворы IV-STOK-21, IV-STOK-26, IV-STOK-28, IV-STOK-29 («Inorganic Ventures», США) с массовой концентрацией определяемых элементов 10 мг/л.

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа цельной крови методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой приведены в табл. 1. Первые данные, полученные в ходе анализа образцов на носителе, представлены в табл. 2.

Для разложения образцов крови использовали азотную кислоту в объеме от 1 до 3 мл. Образцы 1, 2 были обработаны кислотой в день пробоотбора, образец 3 – через три дня, а остальные образцы (4, 5) – через 10 дней хранения в сухом виде. Средняя масса «сухой» крови на носителе составляла $23,1 \pm 0,4$ мг. Для расчета концентрации использовали литературные сведения о плотности крови ($1,060 \text{ г/см}^3$).

Анализ результатов, представленных в табл. 2, показывает, что при использовании 1 мл кислоты концентрация ряда элементов оказывается ниже, чем при использовании больших объемов, поэтому для пробоподготовки рекомендуется использовать не менее 2 мл кислоты.

Одновременно с исследуемыми образцами крови оценивали и учитывали число элементов в полоске стекловолоконного мембранного материала (холостой опыт). Установлено, что «холостая» проба содержит в высокой концентрации

Т а б л и ц а 1

Результаты анализа цельной крови методом ИСП МС

Элемент (массовая концентрация, мг/л)								
Li (0,00012)	Be (0,0013)	B (0,474)	Na (1267)	Mg (31,6)	Al (0,058)	Si (0,515)	P (215,6)	K (1138)
Ca (37,6)	Ti (0,0113)	V (0,0023)	Cr (0,013)	Mn (0,020)	Fe (346,6)	Co (0,0073)	Ni (0,0104)	Cu (0,99)
Zn (4,78)	Ga (0,00078)	As (0,0108)	Se (0,112)	Sr (0,0112)	Mo (0,0018)	Ag (0,0040)	Cd (0,0004)	Sb (0,0185)
Sn (0,0048)	Cs (0,0022)	Ba (0,267)	W (0,00051)	Tl (0,0015)	Pb (0,0113)	Bi (0,0014)	–	–

Т а б л и ц а 2

Результаты анализа влажных и сухих образцов крови методом ИСП МС

Образец	Влажные пробы на полоске			Сухие образцы	
	1	2	3	4	5
Элемент	объем кислоты, мл				
	1	2	3	3	2
	концентрация, мг/л				
Be	0,00134	0,00141	0,00124	0,00132	0,00135
Na	969	1222	1175	1242	1082
Mg	29,7	28,6	31,1	33,2	31,1
Si	0,472	0,528	0,494	0,524	0,517
P	200,4	171,7	188,4	198,1	184,5
K	1036	1304	1217	1208	1252
Ca	37,9	29,3	37,0	38,4	36,6
V	0,0021	0,0023	0,0026	0,0020	0,0021
Mn	0,0167	0,0217	0,0215	0,0206	0,0200
Fe	283,7	331,7	311,3	284,4	311,2
Co	0,0063	0,0093	0,0103	0,0088	0,0063
Ni	0,0075	0,0102	0,0144	0,0152	0,0115
Cu	0,75	1,12	0,93	1,05	0,85
Zn	3,57	4,63	4,18	4,05	4,02
As	0,0096	0,0128	0,0110	0,0128	0,0099
Se	0,0812	0,0884	0,1045	0,1109	0,0990
Mo	0,0017	0,0022	0,0031	0,0025	0,0016
Ag	0,0019	0,0036	0,0050	0,0044	0,0037
Cd	0,0003	0,0007	0,0006	0,0007	0,0005
Sb	0,0167	0,0196	0,0199	0,0183	0,0167
Sn	0,0032	0,0047	0,0043	0,0047	0,0046
Cs	0,0019	0,0042	0,0027	0,0038	0,0021
Ba	0,218	0,279	0,287	0,297	0,232
W	0,00039	0,00079	0,00052	0,00051	0,00047
Tl	0,0008	0,0018	0,0018	0,0012	0,0013
Pb	0,0108	0,0118	0,0112	0,0128	0,0120
Bi	0,0005	0,0019	0,0018	0,0028	0,0019

кальций, магний, калий, натрий и фосфор, что снижает предел обнаружения этих элементов, но позволяет провести их определение. Концентрация алюминия и бора в «холостой» пробе не позволяет их определять при использовании отбора пробы на полоске. Поэтому для использования данного формата отбора проб полоски рекомендуется предварительно модифицировать – обрабатывать реагентами для элементной очистки и упаковывать их герметично (например, в полиэтиленовые пакеты).

Для статистической обработки результатов применяли непараметрические методы сравнения двух независимых групп (*U*-критерий Манна–Уитни, критерий Колмогорова–Смирнова, а также *t*-критерий для независимых выборок). При использовании статистических методов не выявлено значимых различий в содержании элементов между образцами крови, подготовленными для элементного анализа непосредственно после погружения полосок в интактную кровь и после высушивания образцов крови на полосках. Поэтому для сравнения элементного содержания в интактной и нанесенной на полоски крови все данные по элементному содержанию в образцах крови на полосках (с влажными и высушенными образцами) были объединены.

В табл. 3 представлены результаты сравнения статистических характеристик содержания элементов в пяти образцах крови (интактной и на полосках). Соотношение между средними значениями содержания элементов в образцах крови на полосках и максимальными отклонениями от средних значений (*M/Макс*) дополнительно свидетельствует о достаточно узком диапазоне вариаций в содержании элементов независимо от состояния проб (влажные и сухие) и способа пробоподготовки (разные объемы элюирующего раствора).

Представленные в табл. 3 результаты анализа показывают, что содержание элементов в цельной крови полностью соответствует диапазону варьирования в содержании соответствующих элементов в стрипованных образцах на ПСМН. Более того, содержание определенных элементов (Cd, Cu, Mo, Pb, Se, Sn, W, Zn) в цельной крови и на полосках соответствует литературным референтным значениям для данных элементов [9–12]. Примерно трехкратное превышение содержания Ag, Co, Ni, Sn, V, а также 10-, 18- и 20-кратное превышение содержания As, Sb и Mn может отражать индивидуальные вариации в содержании элементов, обусловленные территориальными особенностями

проживания донора [13]. Это означает, что элементное содержание высушенных образцов крови отражает содержание элементов в цельной крови, доказывая возможность замены элементного анализа интактной крови на анализ ее высушенных стрипованных образцов.

Проведенное исследование показывает, что содержание элементов в высушенных образцах практически полностью соответствует содержанию элементов в интактной крови. Использование носителя нового формата для отбора проб из пористого гидрофильного стекловолоконного материала существенно повышает возможности количественного анализа элементов и молекул в высушенных образцах крови, по сравнению с традиционными целлюлозными носителями, имеющими ряд недостатков [14]. По сравнению с целлюлозной основой стекловолоконная мембрана имеет ряд механических (более высокая прочность и сопротивление деформации) и структурных (твердая волоконная структура) преимуществ. В отличие от полых целлюлозных волокон, цельная структура стекловолоконных нитей делает ее непроницаемой для биологической жидкости, и как следствие увеличивает эффективность элюирования анализируемых компонентов из мембраны. Кроме того, структура стекловолоконных мембран позволяет устранить хроматографический эффект распределения компонентов при абсорбции биологической жидкости и преодолеть трудности в количественном анализе цельной крови, которые обусловлены эффектом гематокрита и характерны для целлюлозных мембран [1, 14]. Равномерное распределение биоматериала за счет его капиллярного поднятия в стекловолоконной мембране позволяет избежать неточности при анализе сложных биологических жидкостей, таких как кровь, независимо от форменных элементов крови [7].

В полуколичественном исследовании элементного состава крови на целлюлозном носителе элементное содержание Li, Cd, Cs, Cr, Ni, Mo и Pb более чем в 20 раз превышает соответствующий средний уровень [14]. Это еще раз демонстрирует преимущества носителя нового формата для высушенных образцов биологических жидкостей, позволяющие проводить длительное хранение образцов для отсроченного во времени элементного анализа.

Выводы

Таким образом, содержание элементов в цельной крови и в высушенных образцах на

Т а б л и ц а 3

Содержание элементов в интактной крови и среднестатистические значения элементного содержания в образцах крови на полосках, мг/л*

Элемент	Содержание, мг/л,					Справочная информация по элементному содержанию, мг/л
	цельная кровь	образцы крови на полосках				
		$M \pm \sigma$	мин,	макс,	M/Макс	
Ag	0,004	0,0040±0,0012	0,0019	0,005	1,34	0,0010 [9]
As	0,0108	0,011±0,002	0,0096	0,0128	1,14	0,0010 [9]
Ba	0,267	0,26±0,035	0,218	0,297	1,13	0,0010 [9]; 0,2601 [12]
Be	0,0013	0,0013±0,0001	0,0012	0,0014	1,05	0,0008 [11]; 0,0010 [12]; 0,000031 [12]
Bi	0,0014	0,002±0,0008	0,0005	0,0028	1,57	0,0010 [9]; 0,000021 [12]
Ca	37,6	35,8±3,7	29,3	38,4	1,07	–
Cd	0,0004	0,0006±0,0002	0,0003	0,0007	1,25	0,0007 [10]; 0,0008 [11]; 0,0010 [9]; 0,00011 [12]
Co*	0,0073	0,008±0,002	0,0063	0,0103	1,26	0,0002 [10]; 0,0003 [11]; 0,0010; 0,0004 [9]
Cs	0,0022	0,003±0,001	0,0019	0,0042	1,43	0,00321 [12]
Cu	0,99	0,94±0,15	0,75	1,12	1,19	0,82 [10]; 1,01 [12]
Fe	346,6	304±20	283,7	331,7	1,09	–
K	1138	1203±101	1036	1304	1,08	–
Mg	31,6	30,7±1,7	28,6	33,2	1,08	–
Mn	0,02	0,02±0,002	0,0167	0,0217	1,08	0,0086 [11]; 0,0010 [9]; 0,0088; 0,01 [12]
Mo	0,0018	0,002±0,0006	0,0016	0,0031	1,40	0,0014 [10]; 0,0010 [9]; 0,0011 [12]
Na	1267	1138±113	969	1242	1,09	–
Ni	0,0104	0,012±0,003	0,0075	0,0152	1,29	0,0033 [10]; 0,0047 [11]; 0,010 [9]; 0,0006 [12]
P	215,6	188,6±11,5	171,7	200,4	1,06	–
Pb	0,0113	0,012±0,0008	0,0108	0,0128	1,09	0,034 [10]; 0,042 [11]; 0,0010 [9]; 0,009 [12]
Sb	0,0185	0,018±0,0015	0,0167	0,0199	1,09	0,0006 [10]; 0,0010 [9]; 0,00004 [12]
Se	0,112	0,097±0,012	0,081	0,111	1,15	0,12 [10]; 0,108 [14]
Si	0,515	0,507±0,024	0,472	0,528	1,04	3,8 [12]
Sn	0,0048	0,004±0,0006	0,0032	0,0047	1,09	0,0017 [10]; 0,0010 [10]; 0,0004 [12]
Tl	0,0015	0,0014±0,0004	0,0008	0,0018	1,30	0,0010 [9]; 0,00002 [12]
V	0,0023	0,002±0,0002	0,002	0,0026	1,17	0,00007 [11]; 0,0010 [9]; 0,00016 [12]
W	0,00051	0,0005±0,0002	0,00039	0,00079	1,47	0,0004 [10]; 0,0010 [9]; 0,000016 [12]
Zn	4,78	4,09±0,38	3,57	4,63	1,13	6,59 [10]; 4,89 [12]

*Справочные данные по элементам в крови [9–12].

ПСМН, выявленных с помощью метода масс-спектрометрии соответствует диапазону референсных значений исключительно на цельной (интактной) крови [9–12], что впервые продемонстрировало адекватность применения высушенных образцов крови на карточках DBS нового формата с использованием ПСМН для количественного элементного анализа крови.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Исследования проводятся по теме НИР 0226-2019-0032.

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meesters R.J., Hooff G.P. // *Bioanalysis*. 2013. N 5. P. 2187 (<http://dx.doi.org/10.4155/bio.13.175>).
2. Wilhelm A.J., J.C. den Burger, Swart E.L. // *Clin. Pharmacokinet.* 2014. Vol. 53. P. 961 (<http://dx.doi.org/10.1007/s40262-014-0177-7>).
3. Demirev P.A. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. P. 779 (<http://dx.doi.org/10.1021/ac303205m>).
4. Rosypal A.C., Pick L.D., Esquivel-Hernandez J.O., Lindsay D.S. // *Vet. Parasitol.* 2014. Vol. 205. P. 338 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.031>).
5. Spooner D.N. // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86. P. 8489 (<http://dx.doi.org/10.1021/ac5022562>).
6. Saushkin N.Y., Samsonova J.V., Osipov A.P. et al. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2016. Vol. 71. P. 319 (<https://doi.org/10.3103/S0027131416050084>).
7. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. // *Talanta*. 2017. Vol. 175. P. 143.
8. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах масс-спектрометрией с индуктивно связанной аргоновой плазмой (ИСП-МС). Методические рекомендации // М., 2003.
9. Gouille J.P., Mahieu L., Castermant J. et al. // *Reference values. Forensic Sci. Int.* 2005. Vol. 153. N 1. P. 39 [Pub Med: 15979835].
10. Barbany E., Bergdahl I.A., Schutz A. et al. // *J. Anal. Atomic Spectrometry*. 1997. N 12. P. 1005.
11. Bocca B., Alimonti A., Petrucci F., et al. // *Spectrochim Acta B*. 2004. Vol. 59. P. 559.
12. Rodushkin I., Odman F., Olofsson R., Axelsson M.D. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2000. Vol. 15. P. 937. SAS Institute. SAS 9.1 Documentation. SAS Institute. 2009.
13. Belisheva N.K. Chapter 43. Comparative Analysis of Morbidity and Elemental Composition of Hair Among Children Living on Different Territories of the Kola North. O.V. Frank-Kamenetskaya et al (eds.) / *Processes and Phenomena on the Boundary Between Biogenic and Abiogenic Nature. Lecture Notes in Earth System Sciences.* Springer Nature Switzerland AG 2020. 2019. P. 803 (https://doi.org/10.1007/978-3-030-21614-6_43).
14. Langer E.K., Johnson K.J., Shafer M.M. et al. // *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 2011. Vol. 21. N 4. P. 355.

Поступила в редакцию 10.05.2020
Получена после доработки 12.05.2020
Принята к публикации 20.05.2020

COMPARISON OF ELEMENTAL BLOOD ANALYSIS IN INTACT AND DRY SAMPLES. POROUS MEMBRANES AS A NEW SAMPLING FORMAT

S.V. Drogobuzhskaya^{1*}, S.E. Kondakov², N.K. Belisheva³, A.I. Novikov¹, E.S. Ihalainen⁴

(¹ I.V. Tananaev Institute of Chemistry and Technology of Rare Elements and Mineral Resources (a separate subdivision of the Federal Research Center of the KSC RAS), Apatity; ² Department of Chemical Kinetics, Faculty of Chemistry, Moscow State University Lomonosov, Moscow; ³ Research Center for Medical and Biological Problems of Human Adaptation in the Arctic, Federal Research Center of the KSC RAS, Apatity; ⁴ S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg; *e-mail: s.drogobuzhskaia@ksc.ru)

The possibility of using dry blood samples on porous glass fiber membrane carriers (PGMC) for blood quantitative elemental analysis of using the method of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS) has been demonstrated. Comparison of the results of elemental analysis of intact blood and its dry samples is carried out. It was shown that regardless of the state of the samples (wet and dry), as well as the method of sample preparation (different volumes of elution solution), the content of the corresponding elements in dry samples fully corresponds to the content of elements in whole blood and to the reference values according to literary data.

Key words: DBS technology, new format DBS cards, fiberglass carrier, whole blood, stripped dry whole blood samples, inductively coupled plasma mass spectrometry.

Сведения об авторах: *Дрогобужская Светлана Витальевна* – ст. науч. сотр. института химии и технологии редких элементов и минерального сырья имени И.В. Тананаева – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Кольский научный центр РАН», доцент, канд. хим. наук (s.drogobuzhskaia@ksc.ru, drogosv@yandex.ru); *Кондаков Сергей Эмильевич* – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru); *Белишева Наталья Константиновна* – вед. науч. сотр. научно-исследовательского центра медико-биологических проблем адаптации человека в Арктике Федерального исследовательского центра «Кольский научный центр РАН», докт. биол. наук (natalybelisheva@mail.ru); *Новиков Андрей Игоревич* – мл. науч. сотр. института химии и технологии редких элементов и минерального сырья имени И.В. Тананаева – обособленного подразделения Федерального исследовательского центра «Кольский научный центр РАН», (a.novikov@ksc.ru); *Ихалайнен Екатерина Сергеевна* – соискатель ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России (ihalaynen@gmail.com).