

Государственное бюджетное нетиповое образовательное учреждение
«Санкт-Петербургский государственный дворец творчества юных»
Эколого-биологический центр «Крестовский остров»

Исследовательская работа:
«Качественное и количественное определение тяжёлых металлов в волосах
человека»

Выполнили: Яковлева Екатерина Вадимовна, 10 класс
Макаренко Алексей Дмитриевич, 10 класс

Детское объединение: Лаборатория аналитической химии

Руководитель: заведующий лабораторией
ЭБЦ «Крестовский остров»
Ширяев Валерий Алексеевич

Санкт-Петербург
2023-2024 гг.

Оглавление

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	3
1.1 Железо и медь в организме человека.....	3
1.2 Состав волос человека.....	4
1.3 Основные методы определения тяжёлых металлов в волосах человека.....	5
1.4 Бумажная хроматография.....	6
1.5 Вывод по литературному обзору.....	7
2. Материалы и методы.....	7
2.1 Концентрирование тяжёлых металлов из волос человека.....	8
2.2 Качественное определение железа с помощью бумажной хроматографии.....	9
2.3 Качественное определение тяжёлых металлов с помощью бумажной хроматографии.....	11
3. Полученные результаты.....	12
4. Выводы.....	18
Заключение.....	18
Список литературы.....	18

Введение

Тяжёлые металлы, в частности железо и медь, очень важны для нормального функционирования жизненно важных процессов организма. Однако их переизбыток может привести к отравлению, поэтому необходим мониторинг количественного содержания. Одним из биологических материалов, подходящих для этой цели, являются волосы, так как они имеют свойство накапливать некоторые вещества, содержащиеся в организме. Большинство методов анализа волос, используемых в современной медицине, предполагают использование дорогостоящего оборудования. Это снижает доступность исследования, так как образцы необходимо анализировать в специализированных лабораториях. По этой причине было решено подобрать менее затратные методы, которые позволят проводить исследование в лабораториях без специализации.

Гипотезой данного проекта является предположение о том, что с помощью бумажной хроматографии можно качественно определить содержание тяжёлых металлов в волосах.

Целью данного проекта было создать методику для качественного определения содержания железа и меди в волосах человека.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать методики качественного определения железа и меди
2. Проверить найденные методики на модельных растворах
3. Провести качественный анализ содержания железа и меди на биологическом образце, которым являются человеческие волосы
4. Сравнить результаты анализов модельных растворов и волос и определить диапазоны концентраций тяжёлых металлов в волосах

1. Обзор литературы

1.1 Железо и медь в организме человека

В организме человека железо обеспечивает транспорт электронов и кислорода, участвует в окислительно-восстановительных реакциях [1]. Железо, попадающее в организм с пищей, является, в основном, двухвалентным и связывается с гемом – специальным белком. Насыщение клеток и тканей железом происходит с помощью белка трансферрина, который переносит ионы трёхвалентного железа в крови [2]. Наибольшее количество железа содержится в говяжьей печени, рыбе (тунец), тыкве, устрицах, овсяной крупе, какао, горохе, листовой зелени, пивных дрожжах, инжире и изюме. Витамины С и В12, пепсин и медь способствуют усвоению железа [3]. Согласно российским источникам физиологическая потребность в железе для взрослых – 0,01 г/сутки (для мужчин) и 0,018 г/сутки (для

женщин), для детей – от 0,004 до 0,018 г/сутки [1]. Согласно нормам USDA (Министерство сельского хозяйства США) физиологическая потребность в железе для взрослых мужчин – 0,008 г/сутки, для взрослых женщин – 0,018 г/сутки [4]. Токсичной дозой железа для человека считается 0,2 г, летальной дозой – 7-35 г.

Медь в организме человека входит в состав окислительно-восстановительных ферментов, участвует в метаболизме железа и усвоении белков и углеводов. Также медь играет роль в обеспечении тканей организма человека кислородом [1]. Медь способна проникать во все клетки, ткани и органы. Максимальная концентрация меди отмечена в печени, почках, мозге и крови. В желудочно-кишечном тракте абсорбируется до 95% поступившей в организм меди. Лучше всего усваивается двухвалентная медь, связываемая в крови с белком церулоплазмином и другими соединениями. Наибольшее содержание меди наблюдается в морских продуктах, бобовых, капусте, картофеле, крапиве, кукурузе, моркови, шпинате, яблоках, какао-бобах. Цинк, железо и кобальт (в умеренных физиологических дозах) повышают усвоение меди [3]. Согласно российским источникам физиологическая потребность в меди для взрослых – 1,0 мг/сутки, для детей – от 0,5 до 1,0 мг/сутки [1]. Согласно нормам USDA физиологическая потребность в меди для взрослых – 0,9 мг/сутки [4]. Токсичной дозой меди для человека является доза, более 250 мг.

1.2 Состав волос человека

Волосы человека – придатки кожи, защищающие её от перегревания, переохлаждения и механических повреждений. В основном, волосы состоят из кератина (~95%). Также в состав волос входит небольшое количество воды, липидов, минеральных веществ и пигмента [5]. Кератин – полипептид, состоящий из аминокислот с межмолекулярной связью дисульфидной аминокислоты и с меж- и внутримолекулярной связью полярных и неполярных кислот. Кератин нерастворим в воде, во многих слабых кислотах и растворах щелочей, а также в органических растворителях. Он устойчив к основным ферментам, переваривающим белки, например, пепсин и трипсин. Такими свойствами кератин обладает за счет поперечных меж- и внутрицепочечных, водородных, гидрофобных и ионных связей [6]. Также волосы имеют свойство накапливать некоторые элементы: эссенциальные элементы (Cu, Zn, Co, Fe, Cr и Mn), токсичные и потенциально токсичные элементы (Cd, As и Pb), условно эссенциальные микроэлементы (Ni) и основные (P, Ca, K и Mg) элементы [7].

Данные о количественном содержании эссенциальных элементов, в частности железа и меди, в волосах человека разнятся, так как этот фактор очень сильно зависит от биологических особенностей человека и

окружающей его среды. Однако примерный диапазон значений выявить можно. И железо, и медь содержатся в волосах человека в концентрациях, измеряемых в микрограммах металла на грамм волос, однако значения концентрации меди располагаются где-то около 10 мкг/г, а значения концентрации железа – около 15-20 мкг/г [7].

1.3 Основные методы определения тяжёлых металлов в волосах человека

Основными методами определения тяжёлых металлов в волосах человека являются атомно-абсорбционная спектрометрия, атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой, масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой и хроматография.

Атомно-абсорбционная спектрометрия (AAS) – метод качественного и количественного определения металлов. Он основан на способности свободных ионов металлов поглощать свет. Прибор – атомно-абсорбционный спектрометр – сравнивает аналитический сигнал (момент поглощения света) анализируемого вещества со стандартными значениями (экспериментально установленные исходные значения) и на основании полученных данных определяет состав вещества и концентрации элементов [8].

Атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) – аналитический метод, позволяющий качественно и количественно определять химические элементы. Метод основан на измерении длины волны электромагнитного излучения различных атомов и ионов в возбуждённом состоянии. Для возбуждения частиц используется плазма – источник ионизированного исходного газа (чаще всего, аргона) с высокой температурой (6000-10000°K). Специальный прибор – атомно-эмиссионный спектрометр – снимает показания длин волн и интенсивности излучения и позволяет определить состав вещества и концентрации содержащихся в нём элементов [9].

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) – самый новый и популярный метод качественного и количественного определения биологических веществ. Его главным плюсом является способность обнаружения веществ в очень маленьких количествах, то есть это очень чувствительный метод. Сначала анализируемое вещество подвергается воздействию плазмы (такой же, как в ICP-AES), в результате чего выделяются ионы. Далее эти ионы попадают в масс-спектрометр (специальный прибор, непосредственно проводящий анализ), где определяется соотношение массы иона к его заряду, что позволяет определить массу молекулы. Таким образом вещество определяется качественно. Количественный анализ проводится через сравнение со стандартными значениями [10].

Все эти методы – очень точные, однако имеющие изрядное количество минусов. Оборудование, необходимое для проведения анализа, сложно устроенное и очень дорогостоящее. Кроме того, оно требует тщательного ухода и постоянной замены некоторых составляющих. Уход и непосредственно проведение анализа, а также интерпретацию результатов может обеспечить только специально обученный человек. Таким образом, эти методы нельзя назвать общедоступными методами.

Хроматография – важный аналитический метод, позволяющий определять вещества во всех основных агрегатных состояниях (газообразное, жидкое, твёрдое). При этом вещество может быть и неорганическим, (ионы металлов, изотопы водорода и др.) и органическим (белки, синтетические полимеры и др.). Молекулярная масса вещества может составлять от единиц до 10^6 , что говорит о чувствительности метода.

Хроматография – физико-химический метод разделения и определения веществ, при котором компоненты этого вещества распределяются между двумя фазами. Неподвижная фаза – сорбент (твёрдое вещество) или плёнка жидкости, нанесённая на твёрдую основу, а подвижная фаза – газ или жидкость, протекающая через неподвижную фазу. Для проведения большинства видов хроматографии (газовая, абсорбционная, ионная и др.) необходимо дорогостоящее оборудование. Работать с этим оборудованием может только специально обученный человек. Всё это не соответствует критерию о общедоступности. Однако существуют менее «сложные» методы хроматографии, например, бумажная хроматография [11].

1.4 Бумажная хроматография

Бумажная хроматография – это метод, основанный на капиллярном эффекте, за счёт которого элюент (подвижная фаза) поднимается по целлюлозе (неподвижной фазе). Распределение веществ при данном эффекте будет различаться, поэтому разные ионы будут проходить разное расстояние, из-за чего их можно определить качественно и количественно.

В бумажной хроматографии неподвижной фазой является специальная хроматографическая бумага. Она должна быть химически чистой, нейтральной и инертной по отношению к компонентам исследуемого раствора и к подвижной фазе. Также большое значение имеет её однородность по плотности, структура молекул целлюлозы, ориентация волокон и другие факторы, влияющие на скорость движения подвижной фазы. Подвижной фазой обычно является смесь растворителей. Хроматографическую бумагу также обрабатывают растворителем. Поэтому важно учитывать, что растворители подвижной и неподвижной фаз не должны смешиваться, состав растворителя в процессе анализа не должен

изменяться, растворители должны легко удаляться с бумаги для дальнейшего проведения определения состава исследуемого вещества [12].

1.5 Вывод по литературному обзору

Таким образом, исследуя волосы, можно определить концентрации тяжёлых металлов в организме человека. На данный момент для проведения анализа чаще всего используется метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS) – очень точный, однако очень дорогостоящий метод. Более доступным методом, по нашему мнению, является метод бумажной хроматографии, не менее точный, но значительно более простой в реализации. Однако нам не удалось обнаружить исследований, изучающих концентрации тяжёлых металлов в волосах человека с помощью этого метода. Наша работа нацелена на исследование возможности использования бумажной хроматографии для данного анализа.

2. Материалы и методы

На рисунке 1 приведена схема проведения исследования. Разработку методики можно условно разбить на 4 составляющие: подбор элюента, подбор проявителя, создание хроматографической камеры и пробоподготовку волос человека. Первые три составляющие необходимы для определения тяжёлых металлов, последняя – для выделения тяжёлых металлов из волос. Тестирование элюента, проявителя и хроматографической камеры происходит на модельных растворах, имитирующих раствор тяжёлых металлов, полученный из волос. После подбора подходящей комбинации элюента и проявителя, а также удачной конструкции хроматографической камеры можно приступить к дальнейшей работе с растворами тяжёлых металлов из волос человека, полученными с помощью метода пробоподготовки. На основе этого этапа будут озвучены результаты исследования.

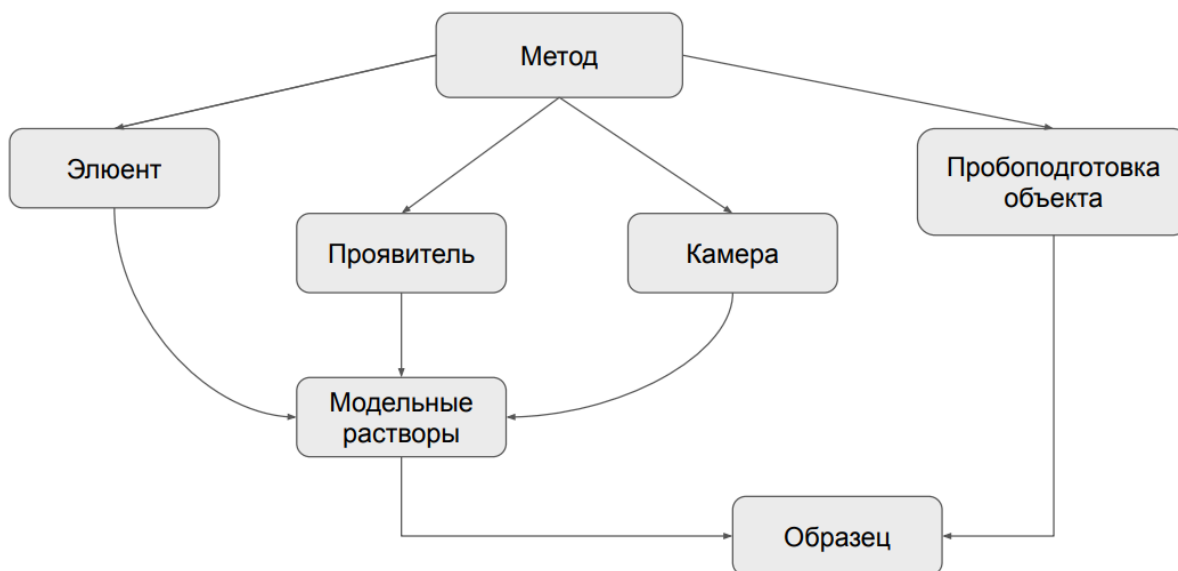


Рис. 1 - Схема проведения исследования

2.1 Концентрирование тяжёлых металлов из волос человека

На рисунке 2 представлена схема проведения концентрирования тяжёлых металлов из волос человек. Сначала у человека срезают 0,5 г волос. После чего их измельчают и помещают в химический стакан, в который далее добавляется 1 мл азотной кислоты, с концентрацией равной 63%. К полученной смеси добавляют 9 мл дистиллированной воды. Стакан со смесью помещают в ультразвуковую ванну для экстрагирования. После ультразвуковой ванны раствор фильтруют и переливают в мерную колбу на 50 мл, где доводят дистиллированной водой до 50 мл. Раствор в колбе является пробой, которую будут проверять на содержание тяжёлых металлов.

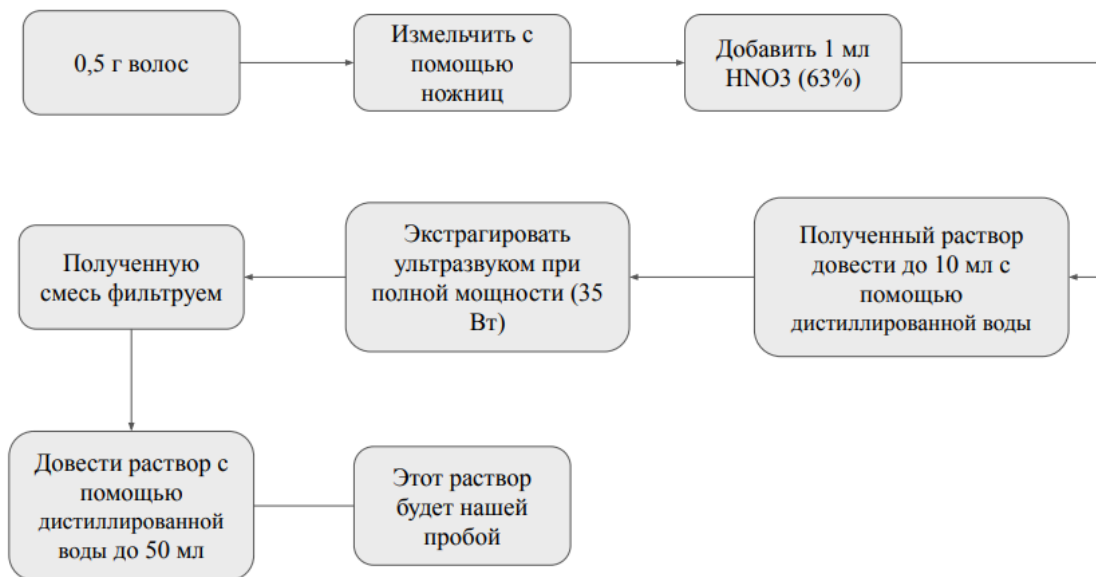


Рис. 2 – Схема проведения концентрирования тяжёлых металлов из волос человек

2.2 Качественное определение железа с помощью бумажной хроматографии

На рисунке 3 представлена схема проведения качественного определения железа с помощью бумажной хроматографии. В начале готовится элюент, состоящий из ацетона (87%), дистиллированной воды (5%) и концентрированной соляной кислоты (8%) (указан процент от общего V элюента). Полученный элюенты заливают в хроматографическую камеру, представленную на рисунке 4. Далее из фильтровальной бумаги вырезают пластины, длиной 21 см и шириной 2 см, также на пластинах нужно отметить линию старта на расстоянии 1 см от края. На вырезанные пластины наносится две капли анализируемого раствора, после нанесения каждой капли раствора необходимо просушить пластину над песчаной баней. Пластины с анализируемым раствором помещают в хроматографическую камеру на 90 минут. Пока элюент поднимается по пластинам, готовят проявитель – раствор гексацианоферрата (II) калия с концентрацией 1%. По истечении 90 минут пластины достают из камеры и фиксируют расстояние, которое прошёл элюент, проводя линию простым карандашом, после этого пластины сушат над песчаной баней. Высушенные пластины опрыскивают проявителем и фиксируют положение катионов. После этого рассчитывают коэффициент подвижности R_f , что необходимо для подтверждения полученных результатов. Коэффициент R_f – отношение расстояния от центра пятна до линии старта к расстоянию от фронта растворителя до линии старта

– рассчитывается по формуле (1).

$$R_f = \frac{l}{L} \quad (1)$$

где R_f – коэффициент подвижности, l – расстояние от центра пятна до линии старта, L – расстояние от фронта растворителя до линии старта



Рис. 3 – Схема проведения качественного определения железа с помощью бумажной хроматографии

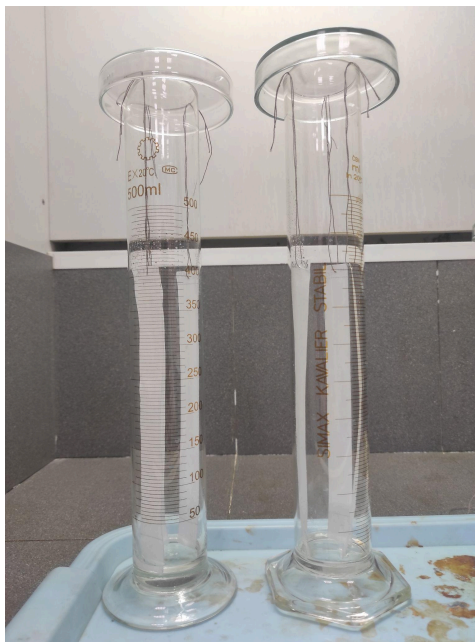


Рис. 4 – Хроматографическая камера

2.3 Качественное определение тяжёлых металлов с помощью бумажной хроматографии

На рисунке 5 представлена схема проведения качественного определения тяжёлых металлов с помощью бумажной хроматографии. Данная методика практически идентична предыдущей, однако отличается способ проявления хроматограмм. В начале готовится элюент, состоящий из ацетона (87%), дистиллированной воды (5%) и концентрированной соляной кислоты (8%) (указан процент от общего объёма элюента). Полученный элюенты заливают в хроматографическую камеру, представленную на рисунке 4. Далее из фильтровальной бумаги вырезают пластины, длиной 21 см и шириной 2 см, также на пластинах нужно отметить линию старта на расстоянии 1 см от края. На вырезанные пластины наносится две капли анализируемого раствора, после нанесения каждой капли раствора необходимо просушить пластину над песчаной баней. Пластины с анализируемым раствором помещают в хроматографическую камеру на 90 минут. Пока элюент поднимается по пластинам, готовят проявитель – 2%-ый раствор иодида калия. По истечении 90 минут пластины достают из камеры и фиксируют расстояние, которое прошёл элюент, проводя линию простым карандашом, после этого пластины сушат над песчаной баней. Высушенные пластины опрыскивают проявителем, затем высушивают. Следующим этапом проявления является аммиачная камера. Пластины помещают в камеру так, чтобы они не касались жидкого аммиака, на них должны действовать только

его пары. Через несколько минут пластины необходимо переместить в сероводородную камеру. После этого фиксируют положение катионов и рассчитывают коэффициент подвижности R_f , необходимый для подтверждения полученных результатов. Коэффициент R_f – отношение расстояния от центра пятна до линии старта к расстоянию от фронта растворителя до линии старта – рассчитывается по формуле (1).



Рис. 5 – Схема проведения качественного определения тяжёлых металлов с помощью бумажной хроматографии

3. Полученные результаты

Все предварительные исследования проводились на модельных растворах железа и меди с концентрациями 1 г/л, 1 мг/л и 0,01 мг/л. Модельные растворы с концентрацией 1 г/л были тестовыми. Они давали общее представление о работе методики, о положении катионов и окраске пятен. Модельные растворы с концентрациями 1 мг/л и 0,01 мг/л были необходимы для интерпретации непосредственно результатов исследования волос. Они показывали превышенные значения концентраций тяжёлых металлов.

Волосы для исследования были взяты у мужчины 43 лет без нарушений здоровья, связанных с концентрацией металлов в организме.

На рисунке 6 представлены результаты исследований на железо по методике с раствором гексацианоферрата (II) калия в качестве проявителя. Были качественно определены катионы железа (Fe^{3+}) на модельных растворах с концентрациями 1 г/л, 1 мг/л и 0,01 мг/л. Таким образом был определён предел чувствительности методики – 0,01 г/л. Он соответствует нашим требованиям, то есть качественное определение железа в волосах возможно проводить по этой методике.

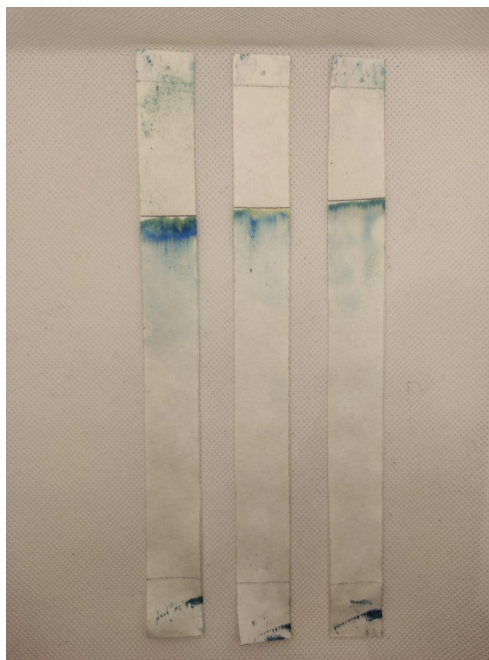


Рис. 6 – Хроматограммы растворов железа (Fe^{3+}) с концентрациями 1 г/л, 1 мг/л и 0,01 мг/л (слева направо)

На рисунке 7 представлены результаты исследований на медь по методике с раствором иодида калия в качестве проявителя. Были качественно определены катионы меди (Cu^{2+}) на модельных растворах с концентрациями 1 г/л, 1 мг/л и 0,01 мг/л. Таким образом был определён предел чувствительности методики – 0,01 г/л. Он соответствует нашим требованиям, то есть качественное определение железа в волосах возможно проводить по этой методике.

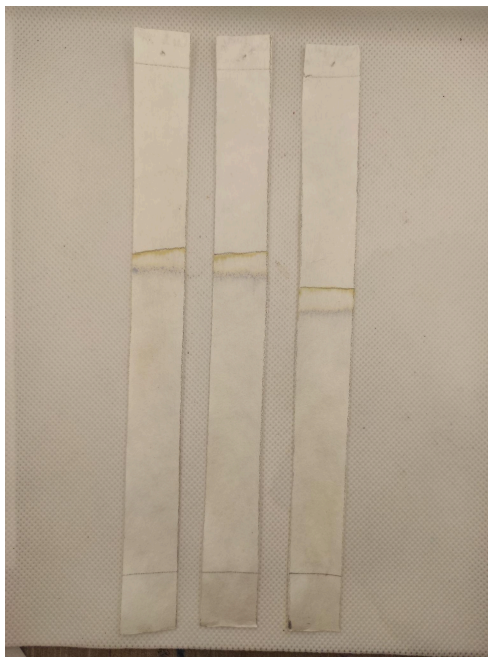


Рис. 7 – Хроматограммы растворов меди (Cu^{2+}) с концентрациями 1 г/л, 1 мг/л и 0,01 мг/л (слева направо)

На рисунке 8 представлены результаты исследований на железо по методике с раствором иодида калия в качестве проявителя. Были качественно определены катионы меди (Cu^{2+}) на модельных растворах с концентрациями 1 мг/л и 0,01 мг/л. Раствор с концентрацией 1 г/л не рассматривался, так как пригодность методики уже была протестирована на меди. Таким образом был определён предел чувствительности методики – 0,01 г/л. Он соответствует нашим требованиям, то есть качественное определение железа в волосах возможно проводить по этой методике.



Рис. 8 – Хроматограммы растворов железа (Fe^{3+}) с концентрациями 1 мг/л и 0,01 мг/л (слева направо)

На рисунке 9 представлен результат исследования волос по методике с раствором гексацианоферрата (II) калия в качестве проявителя. Зона расположения катиона значительно бледнее и меньше по площади, чем на хроматограммах модельных растворов (см. рис. 6). Это говорит о том, что концентрации тяжёлых металлов в волосах не превышают значения в 0,01 мг/л. Таким образом, содержание тяжёлых металлов в организме испытуемого соответствует норме.

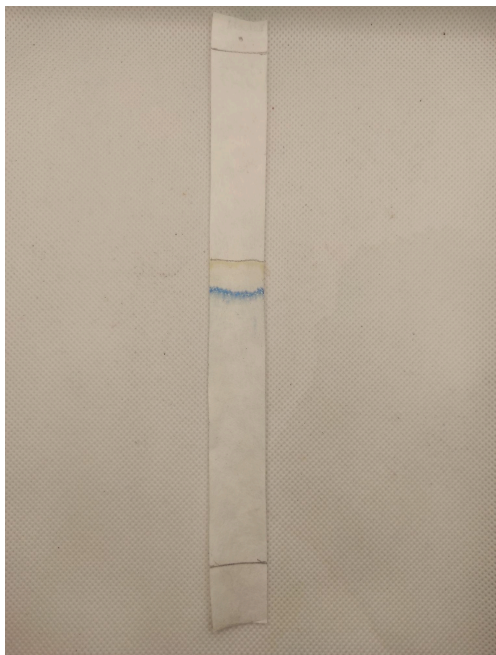


Рис. 9 – Хроматограмма тяжёлых металлов в волосах (методика с раствором гексацианоферрата (II) калия в качестве проявителя)

На рисунках 10 представлен результат исследования волос по методике с раствором иодида калия в качестве проявителя. На рисунке 11, отредактированной версии рисунка 10, зона расположения катиона заметнее и чётче благодаря изменению параметра контрастности на фотографии. Очевидно, что зона расположения катиона значительно бледнее, чем на хроматограммах модельных растворов (см. рис. 7 и рис. 8). Это говорит о том, что концентрации тяжёлых металлов в волосах не превышают значения в 0,01 мг/л. Таким образом, содержание тяжёлых металлов в организме испытуемого соответствует норме.

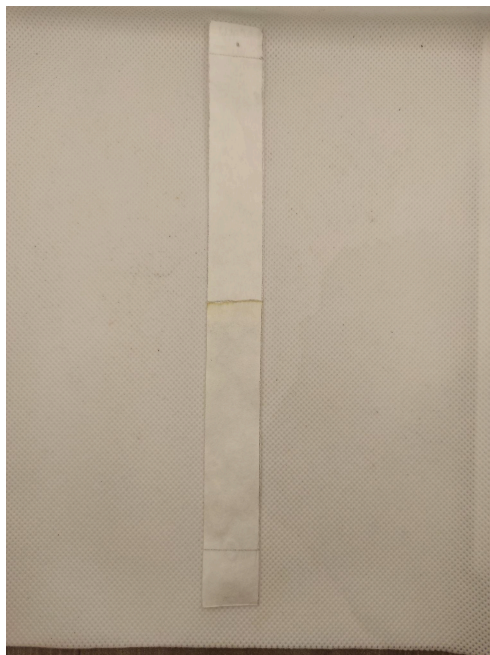


Рис. 10 – Хроматограмма тяжёлых металлов в волосах (методика с раствором иодида калия в качестве проявителя)

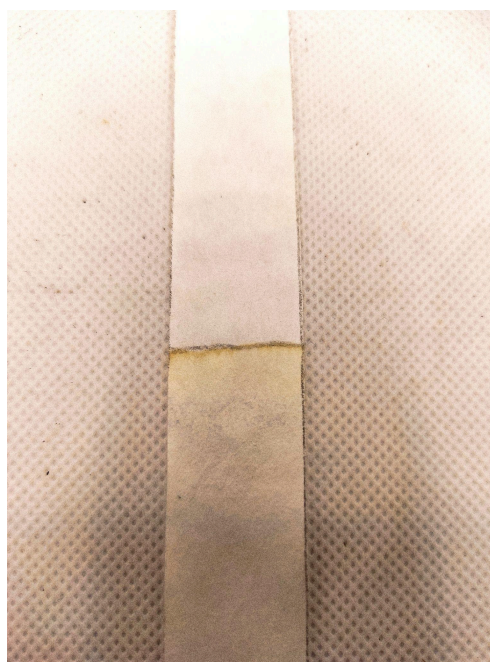


Рис. 11 – Хроматограмма тяжёлых металлов в волосах (методика с раствором иодида калия в качестве проявителя)

4. Выводы

В результате исследования были подобраны методики качественного определения железа и меди.

Все найденные методики были проверены на модельных растворах с заданными концентрациями. Было выявлено, что их чувствительность достаточна для проведения данного исследования.

Были качественно определены тяжёлые металлы в волосах человека. При сравнении результатов данного анализа с результатами анализа модельных растворов было выявлено, что концентрации тяжёлых металлов не превышают нормы.

Результаты данного исследования можно использовать в лабораториях, как метод первичного анализа концентраций тяжёлых металлов в организме человека. Также разработанную методику можно адаптировать для животных, что позволит более массово следить за уровнем тяжёлых металлов в организме животных.

Заключение

В дальнейшем планируется развитие данной темы в направлении количественного определения тяжёлых металлов сначала в модельных растворах, а затем и в волосах человека.

Идея об использовании нашего исследования в рамках лабораторий заключается в том, что не все лаборатории обладают необходимым оборудованием для проведения анализа. Наше исследование призвано решить эту проблему частично, так как точность метода будет ниже, но доступность значительно выше.

Список литературы

1. Методических рекомендации МР 2.3.1.2432-21. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации.
2. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. J Res Med Sci. 2014 Feb;19(2):164-74. PMID: 24778671; PMCID: PMC3999603.
3. Скальный, А. В. Микроэлементы: бодрость, здоровье, долголетие. – Москва: издательство «Перо», 2019 – 297 с. – ISBN 478-5-00150-066-7. – Текст: электронный.
4. USDA: официальный сайт. – Вашингтон. – URL: <https://www.usda.gov/> (дата обращения: 09.12.2023). – Текст: электронный.

5. Clarence R. Robbins, *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*, 2012, ISBN : 978-3-642-25610-3.
6. Бортников С.В., Горенкова Г.А., *Получение растворимой модификации кератина из белоксодержащих отходов животноводства*, Абакан, 2018. – 6 с, УДК 54.056:636.
7. Saule A. Mussabekova, Xeniya E. Mkhitaryan, *Elemental composition of hair as a marker for forensic human identification*, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, Volume 81, 2021, 102182, ISSN 1752-928X, <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2021.102182>.
8. B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry*, 1999, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, ISBN 3-527-28571-7.
9. Xiandeng Hou and Bradley T. Jones, *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000, pp. 9468–9485
10. Adrian A. Ammann, *Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool*, *Journal of mass spectrometry*, Volume 42, Issue 4, 2007, pages 419-427, <https://doi.org/10.1002/jms.1206>.
11. L.S. Ettre, A. Zlatkis, *75 Years of Chromatography: A Historical Dialogue*, Elsevier, 2011, pages 501, ISBN 0080858171, 9780080858173.
12. *Хроматография на бумаге*, [Текст], И. М. Хайс [и др.] ; под ред. И. М. Хайса и К. Мацека ; пер. с чеш. Б. М. Вольфсона [и др.] ; под ред. канд. биол. наук М. Н. Запрометова Москва : Издательство иностранной литературы, 1962. – 851 с.