

УДК 543.54

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАТИОНОВ КАЛИЯ, НАТРИЯ, МАГНИЯ И КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Е. В. Полякова, О. В. Шуваева, Е. М. Полянская*
Институт неорганической химии им. А. В. Николаева СО РАН
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 3
*Новосибирский государственный университет
630090, Новосибирск, Пирогова, 2
e_polyakova@ngs.ru

Поступила в редакцию 30 мая 2005 г.

Разработана экспрессная методика определения ионов К, Na, Mg и Ca в сыворотке крови методом капиллярного электрофореза после денатурации белков пробы с относительной погрешностью, не превышающей 5 %. Изучено влияние состава пробы на результаты определений. Правильность анализа подтверждена сопоставлением с данными независимых измерений.

Полякова Евгения Валерьевна – аспирант Аналитической лаборатории Института неорганической химии СО РАН.

Область научных интересов: анализ биологических объектов.

Автор 7 работ

Шуваева Ольга Васильевна - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Аналитической лаборатории Института неорганической химии СО РАН

Область научных интересов: элементный и вещественный анализ природных и биологических объектов.

Автор более 100 работ.

Полянская Елена Михайловна - студентка факультета естественных наук Новосибирского государственного университета

Введение

Среди основных показателей состояния здоровья человека наиболее важным является баланс микро- и макрокомпонентов, принимающих активное участие, как в нормальных, так и в патологических процессах в организме. Натрий и калий распределены по всему организму человека, причем первый входит в состав межклеточных жидкостей в качестве наиболее распространенного катиона, тогда как второй встречается главным образом внутри клеток. Натрий и калий ответственны за поддержание постоянных осмотических давлений по обеим сторонам клеточных мембран. Кальций необходим человеку для роста костей и зубов, нормальной сердечной деятельности и свертывания крови. Магний играет важную роль в регуляции нервно-мышечной активности сердца, укрепляет нормальный сердечный ритм, необходим для метаболизма кальция и витамина С. Между магнием и кальцием существует такой же жесткий баланс в организме, как и между натрием и калием. Количественное определение калия, натрия, магния и кальция в жидкостях организма представляет клинический интерес. Получаемые данные нередко облегчают постановку диагноза, дают возможность судить о тяжести заболевания и позволяют следить за эффективностью тех или иных терапевтических

ких мероприятий.

В мировой практике анализа для определения макроэлементов используют методы атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) [1], атомно-эмиссионной спектроскопии с различными источниками возбуждения спектров (АЭС) [2, 3]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки: ААС – одноэлементный метод, в АЭС возможны матричные влияния со стороны состава пробы. В последнее время для анализа объектов различной природы активно применяют метод капиллярного электрофореза (КЭФ) – перспективный метод вещественного анализа, который позволяет определять органические и неорганические катионы и анионы, а также незаряженные компоненты. Существенными достоинствами метода является крайне малый объем пробы, необходимый для анализа, экспрессность и простота аналитической процедуры.

Цель данной работы – разработать экспрессную, экономичную методику одновременного определения калия, натрия, кальция и магния в сыворотке крови методом капиллярного электрофореза.

Экспериментальная часть

В работе использовали установку капиллярного электрофореза «Капель-103Р» (НПФ «Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия) с фотометрическим детектором (254 нм) и кварцевым капилляром диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см и эффективной – 50 см. Схематическое изображение установки дано на рис. 1.

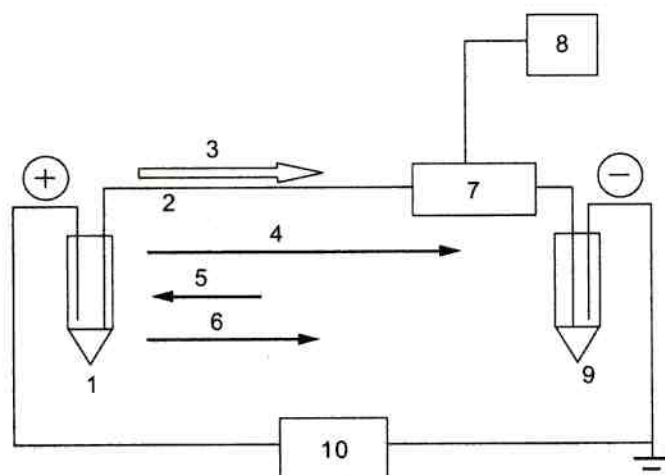


Рис. 1. Общая схема установки капиллярного электрофореза: 1 - входная пробирка, 2 - кварцевый капилляр, 3 - направление движения электроосмотического потока, 4 - направление движения катионов, 5 - направление движения анионов, 6 - направление движения нейтральных компонентов, 7 - оптический детектор, 8 - персональный компьютер, 9 - выходная пробирка, 10 - источник высокого напряжения

Ввод пробы осуществляли пневматически давлением 30 мбар в течение 5 с. В процессе анализа применяли напряжение +15 кВ, общее время анализа составляло 10 мин. В состав ведущего электролита входили: бензимидазол 6 мМ (поглощающий катион) и винная кислота 2,5 мМ. Для калибровки применяли водные растворы, содержащие смеси катионов калия, натрия, кальция и магния, в концентрациях 0,5–50 мг/л.

Пробоподготовка

Одна из наиболее важных проблем, возникающих при анализе проб биологической природы методом капиллярного электрофореза, – влияние органической матрицы на результаты анализа. В литературе описаны различные варианты подготовки образцов к анализу [4], среди которых используется и простое разбавление сыворотки деионизованной водой. Однако при таком способе пробоподготовки белки пробы сорбируются на поверхности капилляра, блокируя поверхность и изменяя ее эффективный заряд. Последнее приводит к увеличению времен выхода компонентов от ввода к вводу и, в конечном итоге, к ухудшению воспроизводимости результатов анализа. Для устранения этого эффекта нами был предложен способ подготовки пробы к анализу, при котором белковую компоненту предварительно осаждали добавлением ацетонитрила к сыворотке крови в объемном соотношении 2:1. Перед анализом пробу разбавляли деионизованной водой в 30–100 раз, полученный раствор отстаивали в течение 30–50 мин. до полного осаждения хлопьев денатурированных белков. Супернатант подвергали процедуре капиллярного электрофореза. Типичная электрофореграмма разбавленной сыворотки крови приведена на рис. 2.

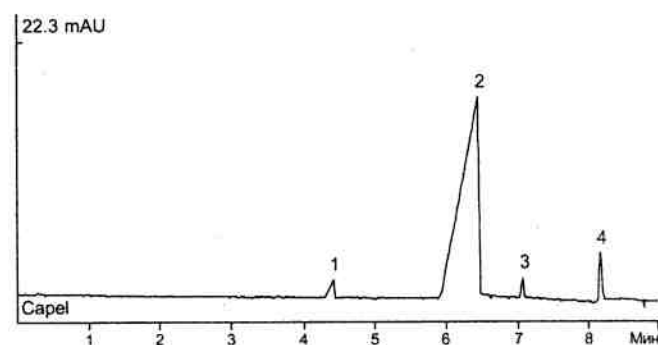


Рис. 2. Электрофореграмма пробы сыворотки крови после осаждения белков (разбавление в 50 раз). Порядок выхода ионов: калий (1), натрий (2), магний (3), кальций (4)

Результаты и обсуждение

Для получения достоверных данных о содержании катионов калия, натрия, кальция и маг-

ния в пробе сыворотки крови методом КЭФ необходимо было решить следующие вопросы:

- оценить стабильность состава пробы во времени после отделения белков и разбавления;
- установить влияние макрокомпонентного состава пробы на результаты определения катионов;
- выявить наличие или отсутствие систематической погрешности разработанной методики анализа.

На рис. 3 представлены результаты эксперимента, подтверждающего постоянство состава пробы в течение нескольких дней: видно, что в пределах доверительного интервала результаты анализа остаются неизменными.

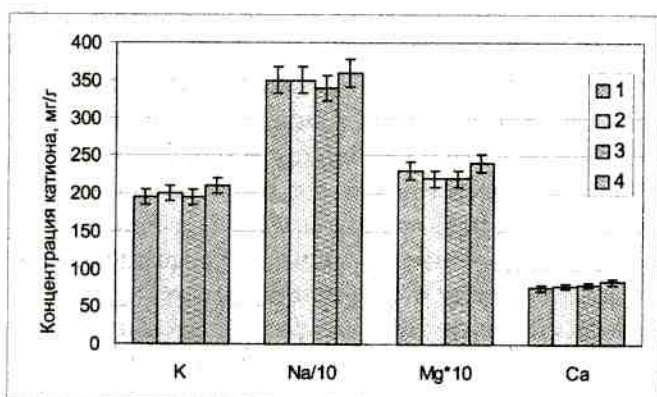


Рис. 3. Результаты определения калия, натрия, кальция и магния в пробе сыворотки крови после осаждения белков во времени: 1 - первый день после осаждения, 2 - второй, 3 - третий, 4 - четвертый

Отсутствие взаимного влияния компонентов пробы на результаты определения катионов подтверждают результаты анализа пробы с различной степенью разбавления (рис. 4).

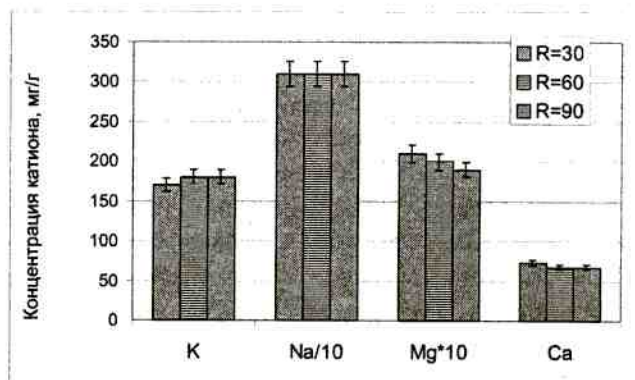


Рис.4. Влияние степени разбавления R на определение катионного состава сыворотки крови

Правильность определения калия, натрия, кальция и магния в пробах сыворотки крови методом КЭФ подтверждена сопоставлением полученных результатов с данными независимого метода определения, а именно, атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) после полной минерализации пробы в микроволновой печи (авторы выражают благодарность Гладких Э. А. (ОИГГМ СО РАН) за предоставленные результаты). Сопоставление результатов анализа, полученных независимыми методами, приведено в таблице.

Таблица
Сопоставление результатов анализа сыворотки крови независимыми методами, мг/л

Элемент	Метод	C _{ср}	S	n	t _{эксп}	t _{табл}
K	КЭФ	190	9	5	1,10	2,45
	ИСП-АЭС	196	2	3		
Na	КЭФ	3130	50	4	0,38	2,57
	ИСП-АЭС	3140	53	3		
Mg	КЭФ	19,7	0,9	3	1,68	2,78
	ИСП-АЭС	18,7	0,3	3		
Ca	КЭФ	76	5	6	2,54	2,36
	ИСП-АЭС	85	2,9	3		

Для вычисления экспериментальных значений t-критерия для доверительной вероятности 0,95 применяли статистики [5]:

$$t_{\text{эксп}} = |C_{\text{ср1}} - C_{\text{ср2}}| \cdot (n_1 n_2)^{1/2} / S_0 (n_1 + n_2)^{1/2}$$

$$S_0^2 = ((n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2) / (n_1 + n_2 - 2),$$

где C_{ср1} и C_{ср2} – средние значения независимых определений; S₁ и S₂ – выборочное стандартное

отклонение двух серий независимых определений; S₀ – выборочное стандартное отклонение для разности двух средних значений; n₁ и n₂ – число измерений. Индексы 1 и 2 относятся к методам КЭФ и ИСП-АЭС соответственно.

Из приведенных результатов видно, что значения коэффициентов t_{табл} > t_{эксп} для калия, натрия и магния, что свидетельствует об отсутствии

значимой систематической погрешности и о том, что эти элементы находятся в сыворотке исключительно в ионной форме. Следует принимать во внимание тот факт, что в отличие от натрия, калия и магния часть кальция может находиться в связанной форме и по этой причине не определяется методом КЭФ. Поэтому значение коэффициента $t_{\text{табл}} < t_{\text{эксп}}$. Возможность определения ионного кальция представляется чрезвычайно важной для диагностики, т.к. лучше отражает метаболизм кальция в организме.

Выводы

Разработана методика определения катионов калия, натрия, магния и кальция в сыворотке крови с относительной погрешностью 3-5 % методом капиллярного электрофореза. Методика может служить альтернативой традиционно применяемому для определения калия, натрия и магния методу ААС. Кроме того, методика позволяет определять ионный кальций, имеющий дополнительное значение для диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Прайс В. Аналитическая атомно-абсорбционная спектрометрия. М.: Мир, 1976. 355 с.
2. Taylor A. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages / A.Taylor, S.Branch, D.Halls et al. // J. of Analyt. Atom. Spectrometry. 2003. V.18. P.385 – 427.
3. Гладких Э. А. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии с возбуждением спектров в дуге постоянного тока для оценки средних уровней содержания микро- и макроэлементов в волосах человека / Э.А.Гладких, Е.В.Полякова, О.В.Шуваева и др. // Микроэлементы в медицине. 2003. Т.4, Ч. 3. С.20-24.
4. Timerbaev A.R. Inorganic biological analysis by capillary electrophoresis // The Analyst. 2001. V.126. P.964-981.
5. Дюерфель К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир. 1994. 267 с.

* * * * *

DETERMINATION OF POTASSIUM, SODIUM, MAGNESIUM AND CALCIUM IN HUMAN SERUM BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

E.V.Polyakova, O.V.Shuvaeva, E.M.Polyanskaya

A rapid assay for determination of potassium, sodium, calcium and magnesium ions in deproteinized human serum with relative standard deviations less than 0,05 has been developed using capillary zone electrophoresis. The influence of sample composition on the analytical results has been studied. The accuracy control has been done by the comparison of the data produced with the results of independent method.