

УДК 543.42

DOI 10.17223/24135542/12/4

**В.И. Отмахов, Е.С. Рабцевич, Д.Е. Бабенков, Е.В. Петрова**

*Национальный исследовательский Томский государственный университет  
(г. Томск, Россия)*

## **Разработка спектральных методик анализа биологических объектов животного происхождения**

*Работа посвящена разработке подходов и методик количественного элементного анализа объектов животного происхождения методами дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии и пламенной фотометрии. Исследование анионного состава для дальнейшего учета и устранения матричного влияния проводили методом ИК-спектроскопии. В процессе исследований был применен новый подход к анализу органов подопытных животных с использованием оригинального способа устранения матричного влияния.*

**Ключевые слова:** *спектральный анализ; органы подопытных животных; ИК-спектроскопия; матричные влияния.*

### **Введение**

С появлением новых лекарственных препаратов возникает необходимость проведения их испытаний. При этом ни одно исследование нового препарата не может обойтись без испытания на животных. Это позволяет определить фармакологические эффекты, механизм действия и локализацию действующих веществ, а также процессы, происходящие с лекарственным средством в организме. Помимо этого, такие опыты помогают выявить различные неблагоприятные побочные эффекты, связанные с применением лекарственных препаратов, во избежание проявления их у пациентов в будущем.

Наиболее часто для этих целей используют альбиносов норвежских крыс, или, по-другому, «лабораторных» крыс. Они используются в поведенческих, физиологических, медицинских и других видах исследований уже более века [1].

В работе проводилось определение элементного состава тканей внутренних органов (мозг, сердце, печень, почки, а также кровь) лабораторных крыс для оценки распределения химических элементов в организме животных [2].

Для элементного анализа объектов растительного и животного происхождения целесообразно использовать метод дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии, позволяющий проводить определение элементного состава

более чем на 30 элементов с погрешностью, не превышающей 20 отн. % [3–7]. Количественное определение макро- и микроэлементов в различных органах подопытных животных проводили методом дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии (ДАЭС) с использованием комплекса «Гранд», включающего спектроаналитический генератор «Везувий-3», полихроматор «Роуланд» и многоканальный анализатор эмиссионных спектров – МАЭС (НПО «Оптоэлектроника», Россия), и методом пламенной фотометрии (ПФ) с использованием атомно-абсорбционного спектрометра Solaar серии S.

### **Экспериментальная часть**

Анализируемые образцы тканей подопытных крыс высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре  $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$ . Предварительно взвешенные сухие пробы растирали во фторопластовой ступке и переносили в предварительно прокаленные кварцевые чашки.

Для анализа методом ДАЭС с МАЭС проводили озоление до полного разрушения исследуемого образца. Установив кварцевые чашки в холодную муфельную печь, постепенно нагревали их до температуры  $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ . Выдерживали пробы при такой температуре до постоянной массы. Полученную золу тканей крыс разбавляли графитовым порошком в соотношении 1:10 и 1:100, навески полученной смеси по 15 мг помещали в графитовый электрод. Затем в стандартные образцы при анализе пробы, разбавленной 1:10, в каждый электрод вводилась корректирующая добавка в соответствии с содержанием в анализируемой пробе преобладающего элемента, при введении корректирующей добавки учитывался ее анионный состав. При разбавлении пробы 1:100 добавляли легко ионизируемый носитель NaCl – 3% по катиону для стабилизации условий поступления элементов в дуговой разряд. Определение основных жизненно необходимых (эссенциальных) элементов осуществлялось при разбавлении пробы 1:100, определение токсичных микроэлементов проводилось при разбавлении 1:10. Съемку спектров проводили при условиях:  $I = 13 \text{ A}$ ,  $\tau = 20 \text{ с}$ . Для определения щелочных металлов методом ПФ зольные остатки растворяли в 0,2 мл HCl ( $C_M = 6 \text{ M}$ ) при умеренном нагревании на электрической плите. Полученный раствор отфильтровали от осадка через фильтр «красная лента» в пробирку объемом 5 мл и доводили раствор до метки бидистиллированной водой.

Скрининговый анализ по основным компонентам, проведенный методами ДАЭС с МАЭС и ПФ, приведен в табл. 1.

Из таблицы видно, что содержание калия и натрия на порядок и более превосходит содержание других элементов. Соответственно остальные элементы не будут оказывать значительного влияния на правильность проведения спектрального анализа на регламентируемые примеси. Так же из-

вестно, что значительное матричное влияние может оказывать и анионный состав присутствующих в золе макроэлементов.

Таблица 1

Содержание макроэлементов в золе тканей крыс, определенное методом ДАЭС с МАЭС (разбавление 1:100) и ПФ ( $n = 5, P = 0,95$ )

Определяемый элемент / орган	ПФ			ДАЭС с МАЭС	
	К, мг/г	Na, мг/г	Р, мг/г	Mg, мкг/г	Ca, мкг/г
Мозг	135 ± 12	60 ± 5	10 ± 9	480 ± 110	290 ± 60
Сердце	131 ± 12	46 ± 4	8 ± 2	960 ± 190	190 ± 40
Кровь	246 ± 20	200 ± 22	2,0 ± 0,6	200 ± 40	270 ± 60
Печень	207 ± 25	23 ± 3	12 ± 2	900 ± 180	100 ± 20
Почки	203 ± 25	107 ± 11	10 ± 3	450 ± 100	200 ± 40

Для установления молекулярной составляющей зольного остатка тканей подопытных крыс использовали метод ИК-спектроскопии с использованием Фурье-спектрометра Nicolet 380 фирмы Thermo Electron Corporation (США). Отобранные пробы объектов помещали в агатовую ступку, перетирали с КВг и прессовали в таблетку диаметром 2 мм. Спектр снимали в режиме «пропускание», количество сканирований – 32. Полученные спектры представлены на рис. 1.

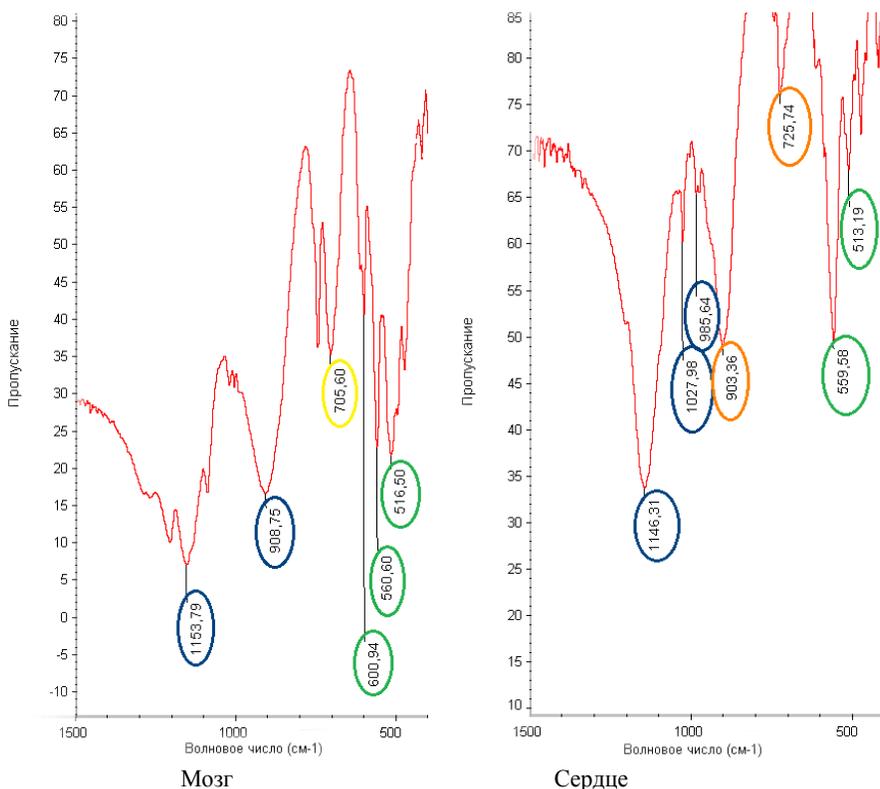


Рис. 1. Анионный состав золы органов подопытных крыс. Обозначения см. на с. 40

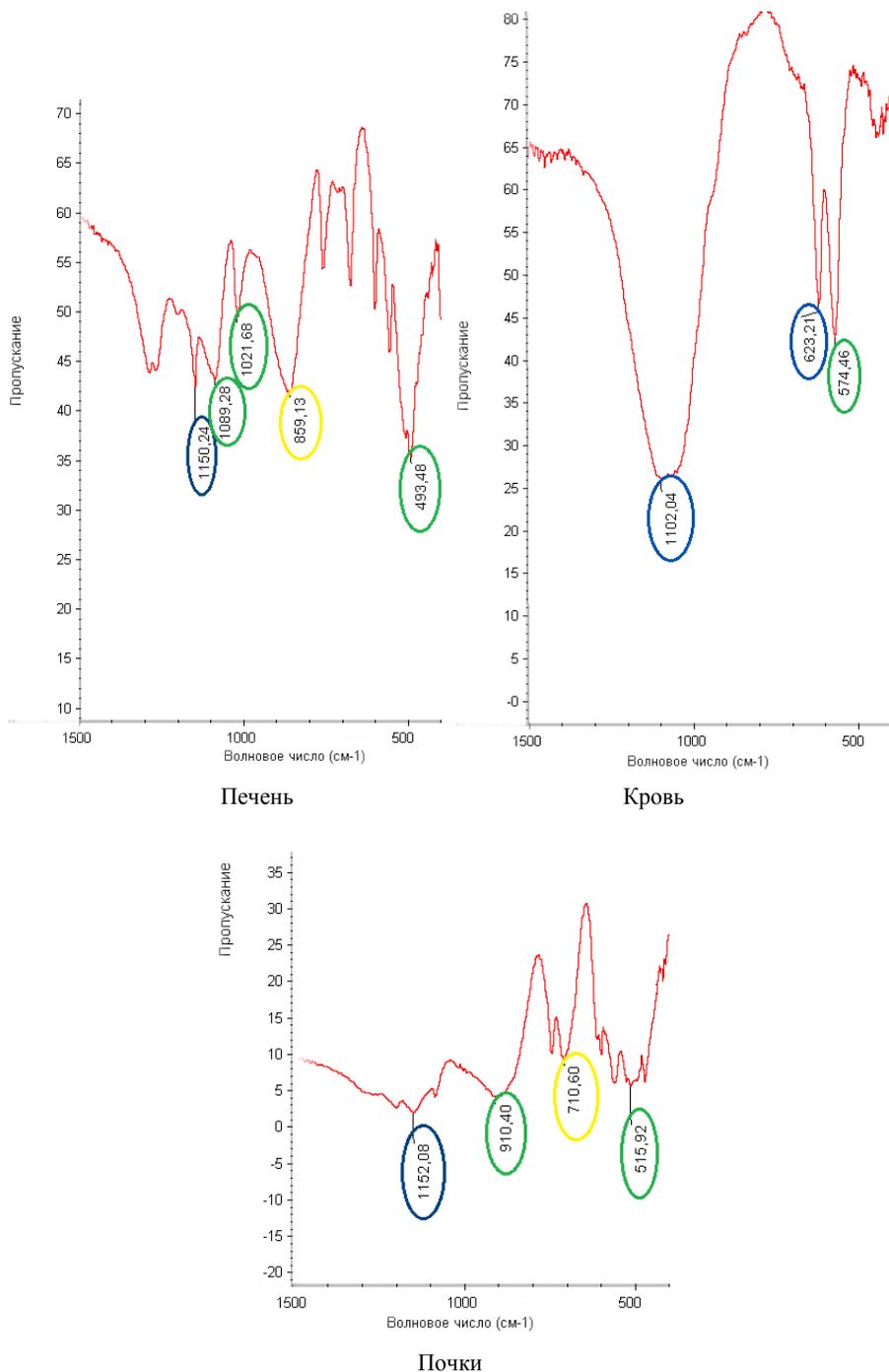


Рис. 1. Анионный состав золы органов подопытных крыс:

○ —  $\text{CO}_3^{2-}$ -ионы; ○ —  $\text{PO}_4^{3-}$ -ионы; ○ —  $\text{SO}_4^{2-}$ -ионы; ○ —  $\text{NO}_3^-$ -ионы

Результаты, представленные в табл. 1 и рис. 1, можно отобразить в виде обобщенной модели распределения примесей в органах крыс (рис. 2).

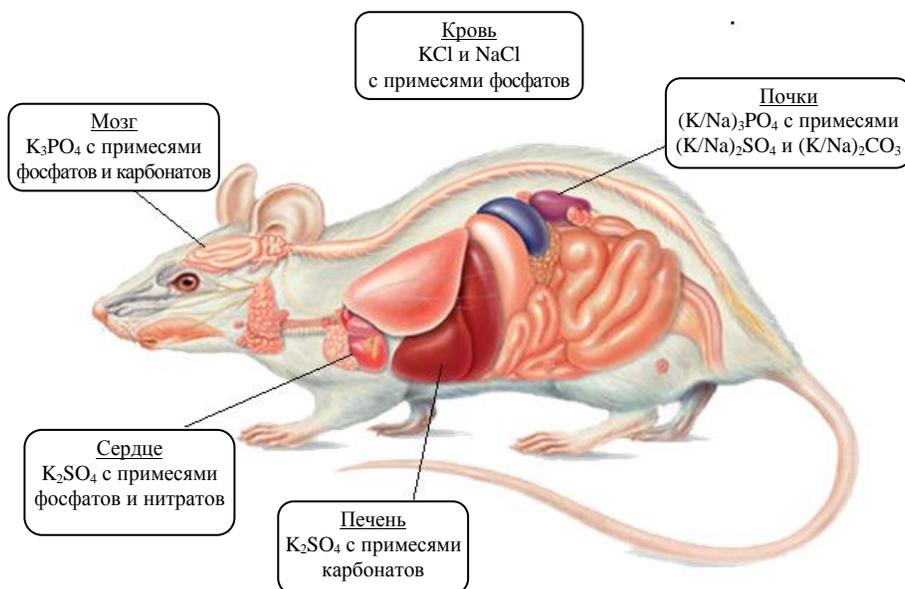


Рис. 2. Обобщенная модель распределения примесей в органах крыс

Таким образом, при разработке методик спектрального анализа органов подопытных животных на микропримеси необходимо учитывать матричные влияния солей для каждого конкретного органа. Для этого следует строго рассчитать концентрацию по катиону в анализируемом образце и добавить в соответствии с анионным составом в стандартные образцы на графитовой основе. Содержание катиона в анализируемом образце и стандартах на графитовой основе должно строго соответствовать.

Для проверки эффективности данного способа учета матричного влияния был использован стандартный образец состава ткани трески (MODAS-4 Cognorant Tissue, Польша). Выбор стандартного образца обусловлен близостью по химическому составу и биологическому происхождению с анализируемыми образцами. Предварительный анализ стандарта показал, что основа зольных остатков преимущественно состоит из  $K_3PO_4$  с примесями  $(K/Na)_2SO_4$ ,  $(K/Na)_2CO_3$ . Спиртовый раствор фосфата калия вводился в стандартные образцы на графитовой основе в строгом соответствии с содержанием его в стандартном образце состава ткани трески. Полученные результаты представлены в табл. 2, из которой видно, что корректирующая добавка существенно улучшает правильность проведения анализа. По критерию Стьюдента расхождение результатов незначимо на фоне случайного разброса.

Таблица 2

Содержание микроэлементов в стандартном образце состава ткани трески MODAS-4 Cormorant Tissue с учетом введения корректирующей добавки  $K_3PO_4$  в стандартные образцы ( $P = 0,95, n = 10, t_{таб} = 2,28$ )

Элемент	Аттестованное значение, мкг/г	Определенное содержание без добавки $K_3PO_4$ , мкг/г	$t_{эксп}$	Определенное содержание с добавкой $K_3PO_4$ , мкг/г	$t_{эксп}$
Ca	258	170 ± 50	5,56	263 ± 33	0,48
Zn	63,4	45 ± 13	4,47	58 ± 10	1,71
Cu	19,5	11 ± 3	8,95	18 ± 2	0,79
Rb	13,4	18 ± 5	2,91	12 ± 3	1,47
Pb	2,33	3,8 ± 1,9	2,44	2,6 ± 0,5	1,71
Mn	2,16	2,8 ± 0,8	2,53	2,0 ± 0,3	1,69
Co	0,041	0,08 ± 0,04	3,08	0,05 ± 0,02	1,42

Таблица 3

Содержание элементов в тканях органов подопытных крыс, определенное методом ДАЭС с МАЭС и ПФ ( $n = 5, P = 0,95$ )

Метод	Орган / определяемый элемент	Мозг	Сердце	Кровь	Печень	Почки
ПФ	K, мг/г	15 ± 1,5	15 ± 1,5	26,6 ± 2,7	24,7 ± 2,5	24,3 ± 2,4
	Na, мг/г	6,6 ± 0,7	3,6 ± 0,4	22 ± 2	3,3 ± 0,3	12 ± 1
	Li, мкг/г	8,8 ± 0,9	3,6 ± 0,4	20 ± 2	5,2 ± 0,5	11 ± 1
ДАЭС с МАЭС	P, мг/г	19 ± 8	11 ± 2,2	3,0 ± 0,7	24 ± 5	14 ± 3
	Ca, мкг/г	390 ± 80	290 ± 60	390 ± 80	0,21 ± 0,04	240 ± 50
	Mg, мкг/г	580 ± 120	1 060 ± 210	270 ± 50	1,4 ± 0,3	550 ± 110
	Si, мкг/г	130 ± 30	230 ± 50	28 ± 6	0,038 ± 0,008	180 ± 40
	Fe, мкг/г	260 ± 50	50 ± 10	200 ± 40	0,06 ± 0,01	26 ± 5
	Zn, мкг/г	50 ± 10	60 ± 13	35 ± 7	0,17 ± 0,03	90 ± 20
	Al, мкг/г	29 ± 6	0,014 ± 0,003	8 ± 2	0,022 ± 0,004	1,2 ± 0,2
	Mn, мкг/г	6 ± 1	5 ± 1	0,10 ± 0,02	0,020 ± 0,004	6 ± 1
	Cd, мкг/г	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,7	0,14 ± 0,03	14 ± 3	2,3 ± 0,5
	Ni, мкг/г	6 ± 1	6 ± 1	—	—	—
	Ba, мкг/г	0,9 ± 0,2	3,3 ± 0,7	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,4	0,13 ± 0,03
	Co, мкг/г	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,7 ± 0,1
Cr, мкг/г	0,06 ± 0,01	4,6 ± 0,9	11 ± 2	0,13 ± 0,03	0,037 ± 0,007	
Cu, мкг/г	0,20 ± 0,04	2,3 ± 0,5	7 ± 2	0,005 ± 0,001	30 ± 6	

С учетом данных рекомендаций проведен полный спектральный анализ органов подопытных крыс, результаты представлены в табл. 3.

### Заключение

С целью оптимизации условий проведения спектрального анализа для устранения матричных влияний на стадии пробоподготовки методами ДАЭС с МАЭС и ПФ проведен скрининговый анализ на содержание ос-

новых элементов в зольном остатке органов подопытных крыс. Показано, что основными элементами зольного остатка являются калий, натрий и фосфор, причем содержание калия на порядок и более превосходит содержание других элементов. Методом ИК-спектроскопии установлен анионный состав зольных остатков анализируемых объектов. Показана возможность устранения матричных влияний путем непосредственного введения корректирующей добавки в стандартные образцы на графитовой основе перед проведением анализа. Разработанные подходы устранения матричных влияний при проведении спектрального анализа путем введения корректирующих добавок положены в основу создания методик количественного химического анализа биологических объектов животного происхождения. По разработанным методикам проведен анализ тканей подопытных крыс, используемых при создании лекарственных препаратов ритмомодулирующего действия.

### Литература

1. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. М. : Рипол Классик, 2005. 284 с.
2. Baker H.J., Lindsey J.R., Weisbroth S.H. The laboratory rat. New York : Academic Press, 1979. Vol. 1: Biology and diseases. 450 p.
3. Отмахов В.И. Методологические особенности создания методик атомно-эмиссионного анализа различных объектов // Аналитика и контроль. 2005. Т. 9, № 3. С. 245–249.
4. Отмахов В.И. и др. Создание методики определения элементного состава клещей для оценки их восприимчивости к возбудителям клещевых инфекций // Вестник Томского государственного университета. Химия. 2018. № 11. С. 23–31.
5. Накамото К. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / под ред. Ю.А. Пентина. М. : Мир, 1991. 536 с.
6. ГСО 8487–2003. Стандартные образцы состава графитового коллектора микропримесей. Комплект СОГ-37. Екатеринбург : УГТУ–УПИ, 2003.
7. Зверева В.В., Трунова В.А. Определение элементного состава тканей сердечно-сосудистой системы атомно-спектрометрическим, масс-спектрометрическим и рентгеноспектральными методами анализа // Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67, № 7. С. 677–696.
8. Карцова Л.А., Ярошенко Д.В. Матричный эффект и способы его устранения в биоаналитических методиках, использующих спектрометрические методы анализа // Журнал аналитической химии. 2014. Т. 69, № 4. С. 351–358.
9. РМГ 61-2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки : взамен РМГ 61–2003; введ. 2012–09–01. М. : Стандартинформ, 2012. 62 с.
10. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа : учеб. для вузов / под ред. О.М. Петрухина. М. : Химия, 2001. 496 с.

#### Информация об авторах:

**Отмахов Владимир Ильич**, д-р техн. наук, профессор кафедры аналитической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: otmahov2004@mail.ru

**Рабцевич Евгения Сергеевна**, аспирант кафедры аналитической химии химического факультета; инженер-исследователь ЦКП «Аналитический центр геохимии природных систем» Томского

государственного университета Томского государственного университета (г. Томск, Россия).  
E-mail: evgenia882-a@mail.ru

**Бабенков Денис Евгеньевич** – ассистент; аспирант кафедры аналитической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: denis\_babekov@list.ru

**Петрова Елена Васильевна**, канд. хим. наук, доцент кафедры аналитической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: elena1207@sibmail.com

*Tomsk State University Journal of Chemistry*, 2018, 12, 37–45. DOI: 10.17223/24135542/12/4

---

**V.I. Otmakhov, E.S. Rabtsevich, D.E. Babekov, E.V. Petrova**

*National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia)*

### **Development of spectral techniques for the analysis of biological objects of animal origin**

*The work is devoted to the elemental analysis of biological objects of animal origin by methods of arc atomic emission spectroscopy and flame photometry with the aim of developing a technique for quantitative chemical analysis. The objects of study were the tissues of internal organs (brain, liver, heart, kidneys), as well as the blood of experimental animals. After the screening analysis, it was shown that the potassium, sodium and phosphorus elements are matrix elements. Moreover, the potassium content by an order of magnitude and more exceeds the content of other elements. Obviously, these elements will significantly influence the definition of regulated impurities. To study the anionic composition of the samples in order to further eliminate the matrix effect, the method of IR-spectroscopy was used. From the conducted studies, it can be assumed that the basis of the ash residue of the brain tissue of experimental rats is  $K_3PO_4$  with an admixture of sulfates and carbonates. The basis of the ash residue of the cardiac muscle tissue of the experimental rats is  $K_2SO_4$  with impurities of phosphates and nitrates. The basis of the ash residue in the experimental rats is  $KCl$  and  $NaCl$  with impurities of phosphates. The basis of the liver residue of the experimental rats is  $K_2SO_4$  with carbonate impurities. The basis of the ash residue of the experimental rats is  $(K/Na)_3PO_4$  with impurities  $(K/Na)_2SO_4$ ,  $(K/Na)_2CO_3$ . In the same form, presumably, are all the other elements.*

*Thus, to take into account the matrix effect when conducting analysis of trace elements, it is necessary to strictly calculate the concentration of cation in the analyzed sample and add it in accordance with the anionic composition in the standard samples on a graphite basis. The cation content in the analyzed sample and standards on a graphite basis must strictly comply. To test the effectiveness of this method of taking into account the matrix effect, a standard sample of cod tissue composition was used (MODAS-4 Cormorant Tissue, Poland). The analysis of the standard sample showed that the corrective additive significantly improves the accuracy of the analysis. Student criterion discrepancy in the results is not significant in comparison with random variation.*

*The developed approaches to eliminate matrix effects during spectral analysis by introducing corrective additives form the basis for creating techniques for quantitative chemical analysis of biological objects of animal origin. According to the developed techniques, an analysis of the tissues of experimental rats used to create drugs of rhythm-modulating action was carried out.*

**Key words:** *spectral analysis; organs of experimental animals; IR-spectroscopy; matrix effects.*

## References

1. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A. *Laboratornye zhivotnye* [The laboratory animals] M.: Ripol Klassik, 2005. 284 p. In Russian
2. Henry J. Baker, J. Russel Lindsey, Steven H. Weisbroth *The laboratory rat, volume 1: biology and diseases*. Academic Press, USA, 1979.
3. Otmakhov V.I. Metodologicheskie osobennosti sozdaniya metodik atomno-emissionnogo analiza razlichnykh obektov [Methodological features of the creation of atomic emission analysis techniques for various objects]. *Analitika i control*, 2005;9(3):245–249. In Russian
4. Otmakhov V.I. i dr. Sozdanie metodiki opredeleniya elementnogo sostava kleshchey dlya otsenki ikh vospriimchivosti k vozбудitelyam kleshchevykh infektsiy [Creation of a technique for determining the elemental composition of ticks to estimate their susceptibility to pathogens of nature-focal infections] // *Vestnik TGU. Khimiya*, 2018;(11):23–31. In Russian
5. Nakamoto K., Pentina Yu.A. (Eds.). *IK spektry i spektry KR neorganicheskikh i koordinatsionnykh soedineniy* [Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds] Moscow. Mir, 1991. 536 p. In Russian
6. GSO 8487-2003. Standartnye obraztsy grafitovogo kollektora mikroprimesy. Komplekt SOG-37 [Standard samples of the composition of the graphite collector of microimpurities. Series SOG-37]. Ekaterinburg. UGTU-UPI, 2003. In Russian
7. Zvereva V.V., Trunova V.A. Opredelenie elementnigi sostava tkanei serdechno-sosudistoy sistemy atomno-spektrometricheskim, mass-spektrometricheskim i rentgenospektralnym metodami analiza [Determination of the elemental composition of tissues of the cardiovascular system by atomic spectrometry, mass spectrometry and X-ray spectrometry methods] // *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2012;67(7):677–696. In Russian
8. Kartsova L.A., Yaroshenko D.V. Matrichnyy effekt i sposoby ego ustraneniya v bioanaliticheskikh metodikakh, ispolzuyushchikh spektrometricheskie metody analiza [Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry] // *Zhurnal analiticheskoy khimii*, 2014;69(4):351–358. In Russian
9. RMG 61-2010. Gosudarstvennaya sistema obespecheniya edinstva izmereniy. Pokazateli tochnosti, pravilnosti, pretsizionnosti metodik kolichestvennogo khimicheskogo analiza. Metody otsenki [State system for ensuring uniformity of measurements. Indicators of accuracy, trueness, precision of methods for quantitative chemical analysis. Evaluation methods]. – Vzamen RMG 61-2003; vved. 2012-09-01. M.: Standartinform, 2012. 62 p. In Russian
10. *Analiticheskaya khimiya. Fizicheskie i fiziko-khimicheskie metody analiza* [Analytical chemistry. Physical and physico-chemical methods of analysis]: Ucheb. dlya vuzov / Pod red. O. Petrukhnina. M.: Khimiya, 2001. 496 p. In Russian

### Information about the authors:

**Otmakhov Vladimir Ilich** – PhD, professor of analytical chemistry department, chemical faculty, Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: otmahov2004@mail.ru

**Rabtsevich Eugenia S.**, graduate student, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry; Research Engineer, CCU "Analytical center of natural systems geochemistry", National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: evgenia882-a@mail.ru

**Babenkov Denis Evgenevich** – assistant, post graduate student of analytical chemistry department, chemical faculty, Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: denis\_babenkov@list.ru

**Petrova Elena Vasilevna** – PhD, assistant professor of analytical chemistry department, chemical faculty, Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: elena1207@sibmail.com