

УДК 543.545.2/612.313.1

**ПРИМЕНЕНИЕ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА**

**APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO DETERMINE
THE MINERAL COMPOSITION OF HUMAN SALIVA**

©Бельская Л. В.

канд. хим. наук

Омский государственный технический университет

ООО «ХимСервис»

г. Омск, Россия, ludab2005@mail.ru

©Belskaya L.

Ph.D., Omsk State Technical University,

KhimServis

Omsk, Russia, ludab2005@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты определения катионов и анионов в слюне человека методом капиллярного электрофореза. Показано, что метод капиллярного электрофореза можно использовать для замены рутинных методик биохимического анализа биологических жидкостей без существенной потери точности определения минерального состава. Подобраны необходимые условия проведения исследования методом капиллярного электрофореза, проведена проверка правильности и воспроизводимости методики.

Abstract. The results of determination of cations and anions in human saliva by capillary electrophoresis are presented. It is shown that the capillary electrophoresis method can be used to replace routine techniques biochemical analysis of biological fluids without significant loss of accuracy of determining the mineral composition. Pick up the necessary conditions for study by capillary electrophoresis, performed validation and reproducibility of the method.

Ключевые слова: слюна, капиллярный электрофорез, минеральный состав.

Keywords: saliva, capillary electrophoresis, mineral composition.

Содержание макро- и микроэлементов во внутренних органах и средах определенным образом отражает гомеостатический статус организма, является весьма точным и чувствительным критерием, позволяющим служить сигналом наступивших в нем патологических изменений [1]. Именно с этой точки зрения оцениваются сдвиги в содержании ряда микроэлементов в крови при клинических исследованиях [2]. Поддержание постоянства внутренней среды организма предусматривает в первую очередь поддержание качественного и количественного содержания минеральных веществ в тканях органов на определенном уровне. На сегодняшний день капиллярный электрофорез является перспективным методом анализа, он динамично развивается и получает все более широкое применение в различных областях аналитической химии [4–7]. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он дает при выполнении измерений, позволяют использовать его в повседневной лабораторной практике. В качестве перспективной биологической жидкости, отражающей общее состояние организма, в последнее время используют слюну, поскольку ее исследование является неинвазивным и безболезненным для пациента [8–12].

Целью данной работы являлось разработка методики определения минерального состава слюны человека методом капиллярного электрофореза.

Материалы и методы

Аппаратурное оформление. Эксперимент проводили с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М (Люмэкс, Санкт-Петербург). В качестве источника света используется дейтериевая лампа, а в качестве диспергирующего элемента — дифракционный монохроматор со спектральным диапазоном 190–380 нм и шириной спектрального интервала 20 нм, фотометрический детектор. Высоковольтный блок постоянного напряжения 1–25 кВ, с шагом 1 кВ, сменная полярность, ток 0–200 мкА. Капилляр кварцевый (длина 30–100 см, внутренний диаметр 50 или 75 мкм) с жидкостным охлаждением с заданием и контролем температуры теплоносителя (диапазон от –10 до +30 °С от температуры окружающей среды). Питание прибора 187–242 В, 50/60 Гц.

Образцы и реактивы. Для эксперимента использовали образцы слюны здоровых людей в возрасте 18–22 года, образцы собирали натошак в стерильную пробирку, центрифугировали при 7 000 об./мин.

Метод измерений основан на фильтровании, разбавлении отобранной пробы, дальнейшем разделении и количественном определении компонентов с косвенным детектированием при определенной длине волны. Нами подобраны условия определения катионного и анионного состава слюны: объем аликвоты исследуемого образца 100 мкл, предварительное осаждение белков слюны 10% раствором трихлоруксусной кислоты, разбавление в 20 раз бидистиллированной водой.

Для определения катионов (ионы аммония, калия, натрия, магния, кальция) ведущий электролит — 20 мМ бензимидазол, 5 мМ винная кислота, 2 мМ 18-краун-6 («Флука», Швейцария). Для определения анионов (хлориды, нитриты, нитраты, фосфаты) ведущий электролит — 10 мМ CrO_3 , 30 мМ диэтаноламин (ДЭА, «Флука», Швейцария), 2 мМ цетилтриметиламмония гидроксид (ЦТА-ОН, «Флука», Швейцария). Параллельно проводили исследование тех же проб слюны стандартными биохимическими методами [13] с использованием реактивов Вектор-Бест (г. Новосибирск).

Условия проведения эксперимента. Для проведения исследований использован кварцевый капилляр $L_{\text{эф}}/L_{\text{общ}} = 50/60$ см, $ID = 75$ мкм. Непосредственно перед проведением анализа капилляр промывают 3 минуты дистиллированной водой, 5 минут 0,5 М раствором гидроксида натрия, 5 минут дистиллированной водой и 10 минут раствором ведущего электролита. Ввод пробы в капилляр пневматический (30 мбар, 10 с). Постоянное напряжение 25 кВ для определения катионов, 17 кВ для анионов. Длина волны фотометрического детектора 267 нм для катионов и 374 нм для анионов. Эксперимент проводили при температуре 20 °С, время анализа 6–7 минут.

Результаты и обсуждение

В качестве подготовительного этапа была проведена градуировка прибора. Перед градуировкой проанализирована в выбранных условиях холостая проба, в качестве которой служит бидистиллированная вода, используемая в дальнейшем для приготовления растворов и градуировочной смеси [14, 15]. Далее была приготовлена градуировочная смесь, содержащая в случае определения анионов 200 мг/л хлорид-ионов, 50 мг/л нитрат- и нитрит-ионов, 25 мг/л фосфат-ионов, для катионов — по 50 мг/л катионов аммония, калия, натрия и кальция, а также 25 мг/л ионов магния. Из полученных растворов последовательным разбавлением в 10 и 100 раз получали градуировочные смеси для построения графиков (Рисунки 1–2).

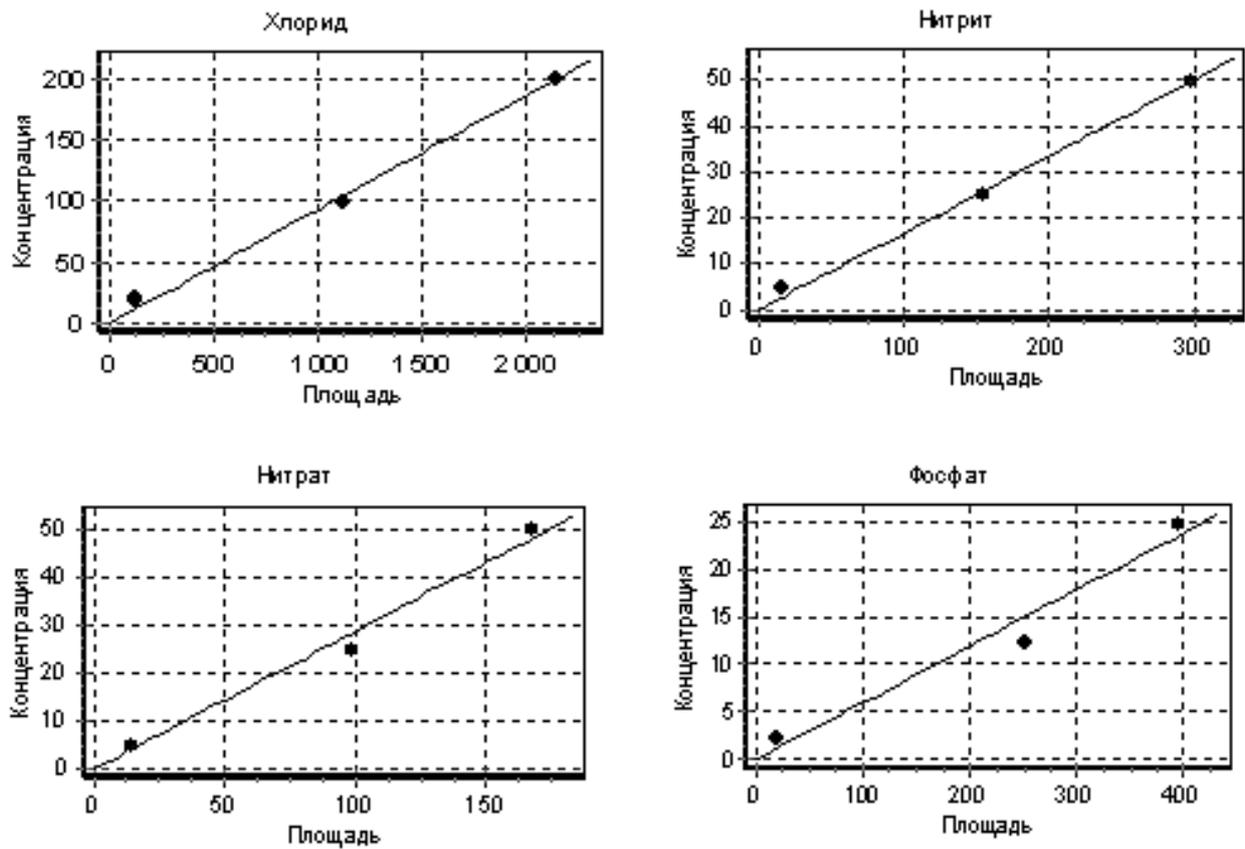


Рисунок 1. Градуировочные графики для анализа анионов.

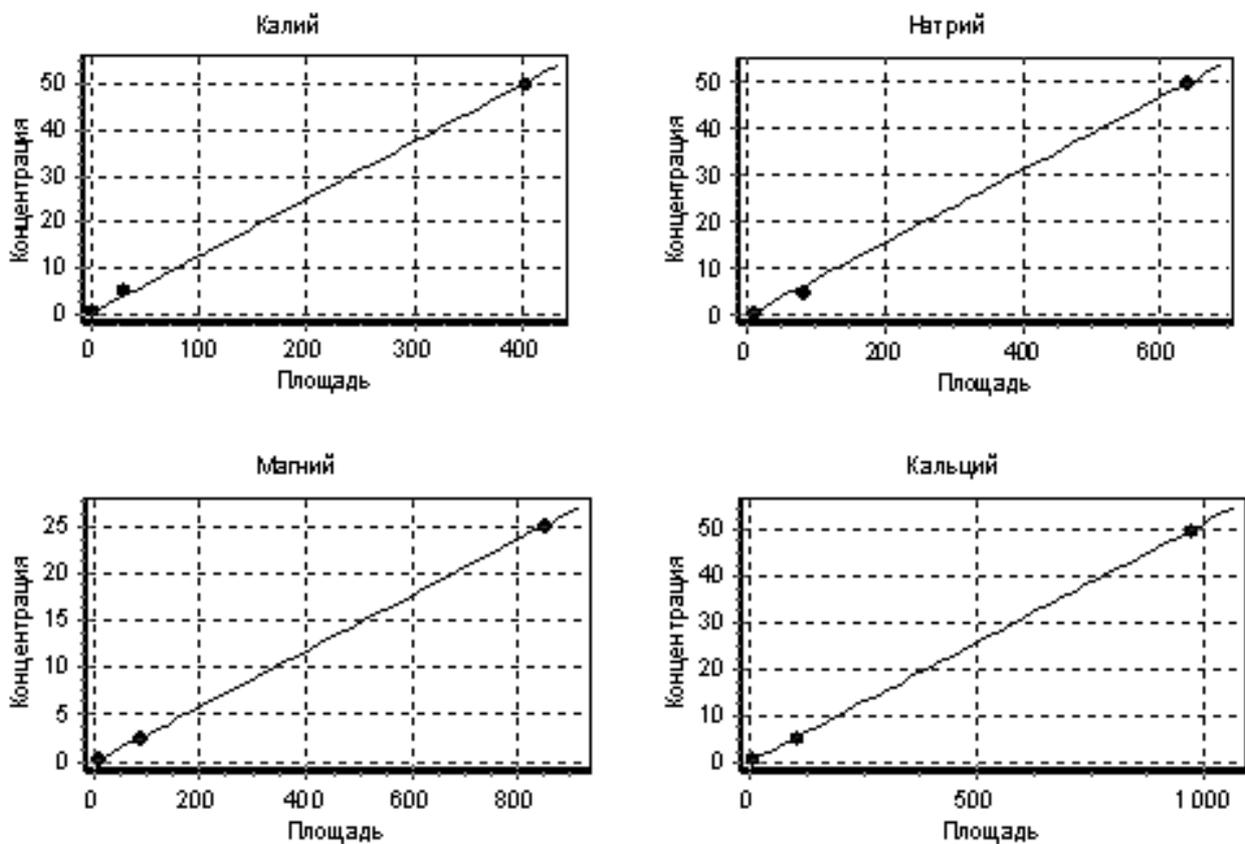


Рисунок 2. Градуировочные графики для анализа катионов.

На следующем этапе проведено определение минерального состава слюны человека методом капиллярного электрофореза. Типичная электрофореграмма слюны при анализе

катионов и анионов представлена на Рисунке 3 а, б. Определяемые анионы включают хлориды, нитриты и фосфаты (Рисунок 3 а), катионы — аммоний, калий, натрий, магний и кальций (Рисунок 3 б). Из представленных электрофореграмм видно, что для идентификации всех необходимых компонентов достаточно 6 минут в случае анализа анионов и 7 минут для катионов.

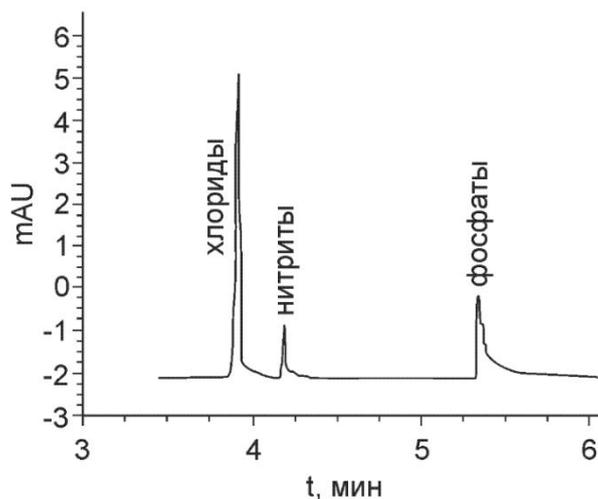


Рисунок 3 а. Электрофореграмма смеси анионов.

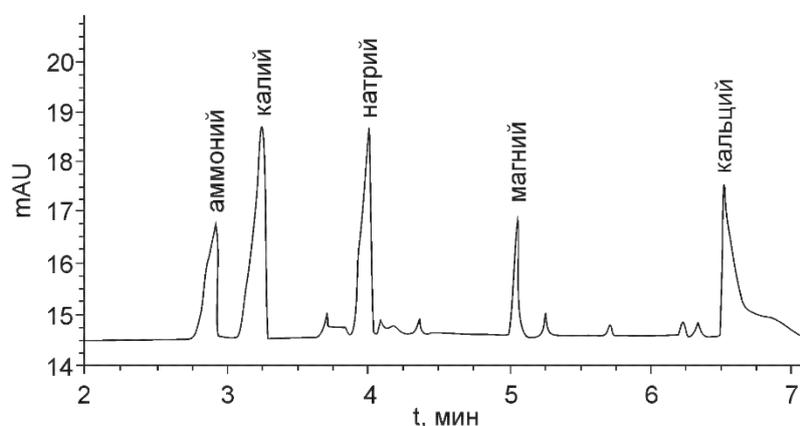


Рисунок 3 б. Электрофореграмма смеси катионов.

Для оценки сходимости результатов произведена запись электрофореграммы одного образца в 3–4 параллелях (Рисунок 4).

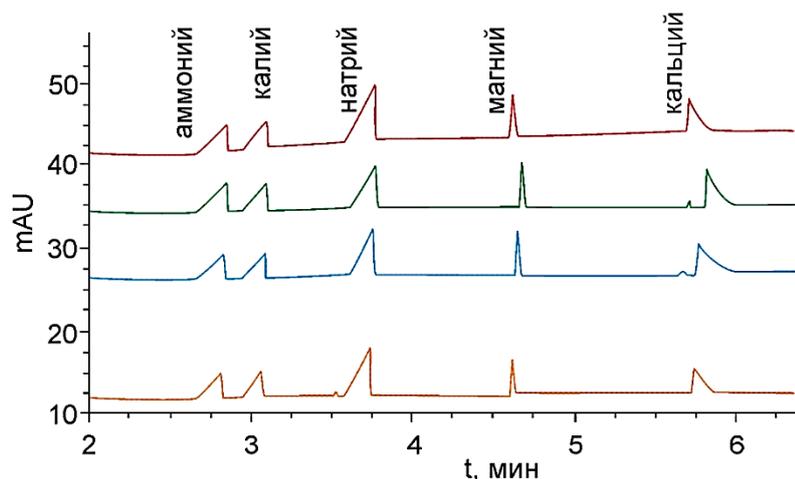


Рисунок 4 а. Электрофореграмма пробы слюны (разбавление в 20 раз) при определении катионов.

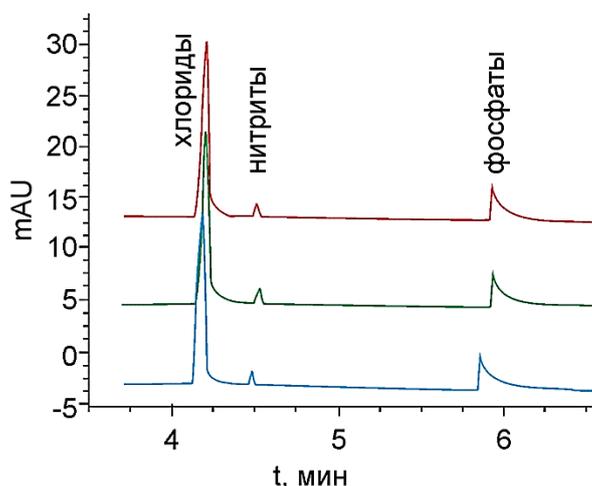


Рисунок 4 б. Электрофореграмма пробы слюны (разбавление в 20 раз) при определении анионов.

Показано, что времена выхода пиков, соответствующих отдельным компонентам исследуемых систем, являются достаточно стабильными характеристиками и могут быть использованы для идентификации соответствующих компонентов смеси (Таблица 1).

Таблица 1.

ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СРЕДНЕКВАДРАТИЧНОЕ ОТКЛОНЕНИЕ (СКО)

Относительное СКО	Время, мин	Высота, мАУ	Площадь, мАУ·тчк	Концентрация, мг/л
<i>Катионы:</i>				
Аммоний	0,3	4,3	10,0	10,0
Калий	0,3	4,5	6,8	6,8
Натрий	0,4	6,5	6,7	6,7
Магний	0,6	3,7	5,5	5,5
Кальций	0,8	4,9	9,6	9,6
<i>Анионы:</i>				
Хлориды	0,4	3,1	2,6	2,6
Нитриты	0,5	3,0	13,4	13,4
Фосфаты	0,7	2,2	1,2	1,2

Как видно из представленных результатов, среднеквадратичное отклонение при определении большинства ионов не превышает 10% (за исключением нитрит-ионов), что

свидетельствует об отсутствии значимой систематической погрешности в условиях проведения эксперимента.

Для проверки работоспособности выбранной методики было проведено исследование методом «введено–найдено», согласно которому в образец с заранее определенным содержанием компонента вводят добавку с точно известной концентрацией (использовали ГСО с концентрацией определяемых компонентов 1 мг/мл) [16], результаты приведены в Таблице 2.

Таблица 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНИОНОВ ПО МЕТОДУ «ВВЕДЕНО–НАЙДЕНО»

Компонент	Концентрация в исходном растворе, мг/л	Введено, мг/л	Найдено, мг/л	Δ , %
Хлориды	800,2±20,6	250 (1050,2)	1082	3,0
		750 (1550,2)	1517	2,1
		1250 (2050,2)	1976	3,6
		2500 (3300,2)	3267	1,0
Нитриты	42,9±5,8	50 (92,9)	90,58	2,5
		150 (192,9)	195,3	1,2
		250 (292,9)	307,1	4,8
		500 (542,9)	521,5	3,9
Нитраты	не обнаружены	100	108,9	8,9
		300	324,9	8,3
		500	525,0	5,0
		1000	1071	7,1
Фосфаты	185,2±2,3	50 (235,2)	239,8	2,0
		150 (335,2)	321,7	4,0
		250 (435,2)	429,6	1,3
		500 (685,2)	650,8	5,0

Показано, что при введении добавок увеличивается интенсивность пиков определяемых компонентов (Рисунок 5), что подтверждает их правильную идентификацию. Погрешность при определении концентрации анионов не превышает 5% для хлоридов, нитритов и фосфатов и 9% для нитратов. Поскольку исходная биологическая жидкость не содержит нитрат-ионы в количестве, соответствующем пределу обнаружения данного метода, то можно считать нецелесообразным внесение данных ионов в перечень определяемых компонентов. Аналогичные результаты получены для анализа катионов, в целом погрешность определения всех компонентов не превышает 5%.

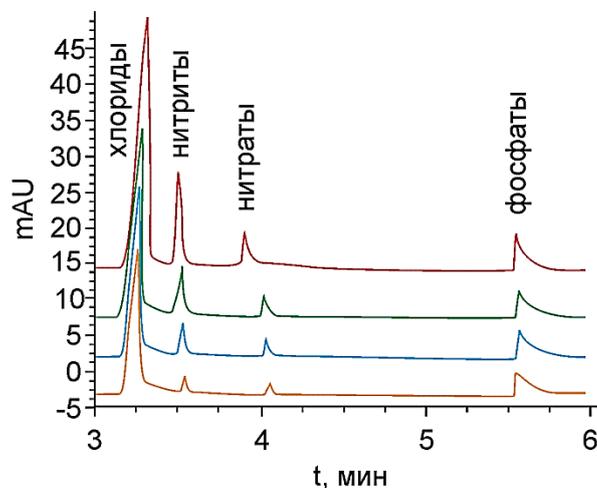


Рисунок 5. Электрофореграмма смеси анионов при введении добавок.

На следующем этапе исследования проведено сравнение результатов определения минерального состава слюны методом капиллярного электрофореза и стандартными биохимическими методами, адаптированными ранее для проведения анализа слюны человека [17, 18]. В исследовании приняли участие здоровые люди возрастной группы 18–22 года в количестве 100 человек (Таблица 3).

Таблица 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОПОСТАВЛЕНИЯ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА И СТАНДАРТНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА СЛЮНЫ

Параметр	Концентрация по методу капиллярного электрофореза, моль/л		Концентрация по биохимическим методикам, моль/л		$F_{\text{эксп}}$	$F_{\text{табл}}$
	Среднее значение	Дисперсия	Среднее значение	Дисперсия		
Кальций	1,46	0,019	1,39	0,042	2,21	6,40
Магний	0,392	0,0019	0,350	0,0045	2,37	
Натрий	30,9	15,5	30,36	41,6	2,68	
Калий	19,2	4,94	22,04	8,02	1,64	
Аммоний, мг/л	1,5	0,029	—			
Фосфаты	4,01	0,032	3,82	0,090	2,80	6,40
Хлориды	24,8	3,54	21,67	7,91	2,23	
Нитриты	53,5	13,5	58,4	8,96	1,51	
Нитраты	96,2	1,64	—			

Как видно из представленных данных, табличное значение критерия Фишера превышает экспериментальное для всех определяемых ионов (как катионов, так и анионов), это означает, различие между данными, определенными по предлагаемому методу, а также по стандартным биохимическим методикам, статистически недостоверно, и подтверждает правильность выполнения анализа.

Заключение

Показано, что метод капиллярного электрофореза можно использовать для замены рутинных методик биохимического анализа биологических жидкостей без существенной потери точности определения минерального состава. Подобраны необходимые условия проведения исследования методом капиллярного электрофореза, проведена проверка правильности и воспроизводимости методики.

Список литературы:

1. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Мир, 2004. 216 с.
2. Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине. М.: Мир, 2004. 272 с.
3. Ибрагимова М. Я., Сабирова Л. Я., Березкина Е. С. и др. Взаимосвязь дисбаланса макро- и микроэлементов и здоровье населения // Казанский медицинский журнал. 2011. Т. 92. №4. С. 606–609.
4. Deyl Z. et al. Biomedical application of capillary electrophoresis // Journal of chromatography B. 1994. V. 656. P. 3–27.
5. Mori M. et al. Capillary ion electrophoresis coupled contactless conductivity detection of inorganic cations in human saliva on a polyvinyl alcohol-coated capillary // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 402. №7. P. 2425–2430.
6. Mori M. et al. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol-coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte // Journal of chromatography B. 2012. V. 887–888. P. 1–7.

7. Luciano Vitali et al. A new method to determine biological sample volume by short and multiple injection capillary electrophoresis: application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva // Journal of chromatography A. 2011. V. 1218. P. 2327–2333.
8. Носков В. Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. №6. С. 14–17.
9. Каминская Л. А. Перспективы изучения биохимических показателей ротовой жидкости в лабораторной диагностике // Российская стоматология. 2010. №3. С. 36–42.
10. Chiappin S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation // Clinica Chimica Acta. 2007. V. 383. P. 30–40.
11. Marti-Alamo Silvia et al. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review // J. Clin. Exp. Dent. 2012. V. 4. №4. P. 237–243.
12. Gastagnola M. et al. Potential application of human saliva as diagnostic fluid // Acta Otorhinolaryngologica Italica. 2011. V. 31. P. 347–357.
13. Бельская Л. В., Сарф Е. А. Биохимические методы исследования в лабораторной диагностике: методические указания. Омск: ИНТЕХ, 2013. 78 с.
14. ПНД Ф 14.1:2:4.157-99. Методика выполнения измерений массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фосфат-ионов в пробах природных, питьевых и очищенных сточных вод с применением системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ», М., 1999.
15. ПНД Ф 14.1:2:4.167-2000. Методика измерений массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция в пробах питьевых, природных (в том числе минеральных) и сточных вод методом капиллярного электрофореза с применением системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ», М., 2000.
16. РМГ 61-2003 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки.
17. Бельская Л. В., Сарф Е. А., Косенок В. К. Биохимия слюны: методы исследования, методическое пособие. Омск: Омскбланкиздат, 2015. 70 с.
18. Бельская Л. В. Слюна как объект клинической лабораторной диагностики. Омск: Омскбланкиздат, 2015. 148 с.

References:

1. Skalny A. V. Khimicheskie elementy v fiziologii i ekologii cheloveka (Chemical elements in the human physiology and ecology). Moscow, Mir, 2004. 216 p. (In Russian).
2. Skalny A. V., Rudakov I. A. Bioelementy v meditsine (Bioelements in medicine). Moscow, Mir, 2004. 272 p. (In Russian).
3. Ibragimova M. Ya., Sabirova L. Ya., Berezkina E. S. et al. Vzaimosvyaz disbalansa makro- i mikroelementov i zdorove naseleniya (Relationship imbalance of macro- and micronutrients and health). Kazanskii meditsinskii zhurnal, 2011, v. 92, no. 4, pp. 606–609. (In Russian).
4. Deyl Z. et al. Biomedical application of capillary electrophoresis. Journal of chromatography B, 1994, v. 656, pp. 3–27.
5. Mori M. et al. Capillary ion electrophoresis coupled contactless conductivity detection of inorganic cations in human saliva on a polyvinyl alcohol-coated capillary. Anal Bioanal Chem, 2012, v. 402, no. 7, pp. 2425–2430.
6. Mori M. et al. Capillary ion electrophoresis of inorganic anions and uric acid in human saliva using a polyvinyl alcohol-coated capillary column and hexamethonium chloride as additive of background electrolyte. Journal of chromatography B, 2012, v. 887–888, pp. 1–7.
7. Luciano Vitali et al. A new method to determine biological sample volume by short and multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva. Journal of chromatography A, 2011, v. 1218, pp. 2327–2333.
8. Noskov V. B. Slyuna v klinicheskoi laboratornoi diagnostike (Saliva in clinical laboratory diagnostics). Klinicheskaya laboratornaya diagnostika, 2008, no. 6, pp. 14–17. (In Russian).

9. Kaminskaya L. A. Perspektivy izucheniya biokhimicheskikh pokazatelei rotovoi zhidkosti v laboratornoi diagnostike (Prospects for the study of biochemical indices of oral liquid in laboratory diagnostics). *Rossiiskaya stomatologiya*, 2010, no. 3, pp. 36–42. (In Russian).
10. Chiappin S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 2007, v. 383, pp. 30–40.
11. Marti–Alamo Silvia et al. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *J Clin Exp Dent*, 2012, v. 4, no. 4, pp. 237–243.
12. Gastagnola M. et al. Potential application of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 2011, v. 31, pp. 347–357.
13. Belskaya L. V., Sarf E. A. Biokhimicheskie metody issledovaniya v laboratornoi diagnostike (Biochemical research methods in laboratory diagnostics): guidance. Omsk, INTEKh, 2013, 78 p. (In Russian).
14. PND F 14.1:2:4.157–99. Metodika vypolneniya izmerenii massovykh kontsentratsii khlorid–ionov, nitrit–ionov, sulfat–ionov, nitrat–ionov, ftorid–ionov i fosfat–ionov v probakh prirodnykh, pitevykh i ochishchennykh stochnykh vod s primeneniem sistemy kapillyarnogo elektroforeza (Methods of measuring the mass concentration of chloride ions, nitrite ions, sulfate ions, nitrate ions, fluoride ions and phosphate ions in natural samples, drinking water and the effluent from capillary electrophoresis system using) “KAPEL”, Moscow, 1999. (In Russian).
15. PND F 14.1:2:4.167-2000. Metodika izmerenii massovoi kontsentratsii kationov ammoniya, kaliya, natriya, litiya, magniya, strontsiya, bariya i kaltsiya v probakh pitevykh, prirodnykh (v tom chisle mineralnykh) i stochnykh vod metodom kapillyarnogo elektroforeza s primeneniem sistemy kapillyarnogo elektroforeza (Methods of measuring the mass concentration of the cations ammonium, potassium, sodium, lithium, magnesium, strontium, barium and calcium in samples of drinking, natural (including minerals) and waste water by capillary electrophoresis using a capillary electrophoresis system) “KAPEL”, Moscow, 2000. (In Russian).
16. RMG 61-2003 GSI. Pokazateli tochnosti, pravilnosti, pretsizionnosti metodik kolichestvennogo khimicheskogo analiza. Metody otsenki (Indicators of precision, accuracy, precision of the quantitative chemical analysis techniques. Assessment methods). (In Russian).
17. Belskaya L. V., Sarf E. A., Kosenok V. K. Biokhimiya slyuny: metody issledovaniya (Biochemistry of saliva: research methods): handbook. Omsk, Omskblankizdat, 2015. 70 p. (In Russian).
18. Belskaya L. V. Slyuna kak obekt klinicheskoi laboratornoi diagnostiki (Saliva as an object of clinical laboratory diagnostics). Omsk, Omskblankizdat, 2015. 148 p. (In Russian).

*Работа поступила
в редакцию 23.01.2017 г.*

*Принята к публикации
26.01.2017 г.*

Ссылка для цитирования:

Бельская Л. В. Применение капиллярного электрофореза для определения минерального состава слюны человека // Бюллетень науки и практики. Электрон. журн. 2017. №2 (15). С. 132–140. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/belskaja-lv> (дата обращения 15.02.2017).

Cite as (APA):

Belskaya, L. (2017). Application of capillary electrophoresis to determine the mineral composition of human saliva. *Bulletin of Science and Practice*, (2), 132–140. Available at: <http://www.bulletennauki.com/belskaja-lv>, accessed 15.02.2017. (In Russian).