



Всемирная организация  
здравоохранения

Европейское региональное бюро



программа по  
окружающей среде

# Оценка пренатального воздействия ртути: стандартные операционные процедуры



# Резюме

Ртуть токсична для человека, поэтому вредное воздействие ее различных форм широко изучается. Биомониторинг человека признан наиболее эффективным инструментом оценки кумулятивного воздействия ртути на здоровье людей. Внутриутробное развитие – наиболее уязвимый период жизни с точки зрения долгосрочного вредного влияния ртути на формирование нервной системы. Характеристика пренатального воздействия ртути имеет решающее значение для изучения ее воздействия на здоровье населения, а также оценки пользы мер по его сокращению. Подходы к оценке воздействия ртути включают измерение ее уровней в различных биологических средах. Наличие ртути в тканях может быть показателем воздействия различных типов этого элемента. Достоверность, полезность и значение таких измерений зависят от формы воздействия ртути, типа анализа тканей и других факторов. Настоящий документ включает в себя стандартные операционные процедуры, которые необходимо выполнять при оценке содержания ртути в волосах, пуповинной крови и моче. Контроль качества играет предельно важную роль для получения надежных результатов. В документе также приводится информация об альтернативных методах, которые могут быть использованы для анализа ртути.

## Ключевые слова

Biomarkers – analysis

Mercury – analysis

Prenatal Exposure Delayed Effects – analysis

Maternal Exposure – adverse effects

Environmental Exposure

Запросы относительно публикаций Европейского регионального бюро ВОЗ следует направлять по адресу:

Отдел прессы

Европейское региональное бюро ВОЗ

UN City, Marmorvej 51

DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark

Кроме того, запросы на документацию, информацию по вопросам здравоохранения или разрешение на цитирование или перевод документов ВОЗ можно заполнить в онлайн-режиме на сайте Регионального бюро (<http://www.euro.who.int/pubrequest>).

Номер документа: WHO/EURO:2020-430-40165-56240

© Всемирная организация здравоохранения 2020 г.

Некоторые права защищены. Настоящая публикация распространяется на условиях лицензии Creative Commons 3.0 IGO «С указанием авторства – Некоммерческая – Распространение на тех же условиях» (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

Лицензией допускается копирование, распространение и адаптация публикации в некоммерческих целях с указанием библиографической ссылки согласно нижеприведенному образцу. Никакое использование публикации не означает одобрения ВОЗ какой-либо организации, товара или услуги. Использование логотипа ВОЗ не допускается. Распространение адаптированных вариантов публикации допускается на условиях указанной или эквивалентной лицензии Creative Commons. При переводе публикации на другие языки приводится библиографическая ссылка согласно нижеприведенному образцу и следующая оговорка: «Настоящий перевод не был выполнен Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). ВОЗ не несет ответственности за его содержание и точность. Аутентичным подлинным текстом является оригинальное издание на английском языке «Assessment of prenatal exposure to mercury: standard operating procedures. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2018».

Урегулирование споров, связанных с условиями лицензии, производится в соответствии с согласительным регламентом Всемирной организации интеллектуальной собственности.

**Образец библиографической ссылки:** Оценка пренатального воздействия ртути: стандартные операционные процедуры. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2020. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

**Данные каталогизации перед публикацией (CIP).** Данные CIP доступны по ссылке: <http://apps.who.int/iris/>.

**Приобретение, авторские права и лицензирование.** По вопросам приобретения публикаций ВОЗ см. <http://apps.who.int/bookorders>. По вопросам оформления заявок на коммерческое использование и направления запросов, касающихся права пользования и лицензирования, см. <http://www.who.int/about/licensing/>.

**Материалы третьих сторон.** Пользователь, желающий использовать в своих целях содержащиеся в настоящей публикации материалы, принадлежащие третьим сторонам, например таблицы, рисунки или изображения, должен установить, требуется ли для этого разрешение обладателя авторского права, и при необходимости получить такое разрешение. Ответственность за нарушение прав на содержащиеся в публикации материалы третьих сторон несет пользователь.

**Оговорки общего характера.** Используемые в настоящей публикации обозначения и приводимые в ней материалы не означают выражения мнения ВОЗ относительно правового статуса любой страны, территории, города или района или их органов власти или относительно делимитации границ. Штрихпунктирные линии на картах обозначают приблизительные границы, которые могут быть не полностью согласованы.

Упоминание определенных компаний или продукции определенных производителей не означает, что они одобрены или рекомендованы ВОЗ в отличие от аналогичных компаний или продукции, не названных в тексте. Названия патентованных изделий, исключая ошибки и пропуски в тексте, выделяются начальными прописными буквами.

ВОЗ приняты все разумные меры для проверки точности информации, содержащейся в настоящей публикации. Однако данные материалы публикуются без каких-либо прямых или косвенных гарантий. Ответственность за интерпретацию и использование материалов несет пользователь. ВОЗ не несет никакой ответственности за ущерб, связанный с использованием материалов.

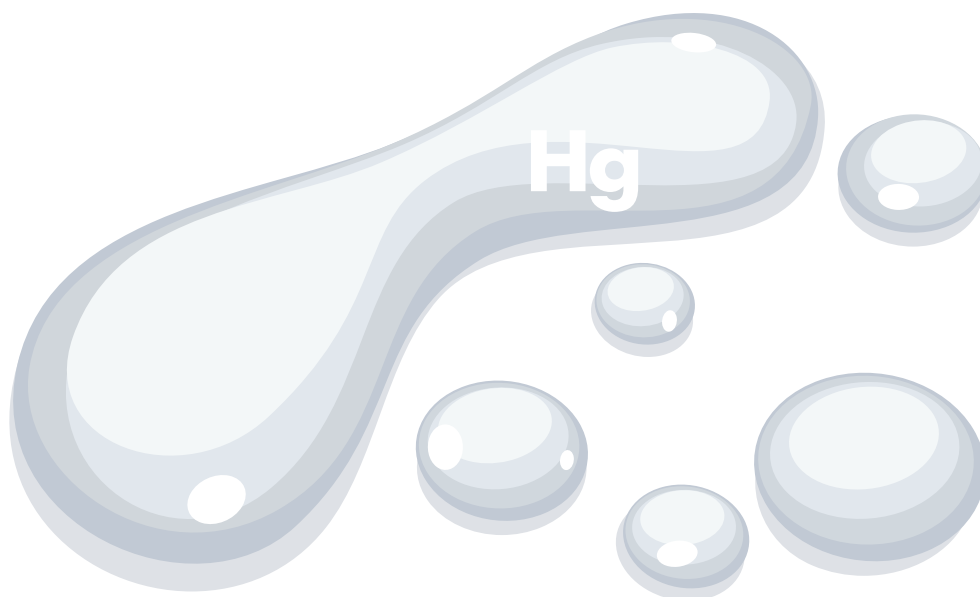
# Содержание

Выражение признательности.....	iv
Введение .....	1
Программа контроля качества оценки воздействия ртути на основе биомониторинга человека.....	2
Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в волосах человека.....	35
Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в пуповинной крови.....	73
Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в моче .....	100
Стандартные операционные процедуры для определения общей ртути в волосах, крови и моче альтернативным методом .....	138

## Выражение признательности

Стандартные операционные процедуры, используемые для оценки пренатального воздействия ртути, были сформулированы в рамках проекта «Development of a Plan for Global Monitoring of Human Exposure to and Environmental Concentrations of Mercury» [Разработка плана глобального мониторинга воздействия ртути на человека и ее концентрации в окружающей среде], финансируемого Глобальным экологическим фондом.

Европейское региональное бюро ВОЗ выражает глубокую признательность Программе Организации Объединенных Наций по окружающей среде за предоставленную техническую поддержку на всех этапах проведения проекта, начиная с его планирования, координации деятельности относительно его компонентов на стадии выполнения и заканчивая проведением заключительных обсуждений документов, разработанных в его рамках.



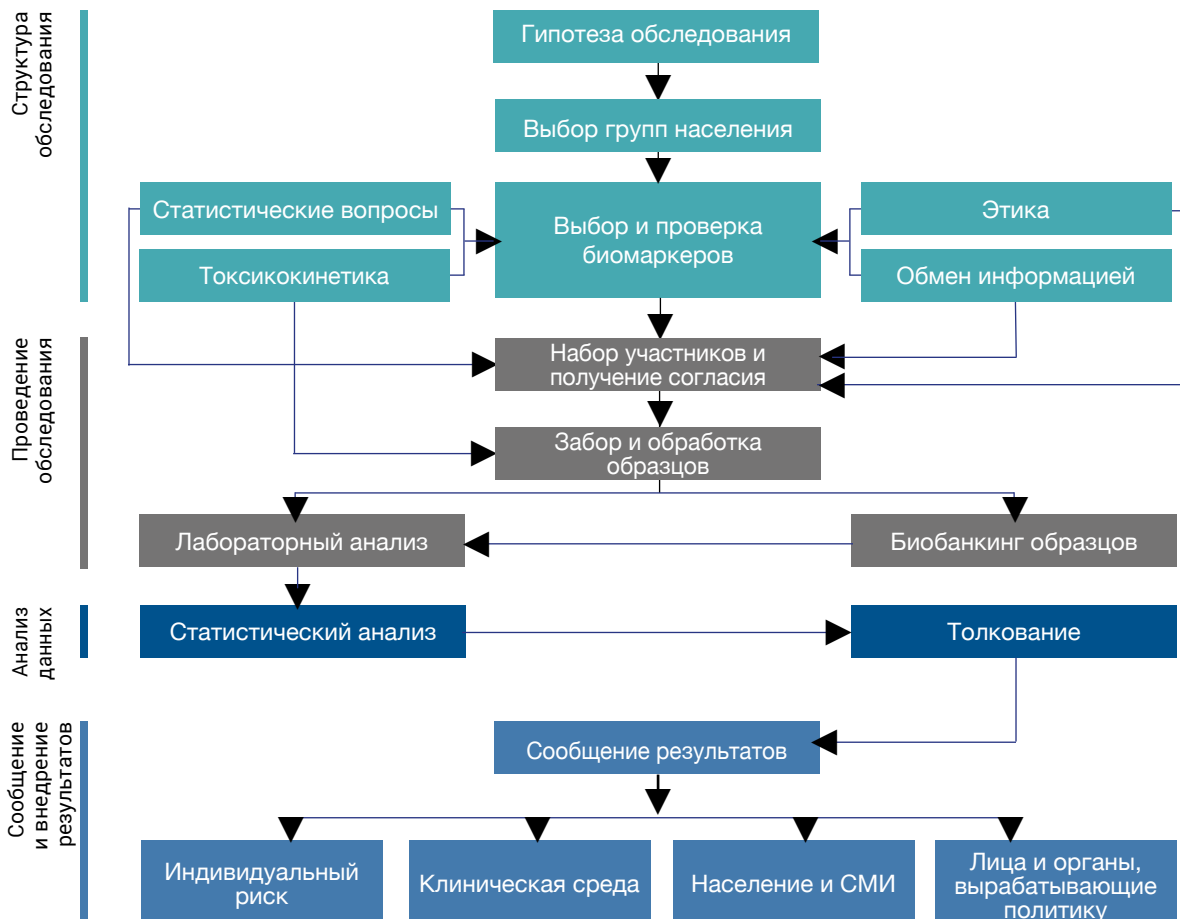
# Введение

Хотя биомониторинг человека (БМЧ) широко применяется для измерения воздействия вредных веществ на рабочем месте, его лишь недавно начали использовать для оценки воздействия загрязнителей окружающей среды в популяции в целом. Расширение сферы применения БМЧ в этой области за последние несколько лет было вызвано среди прочего различными инициативами, направленными на углубление понимания взаимосвязи между окружающей средой и здоровьем человека.

Признано, что БМЧ обладает значительным потенциалом в области здравоохранения, хотя недостаточный уровень гармонизации между различными обследованиями/программами БМЧ может существенно ограничить сравнение результатов, их глобальное толкование и последующее применение при разработке соответствующих стратегий. Поэтому предельно важно разработать унифицированную рамочную основу, позволяющую самым эффективным способом использовать данные, полученные в результате проведения обследований на основе БМЧ, таких как осуществляемые при поддержке Европейского союза проекты «Разработка согласованного подхода к биомониторингу человека в Европе» (ESBIO), Консорциум для проведения биомониторинга человека в европейском масштабе (COPHES) и однотипный проект по проверке осуществимости таких обследований DEMOCOPHES.

Организация обследований на основе БМЧ – комплексный процесс, в котором задействованы специалисты из различных областей знаний (эпидемиологи, химики-аналитики, токсикологи, статистики, медики и специалисты по вопросам обмена информацией), каждый из которых вносит свой вклад на конкретном этапе обследования. Вместе они помогают обеспечить взаимодействие между различными соответствующими дисциплинами (рис. 1).

Рис. 1. Этапы обследования на основе биомониторинга человека



Источник: National Research Council of the National Academies (1).

# Программа контроля качества оценки воздействия ртути на основе биомониторинга человека

## Резюме

Цель документа заключается в определении эффективной системы проведения мероприятий контроля качества, направленных на обеспечение надежности результатов оценки воздействия ртути на основе биомониторинга человека (БМЧ). Эти мероприятия посвящены преаналитической и аналитической фазам БМЧ. Описанные меры следует рассматривать как общие рекомендации, которые необходимо выполнять при планировании и реализации обследований на основе БМЧ на национальном, региональном и международном уровнях. Документ следует использовать вместе с соответствующими стандартными операционными процедурами для забора проб и их анализа на предмет содержания ртути в волосах, пуповинной крови и моче.

## Ключевые слова

Mercury – analysis  
Methylmercury Compounds – analysis  
Biomarkers - analysis  
Maternal exposure  
Maternal-Fetal Exchange  
Infant, Newborn  
Environmental Exposure  
Quality control  
Public health

## Авторы

Argelia Castaño Calvo  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания  
Marta Esteban López  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания  
Miguel Ángel Lucena  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания

# Содержание

<b>Условные сокращения</b> .....	<b>4</b>
<b>Введение</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Контроль качества на преаналитической фазе</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Контроль качества на аналитической фазе</b> .....	<b>9</b>
2.1. Внутренний контроль качества.....	9
2.1.1. Стандарты.....	9
2.1.2. Оборудование.....	10
2.1.3. Консервирование образцов.....	10
2.1.4. Подготовка градуировочных графиков.....	10
2.1.5. Анализ холостых проб.....	13
2.1.6. Дубликаты образцов.....	13
2.1.7. Средства контроля качества.....	14
2.2. Внешний контроль качества.....	15
2.2.1. Присвоение значения образцу.....	16
2.2.2. Определение стандартного отклонения для аттестационного тестирования $\sigma$ .....	16
2.2.3. Критерии выбора числа измерений, которые должны быть выполнены в каждой участвующей лаборатории.....	19
2.2.4. Процедура тестирования на однородность.....	19
2.2.5. Процедура тестирования стабильности.....	21
2.2.6. Инструкции для участников.....	21
2.2.7. Расчет статистических параметров, связанных с результатами аттестационного тестирования.....	22
2.2.8. z-оценка.....	22
2.2.9. Число $E_n$ .....	23
2.2.10. z'-оценка.....	23
2.2.11. Zeta-оценка ( $\zeta$ ).....	24
2.2.12. EZ-оценка.....	24
<b>3. Оценка уровня квалификации лаборатории</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Библиография</b> .....	<b>26</b>
<b>Приложение 1. Регистрация полученного образца</b> .....	<b>27</b>
<b>Приложение 2. Регистрация собранных образцов</b> .....	<b>28</b>
<b>Приложение 3. Самооценка компетентности лаборатории</b> .....	<b>29</b>

# Условные сокращения

БМЧ биомониторинг человека

ИД идентификационный (код)



## Введение

Как правило, меры контроля качества сосредоточены на аналитической фазе. Во всех лабораториях для гарантии надежности результатов во время анализа используются такие меры, как градуировочные графики, холостые и контрольные образцы. Однако меры контроля зачастую не принимаются на стадиях проведения БМЧ, что может быть не менее, а то и более важным с точки зрения контроля качества.

Необходимо отметить, что все меры предосторожности и контроля, принимаемые во время химического анализа, бесполезны, если образцы были загрязнены или видоизменены во время забора проб, транспортировки или обработки. В связи с этим, БМЧ должен начинаться еще до лаборатории; меры контроля качества должны охватывать все шаги, предшествующие аналитической фазе, особенно во время забора проб (материалы, сосуды, процедуры, документация), транспортировки (температура, требования по пересылке), предварительной обработки образцов (центрифугирование, экстракция), разделения на аликвоты и хранения. В дальнейшем этот контроль должен распространяться на процесс химического анализа, а затем и на процесс анализа данных путем применения контроля качества к создаваемым базам данных.

## 1. Контроль качества на преаналитической фазе

Преаналитическая фаза очень важна для обеспечения целостности образцов во всех обследованиях с использованием биологического материала. В целом два вида факторов могут привести к видоизменению образцов до того, как они будут проанализированы.

- Факторы, которые могут повлиять на образец, появляются до забора проб и являются специфическими для каждого биомаркера. Примерами факторов, которые могут изменить концентрацию биомаркера, могут служить биологический период полураспада химического вещества, употребление алкоголя, прием лекарств или индивидуальные привычки, такие как рацион питания. Поэтому эти вопросы необходимо принимать во внимание во время разработки структуры обследования при описании исследуемых групп населения, статистических вопросов, стратегий забора проб, набора участников обследования или выбора биомаркеров/биосред, а также во время толкования результатов.
- В случае воздействия посторонних факторов концентрация биомаркера изменяется после забора проб в результате, например, внешнего загрязнения, физических или химических изменений биомаркера при транспортировке или хранении, или таких изменений биосреды, как коагуляция или седиментация. Можно принять несколько мер предосторожности, чтобы избежать этих изменений и потенциального загрязнения во время забора проб, а также при транспортировке, обработке и хранении проб. Кроме того, в этом отношении весьма полезно обеспечить соответствующую подготовку работников на местах.

В обследованиях на основе БМЧ с участием предположительно неэкспонированной популяции, меры контроля на преаналитической фазе еще более важны, чем в других видах обследований с использованием биологических образцов, в связи с характеристиками таких обследований, в частности, с типами анализируемого вещества и диапазонами концентрации, которые обычно измеряются при БМЧ. Таким образом, при измерении химических веществ, находящихся

в окружающей среде, существует риск загрязнения образца в связи с присутствием этого химиката в окружающей среде. Это особенно важно в случае вездесущих химикатов, которые могут присутствовать даже в пробоотборном материале (2). Кроме того, поскольку воздействие химических веществ из окружающей среды происходит в низких концентрациях, их уровни в биологических средах также имеют тенденцию быть низкими, так что существует высокая вероятность влияния потенциального загрязнения на результаты анализа.

Поэтому предельно важно определить возможные источники загрязнения и избегать их. К их числу относятся:

- экзогенное загрязнение в месте забора проб;
- загрязнение оборудования или сосудов, используемых при заборе проб;
- загрязнение в результате абсорбции анализируемых компонентов в стенки используемого сосуда.

Необходимо определить факторы, которые могут повлиять на целевой биомаркер, и разработать стратегию забора проб с учетом этого. Наконец, информация, необходимая для обеспечения правильной интерпретации результатов, должна быть зафиксирована.

Несмотря на то, что для достижения оптимального контроля качества могут быть использованы различные инструменты, наиболее полезными, как правило, являются стандартные операционные процедуры (СОП). СОП — это четкое, краткое, всеобъемлющее и подробное пошаговое письменное описание процедуры забора проб или набора участников обследования или аналитического метода.

СОП можно применять на всех этапах обследования для предоставления основной информации, необходимой для обеспечения качества. СОП позволяют различным лабораториям/исследовательским группам получить результаты, поддающиеся сравнению. С учетом вышеизложенного, СОП для набора участников обследования и протокола набора должны разрабатываться вместе с СОП для забора проб, а также для транспортировки, обработки и хранения проб в целях контроля, насколько это возможно, всех факторов, которые могут повлиять на пробы на преаналитической фазе.

Другие меры контроля включают использование холостых проб во время проведения обследования на местах или повторный сбор образцов. Во время обследования на местах для оценки потенциального заражения проб во время их забора или транспортировки и до прибытия в лабораторию можно использовать разные виды холостых проб. Пустой сосуд или пробирку (из той же партии, что и остальной материал) можно считать холостой пробой сбора. Эти холостые пробы особенно полезны в тех случаях, когда предварительная экспертиза материала не проводилась, а также для выявления загрязнения окружающей среды. Холостые пробы также можно приготовить во время процесса разделения на аликвоты. С ними необходимо обращаться так, как если бы они были настоящими образцами, предназначенными для оценки потенциального загрязнения во время реального процесса.

Важно также обеспечить, чтобы собранная проба была репрезентативной и отражала состав оригинала. Поэтому все образцы должны быть гомогенизированы перед разделением на аликвоты. Проверочные списки необходимого материала или важных пунктов, подлежащих проверке, также являются эффективными инструментами контроля.

Особое внимание требуется уделять материалам, используемым для забора проб и хранения, т.к. были описаны случаи, когда материалы, из которых изготовлены сосуды или пробирки, оказывали влияние на целевое химическое вещество. Например, следует избегать использования стеклянных предметов при анализе металлов (3). Аналогичным образом, некоторые виды пластмассы могут увеличивать концентрацию биомаркеров, например, в случае бисфенола А или фталатов (2).

Контроль материалов для забора и хранения проб имеет решающее значение в БМЧ, поскольку, как отмечалось выше, измеренные концентрации обычно находятся в диапазоне частей на

миллион или частей на миллиард (или даже ниже), что означает, что минимальное фоновое загрязнение может существенно повлиять на конечные результаты. Для контроля этого потенциального источника ошибок могут быть разработаны следующие подходы.

- Необходимо провести предварительный скрининг пробоотборного материала, который заключается в проверке используемой партии пробирок или сосудов перед забором проб, чтобы убедиться, что фоновое загрязнение незначительно (ниже предела обнаружения) и не приведет к искажению окончательных результатов измерения. Эта мера предосторожности должна распространяться и на материалы для хранения.
- В некоторых ситуациях материалы для забора проб и хранения могут быть предварительно очищены, чтобы исключить любое потенциальное фоновое загрязнение. Например, сосуды, используемые для сбора мочи для анализа металлов, можно промыть разбавленным раствором азотной кислоты для удаления из них любых следов металла. Эффект такой предварительной обработки должен быть проверен путем анализа 5% предварительно обработанного материала.
- Можно использовать материалы, в которых, согласно результатам проверки, уровень концентрации целевого биомаркера ниже минимального. Некоторые коммерческие материалы снабжаются сертификатами, указывающими на отсутствие или минимальное содержание конкретного химического вещества. Например, существуют пробирки, специально предназначенные для анализа следовых металлов в образцах крови.

Время забора пробы на преаналитической фазе – это одна из критических контрольных точек (4). Для правильного забора проб требуются СОП с подробными пошаговыми инструкциями. Аналогичным образом, письменная запись каждого события, происходящего во время забора проб, и описание всех параметров, связанных с этим процессом (дата и время забора, объем, длина и цвет), также входят в число полезных мер контроля качества. Такие меры помогают определить перекрестное загрязнение образца (напр., образец мочи, загрязненный кровью в результате мацерации в процессе доставки). Кроме того, хорошо задокументированное обследование на местах облегчает обмен информацией и помогает избежать недоразумений и ошибок как среди работников на местах, так и между ними и лабораторным персоналом.

Наконец, должна быть гарантирована отслеживаемость проб, что требует точной идентификации образцов и связанных с ними документов (вопросник, персональные данные).

Поэтому необходимо проверить качество используемых этикеток, чтобы идентификационный (ИД) код оставался разборчивым независимо от температуры и влажности и, конечно же, чтобы этикетка не отклеивалась от пробирки, сосуда или документа.

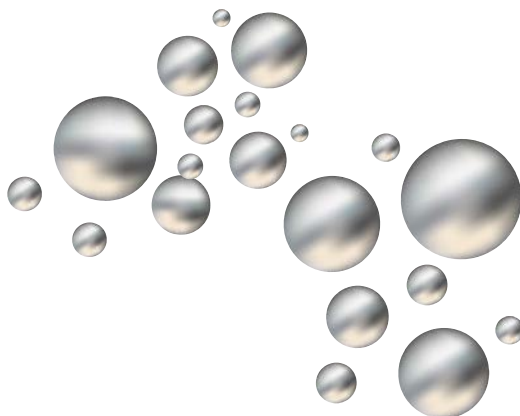
После забора проб собранные образцы должны транспортироваться в надлежащих для их сохранности условиях. Это еще одна критическая контрольная точка. Транспортировка в лабораторию должна осуществляться в соответствии с правилами транспортировки биологических материалов.

Заключительным шагом преаналитической фазы является отправка образцов на хранение (если таковое планируется), хотя не следует упускать из виду и предшествующий этап, а именно прием проб и проверка их соответствия критериям приемлемости/отбраковки. Хотя об этих аспектах иногда забывают, они также являются критическими контрольными точками.

При поступлении проб в лабораторию, необходимо проверить целостность упаковки и состояние пробоотборных пробирок и сосудов. Любая проблема, например, вскрытая или поврежденная упаковка или пролитая проба, должна быть задокументирована. Чтобы это было сделано правильно, рекомендуется составить протокол приема проб, в котором указываются подлежащие проверке единицы и фиксируются возникшие проблемы на отдельном листе регистрации проб (приложения 1 и 2).

Требования к перевозке образцов должны быть определены заранее, с тем чтобы установить критические контрольные точки, подлежащие проверке. Проверка должна начинаться с внешнего осмотра, т.е. сначала изучается состояние упаковки, затем ее вскрывают и продолжают процесс проверки внутреннего содержания. Если к биологическим образцам прилагаются вопросники или другие документы, то они также должны проверяться во время приема пробы с применением заранее определенных критериев приемлемости/отбраковки проб.

Хотя СОП – это основное вспомогательное средство проведения обследований, они не являются универсальным решением, поэтому необходимо обеспечить наличие хорошо обученного лабораторного персонала и работников на местах.



## 2. Контроль качества на аналитической фазе

С аналитической точки зрения важно создать программу гарантии/контроля качества для обеспечения надежности и сопоставимости результатов. Такие программы должны охватывать как основные меры по гарантии/контролю качества, обычно применяемые в аналитических лабораториях, так и внешние меры по обеспечению сопоставимости и качества результатов.

Внутренний контроль качества является одним из основных инструментов аналитических лабораторий, поскольку он имеет важное значение для гармонизации контрольной деятельности, а также СОП, используемых для получения лабораторных результатов. Поэтому деятельность по контролю качества должна быть одним из основополагающих моментов, описанных в рабочей процедуре, а критерии допустимости должны быть четко установлены до проведения любых анализов.

При совершенствовании этого метода необходимо учитывать, что холостые контрольные пробы, контрольные пробы повторяемости, воспроизводимости или достоверности — это параметры, которые необходимо рассматривать при оценке эффективности метода. Внешние результаты не должны сообщаться при отсутствии правильных результатов внутреннего контроля качества, связанного с анализом и подтверждением лабораторией соответствия этим требованиям.

Настоящая процедура касается эффективности контроля качества, связанного с инструментальными методами, как правило, методами, основанными на подготовке рабочих графиков, на которые могут быть интерполированы результаты анализа тестовых образцов.

Межлабораторные сличения могут рассматриваться как метод измерения уровня оснащенности лаборатории. Чтобы получить достаточно информации об эффективности работы лаборатории необходимо проанализировать как минимум три раунда операций: до начала, во время и после проведения анализа испытуемых образцов. Таким образом, можно оценить точность результатов участников и гарантировать валидность обследования.

Участие в каждом из этих раундов должно оцениваться в соответствии с установленными критериями. Неудовлетворительные результаты в некоторых раундах должны быть изучены, а возможные причины неправильного функционирования устранены. В этом отношении межлабораторные сличительные испытания могут использоваться для демонстрации надлежащей работы одних лабораторий по сравнению с другими.

### 2.1. Внутренний контроль качества

#### 2.1.1 Стандарты

Внутренний контроль качества следует проводить с применением сертифицированных стандартов, если таковые имеются. Сертификация стандартов необходима для того, чтобы можно было проследить их соответствие с международными стандартами. Кроме того, в них должна указываться связанная с ними погрешность, чтобы можно было оценить доверительные интервалы и позволить лаборатории определить степень точности результатов.

Любое отхождение от этих стандартов (например, разбавление образца для получения более низких концентраций номинального значения) означает, что лаборатория должна вычислить новый показатель погрешности на основе исходной погрешности стандарта и всех составляющих элементов, связанных с объемметрическим оборудованием, которое было использовано в процессе подготовки. Если аналитический метод был должным образом подтвержден, то эти погрешности были учтены и, следовательно, включены в число определенных допустимых отклонений валидации.

## 2.1.2. Оборудование

Оборудование, которое может повлиять на результат анализа, должно быть откалибровано. В связи с этим в лабораториях заранее должны быть определены допустимые отклонения от стандартных параметров, которые могут быть использованы для принятия или отбраковки результатов этих калибровок.

При работе с объемметрическим оборудованием необходимо достичь допустимых отклонений, установленных для соответствующего класса оборудования, хотя, как правило, должен использоваться только объемметрический материал класса А.

Весы повышенной точности должны быть использованы для взвешивания стандартов или образцов при необходимости. Например, при анализе волос следует взвешивать не менее 30 мг стандартных или испытуемых образцов, если весы имеют разрешение до 0,1 мг (весы с четырьмя цифрами после запятой в десятичной дроби). Если в лаборатории есть весы с пятью знаками после запятой, их следует использовать для взвешивания не менее 3 мг. Измерения веса ниже этих значений может быть неточным, что может повлиять на степень погрешности конечного результата или увеличить погрешность анализа.

## 2.1.3. Консервирование образцов

Сохранение образцов имеет решающее значение для получения достоверных результатов. В лаборатории должны быть прописаны процедуры, необходимые для предотвращения деградации или загрязнения образцов. Должны быть определены условия хранения (температура, количество света, герметичность, влажность и время хранения).

Образцы мочи или крови должны храниться в охлажденном виде ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в темноте, в герметичном контейнере (не пропускающем воздух и воду) до проведения анализа. Образцы волос можно хранить при комнатной температуре, но необходимо следить, чтобы они не подвергались воздействию влаги.

В лабораториях должны обеспечиваться такие условия, в которых загрязнение образцов будет невозможно. Любые действия с образцами должны проводиться в чистом пространстве. Хорошее представление о чистоте процесса можно получить при измерении холостых образцов, с которыми необходимо обращаться так же, как и с обычными образцами.

## 2.1.4. Подготовка градуировочных графиков

Лаборатория должна составлять градуировочный график как минимум раз в три месяца и использовать его до тех пор, пока не будет подготовлен следующий. Необходимо готовить графики как минимум с пятью точками. Диапазон графика должен покрывать ожидаемые значения для всех образцов или, по крайней мере, для подавляющего большинства из них.

Если в лаборатории есть валидация метода, в которой были получены связанные с графиком параметры и допустимые от них отклонения, то рабочий градуировочный график должен соответствовать полученным критериям приемлемости.

Если валидация метода отсутствует, лаборатория должна заранее установить критерии приемлемости как минимум по двум из следующих параметров: коэффициент регрессии, коэффициент линейности и наклон.

### Коэффициент регрессии

Коэффициент регрессии ( $r$ ) — это способ определить долю общей изменчивости зависимой переменной ( $y$ ) по отношению к ее среднему значению при помощи модели регрессии. Этот параметр является оптимальной мерой измерения критерия адекватности кривой регрессии.

Коэффициент регрессии считается адекватным, если он выше указанного в таблице 1 допустимого уровня доверия при соответствующих степенях свободы. Обычно доверительный интервал в 95% принимается как адекватный. Этот интервал соответствует столбцу со значением 0,05.  $N$  — это число точек, использованных при построении графика.

Таблица 1. Критические значения  $r$  Пирсона в одностороннем тесте в соответствии со степенями свободы (N-2)

N-2	0,05	0,025	0,01	0,005
1	0,988	0,997	0,9995	0,9999
2	0,900	0,950	0,980	0,990
3	0,805	0,878	0,934	0,959
4	0,729	0,811	0,882	0,917
5	0,669	0,754	0,833	0,874
6	0,622	0,707	0,789	0,834
7	0,582	0,666	0,750	0,798
8	0,549	0,632	0,716	0,765
9	0,521	0,602	0,685	0,735
10	0,497	0,576	0,658	0,708
11	0,476	0,553	0,634	0,684
12	0,458	0,532	0,612	0,661
13	0,441	0,514	0,592	0,641
14	0,426	0,497	0,574	0,623
15	0,412	0,482	0,558	0,606
16	0,400	0,468	0,542	0,590
17	0,389	0,456	0,528	0,575
18	0,378	0,444	0,516	0,561
19	0,369	0,433	0,503	0,549
20	0,360	0,423	0,492	0,537
21	0,352	0,413	0,482	0,526
22	0,344	0,404	0,472	0,515
23	0,337	0,396	0,462	0,505
24	0,330	0,388	0,453	0,496
25	0,323	0,381	0,445	0,487
26	0,317	0,374	0,437	0,479
27	0,311	0,367	0,430	0,471
28	0,306	0,361	0,423	0,463
29	0,301	0,355	0,416	0,456
30	0,296	0,349	0,409	0,449
35	0,275	0,325	0,381	0,418
40	0,257	0,304	0,358	0,393
45	0,243	0,288	0,338	0,372
50	0,231	0,273	0,322	0,354
60	0,211	0,250	0,295	0,325
70	0,195	0,232	0,274	0,302
80	0,183	0,217	0,256	0,283
90	0,173	0,205	0,242	0,267
100	0,164	0,195	0,230	0,254

Источник: Valencia University (5).

## Коэффициент линейности

Коэффициент линейности ( $Cm$ ) — это мера измерения степени соответствия прямой линии

$$Cm = \left(1 - \frac{Sm}{m}\right) 100$$

где

$Sm$  - отклонение наклона, а  $m$  - наклон.

Если имеются исторические значения коэффициента линейности, то критерии приемлемости должны быть установлены как среднее значений  $\overline{Cm}$  для ряда имеющихся кривых минус  $t_{Student}$  умноженное на стандартное отклонение для этих значений  $Cm$   $SD_{\overline{Cm}}$  (нижняя граница) и 100 (верхняя граница) ( $t_{Student}$  получено из числа используемых значений).

$$\overline{Cm} - (t_{student} \times SD_{\overline{Cm}}) \leq Cm_{current} \leq 100$$

- При отсутствии исторических значений и использовании хроматографических методов анализа значение  $Cm$  должно превышать 0,97, чтобы быть приемлемым. При применении нехроматографических методов значение  $Cm$  должно превышать 0,95.

## Наклон

Наклон — это тангенс угла между прямой и положительным направлением оси X, при помощи которого можно оценить степень чувствительности полученного ответа.

- При наличии исторических значений для наклона следует установить критерий приемлемости как среднее значение наклонов для серии имеющихся кривых минус  $t_{Student}$ , умноженное на стандартное отклонение этих наклонов (нижняя граница), и среднее значение наклонов для серии имеющихся кривых плюс  $t_{Student}$ , умноженное на стандартное отклонение для этих наклонов (верхняя граница) ( $t_{Student}$  получено из числа используемых значений).

$$\overline{Slope} - (t_{student} \times SD_{\overline{Slope}}) \leq Slope_{current} \leq \overline{Slope} + (t_{student} \times SD_{\overline{Slope}})$$

## Элементы контроля качества точек на градуировочном графике

Градуировочный график может быть использован в течение трех месяцев вместо ежедневного рабочего графика. Для ежедневных измерений в течение этого периода необходимо проверять как минимум две точки на графике (одна в нижнем и другая в верхнем диапазоне) перед запуском рабочей серии.

- Если есть валидация метода, то результат, полученный для этих элементов контроля качества графика, должен находиться между допустимыми значениями, полученными при валидации соответствующей точки.
- Если история наклона доступна, но нет валидации метода, то полученный результат должен лежать в диапазоне

$$X_{point} \pm (t_{Student} \times SD_{point})$$

где

$X_{point}$  — среднее значение, полученное при считывании точки

$SD_{point}$  — стандартное отклонение значений, полученных при считывании точки

$t_{Student}$  — число значений, используемых для получения  $SD_{point}$



- Если оценка воспроизводимости доступна, но нет истории наклонов, то полученный результат должен лежать в диапазоне

$$V_{\text{point}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{repro}})$$

где

$V_{\text{point}}$  – значение, полученное для контрольной точки на графике

$SD_{\text{repro}}$  – предполагаемое стандартное отклонение воспроизводимости

$t_{\text{Student}}$  – число значений, используемых для получения  $SD_{\text{repro}}$ .

### 2.1.5. Анализ холостых проб

Перед началом ежедневных серий анализов необходимо провести анализ исходной холостой пробы.

Если имеется валидация метода, результат анализа холостой пробы, должен быть ниже значений, полученных для предела обнаружения во время валидации.

Если имеются исторические показания для холостых проб, но отсутствует методика валидации, то критерием приемлемости холостой пробы является то, что полученный сигнал не должен превышать среднее значение для серии холостых проб более чем в три раза стандартного отклонения для этих значений.

Если имеется серия измерений для образцов с очень низкой концентрацией интересующего анализируемого вещества, но нет исторических показаний для холостых проб, критерием приемлемости холостой пробы является то, что полученный сигнал не должен превышать трехкратного стандартного отклонения, полученного для образцов с очень низкой концентрацией вещества.

Если первое измерение холостого образца не соответствует критериям приемлемости, систему необходимо очистить. После очистки должно быть произведено измерение нового холостого образца. Этот процесс должен повторяться до тех пор, пока не будет получено приемлемое значение. После получения такого приемлемого значения необходимо провести повторное тестирование холостого образца для подтверждения достоверности результата. Следовательно, если после измерения исходного холостого образца приемлемое значение не получено, необходимо получить два последовательных измерения, соответствующих критериям приемлемости, чтобы иметь возможность приступить к плановому тестированию.

Холостую пробу необходимо измерять через каждые пять образцов с использованием тех же критериев, что и для исходных холостых проб.

Если программа тестирования для серий образцов составляется автоматически и результаты сопоставляются в конце серий, то для обеспечения правильности показаний может потребоваться увеличить число повторений тестирования холостых проб (например, три последовательных повтора вместо одного).

После завершения анализа серии образцов для обеспечения чистоты системы необходимо провести ряд повторных измерений холостых проб (например, три повтора).

### 2.1.6. Дубликаты образцов

Анализ одного из 10 образцов должен быть повторен в разное время измерения серии. Если образец анализируется в двух или трех экземплярах, то повторение должно состоять из повторного анализа двух или трех экземпляров. Необходимо сравнивать результаты.

- При наличии валидации метода результаты должны соответствовать критериям воспроизводимости, полученным во время валидации.

- Если такая методика отсутствует, необходимо применять индекс совместимости:

$$IC = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{(2SD_1)^2 + (2SD_2)^2}}$$

Источник: ISO/IEC Guide 43-1:2007

где

$x_1$  и  $x_2$  – средние значения, полученные для каждого повторного экземпляра образца;  
 $SD_1$  и  $SD_2$  – стандартные отклонения, полученные для дубликатов, триплекатов (или более) для каждого повторного экземпляра.

- Если образец повторяется с использованием анализа одного экземпляра, а не дубликата или триплеката, то для признания результата приемлемым должно быть установлено максимальное отклонение для каждой из выборок по отношению к среднему значению (например, максимум 10% от среднего значения).

### 2.1.7. Средства контроля качества

В лаборатории должен проводиться контроль качества как минимум по четырем точкам в тестовом диапазоне: высокий, средний, низкий и предел количественного определения. Эти тестовые контрольные точки должны отличаться от контрольных точек графика.

Одно из средств контроля качества необходимо случайным образом вставить через каждые пять образцов, чтобы убедиться в том, что все они были в достаточной степени проанализированы в рамках работы лаборатории. В любом случае, если значения для всех анализируемых образцов попадают в очень узкий диапазон, операции по контролю качества можно повторить в точке, наиболее близкой к этому диапазону.

- При наличии валидации метода результаты должны соответствовать критериям для точек контроля качества, полученных в ходе валидации.
- Если имеется история результатов, связанных с различными контрольными точками, но нет валидации метода, то критерием приемлемости является то, что значение средства контроля качества должно находиться в пределах диапазона

$$X_{\text{point}} \pm (t_{\text{Student}} \times SD_{\text{point}})$$

где

$X_{\text{point}}$  – среднее значение, полученное при считывании контрольной точки;  
 $SD_{\text{point}}$  – стандартное отклонение значений, полученных при считывании контрольной точки;  
 $t_{\text{Student}}$  – число используемых значений.

- При отсутствии истории результатов необходимо установить максимальное отклонение для каждого образца по отношению к среднему значению (например, максимум 10% от среднего значения), чтобы результат считался приемлемым.

### Слепые образцы

Тестирование слепых образцов в лаборатории должно проводиться не реже 1 раза в год. Для этого ведущий специалист должен подготовить пробы известной концентрации (для него, но не для лаборатории) для анализа. Этот «слепой» образец должен быть подготовлен с использованием сертифицированных стандартов, остатков сопоставительных проб или хорошо описанных образцов.

- При наличии валидации метода, реальное значение образца должно находиться в пределах диапазона

$$V_{\text{SBlind}} \pm I_{\text{test}}$$

где

$V_{SBlind}$  – значение, полученное при анализе слепого образца;

$I_{test}$  – расширенная погрешность, полученная при валидации метода.

- Если для этого метода были определены значения воспроизводимости, но отсутствует валидация метода, то реальное значение для образца должно находиться в диапазоне

$$V_{SBlind} \pm (t_{Student} \times SD_{repro})$$

где

$V_{SBlind}$  – значение, полученное при анализе слепого образца;

$SD_{Repro}$  – значение, полученное для стандартного отклонения воспроизводимости;

$t_{Student}$  – число значений, используемых для получения  $S_{Drepro}$ .

- Если других значений нет, то необходимо установить максимальное отклонение по отношению к реальному значению, чтобы принять результат. Это отклонение можно установить при помощи литературных источников или опыта лаборатории, использующей аналогичные методы или аналиты.

## 2.2. Внешний контроль качества

Межлабораторные сличительные испытания<sup>1</sup> широко используются в различных целях в национальном, региональном и глобальном масштабах. Вот некоторые примеры типичных целей проведения таких испытаний:

- оценка эффективности работы лабораторий в отношении проведения конкретных тестов или измерений и мониторинг эффективности работы лабораторий с течением времени;
- выявление проблем в лабораториях и инициирование усовершенствований, которые, например, могут быть связаны с ненадлежащими процедурами тестирования или измерений, неэффективной подготовкой персонала и контролем или калибровкой оборудования;
- установление эффективности и сопоставимости методов тестирования или измерений;
- укрепление доверия клиентов лабораторий;
- выявление различий между лабораториями;
- инструктаж участвующих лабораторий на основе результатов таких сравнений;
- валидация заявленных оценок погрешности;
- оценка рабочих характеристик метода;
- присвоение значений референтным материалам и оценка их пригодности для использования в конкретных тестовых или измерительных процедурах;
- подтверждение заявлений об эквивалентности измерений национальных институтов метрологии путем проведения ключевых и дополнительных сличений по поручению Международного бюро мер и весов и дочерних метрологических ассоциаций.

Описанные ниже процедуры в основном применимы к лабораториям, проводящим сличительные исследования, в частности, к референтным лабораториям на национальном уровне. Они также полностью применимы к участникам межлабораторных сличительных испытаний.<sup>2</sup>

Аттестационные тесты<sup>3</sup> включают использование межлабораторных сравнений для определения эффективности работы лабораторий, как указано в пунктах (i)-(vii). Аттестационные тесты, как

<sup>1</sup> Межлабораторное сличительное испытание: организация, проведение и оценка измерений с использованием одних и тех же или аналогичных предметов двумя или более лабораториями в соответствии с заранее определенными условиями.

<sup>2</sup> Участник: лаборатория, организация или лицо, получающее предметы аттестационного тестирования и предоставляющее результаты для рассмотрения организатором аттестационного тестирования.

<sup>3</sup> Аттестационное тестирование: оценка результатов работы участников по ранее установленным критериям путем проведения межлабораторных сравнений.

правило, не имеют отношения к целям (viii), (ix) и (x), поскольку предполагается, что лаборатории компетентны в этих вопросах. Однако они могут использоваться для независимого подтверждения компетентности лаборатории.

Шаги, предшествующие межлабораторным сравнениям:

- присвоение значения образцу;
- определение параметра стандартного отклонения для аттестационного теста, который впоследствии будет использован для расчетов в данном тестировании;
- определение числа повторений, выполняемых каждым участником;
- подтверждение валидности анализируемого образца с помощью тестов на гомогенность и стабильность. Эти параметры должны быть рассчитаны организатором тестирования.

Перед отправкой образцов различным участникам организатор должен подготовить подробные и хорошо задокументированные инструкции.

Очевидно, что организатор должен проанализировать сколько образцов необходимо для проведения тестирования, принимая во внимание число участников, тесты на однородность и стабильность, которые необходимо выполнить, а также возможность повторения, потери или повреждения образцов на стадии транспортировки. Поэтому следует предусмотреть наличие большего числа образцов, чем число, строго необходимое для тестирования.

### 2.2.1. Присвоение значения образцу

Критерии, используемые для получения значения, с которым будут сравниваться представленные лабораториями результаты, должны быть определены до проведения тестирования. Эти критерии перечислены ниже.

- Значение для сертифицированного референтного материала или образца с добавками получается, когда:
  - для аттестационного тестирования используется образец сертифицированного референтного материала; при этом должны быть известны значение свойства и степень погрешности в отношении этого значения; или
  - используется необработанный образец с добавлением определенного количества тестируемого вещества; вещество может добавляться организатором или участвующей лабораторией с использованием концентрированных растворов, поставляемых организатором.
- Полученный результат представляет собой среднее значение, полученное группой экспертных лабораторий, которые протестировали образец или образцы с использованием ранее принятых методов, которые можно считать «абсолютными» или «референтными». Нетипичные результаты должны быть исключены до расчета среднего значения.
- Результат получается в виде среднего значения, вычисленного группой лабораторий-участников после исключения нетипичных значений, или как среднее значение, полученное с помощью надежных статистических методов (таких как алгоритм А; см. ниже). Это более рискованный метод в системах взаимного сличения со свободным доступом, так как на среднее значение могут повлиять ошибочные данные, что означает, что устранение отклонений должно быть максимально эффективным.

### 2.2.2. Определение стандартного отклонения для аттестационного тестирования $\sigma^4$

Имеются различные варианты присвоения значения стандартного отклонения для аттестационного тестирования.

<sup>4</sup> Стандартное отклонение для аттестационной оценки: измерение дисперсии, используемой для оценки результатов аттестационного теста на основе имеющейся информации.

## Заданное значение

Стандартное отклонение для аттестационного тестирования может быть присвоено на основе соответствия стандартным значениям. Преимущество данного метода заключается в том, что он наилучшим образом представляет его цель.

## Воспринимаемая ценность

Стандартное отклонение для аттестационного тестирования может быть установлено на основании предыдущего опыта координатора и его/ее сотрудников с использованием значений, полученных в прошлом.

Если стандартное отклонение для аттестационного тестирования ( $\hat{\sigma}$ ) получено по предписанию или по восприятию, существует вероятность того, что выбранная величина не является реалистичной с точки зрения воспроизводимости метода измерения. Таким образом, следующий тест может быть применен для обеспечения того, чтобы значение

$\hat{\sigma}$  соответствовало значениям повторяемости и воспроизводимости, полученным с помощью этого метода, если

$\hat{\sigma}_R$  – стандартное отклонение воспроизводимости,

$\hat{\sigma}_r$  – стандартное отклонение повторяемости.

Межлабораторное стандартное отклонение рассчитывается как:

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

Значение фактора  $\phi$  в дальнейшем вычисляется путем подстановки значений  $\sigma_L$  и  $\sigma_r$  и значения, выбранного для  $\hat{\sigma}$  в следующем уравнении:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{(\phi \times \sigma_L)^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

где

$n$  — это число параллельных измерений, которое выполнит каждая лаборатория.

Если полученное для  $\phi$  значение меньше 0,5, то выбранное для  $\hat{\sigma}$  значение соответствует такой степени воспроизводимости, которую на практике лаборатории не смогут обеспечить, и в этом случае это значение придется увеличить.

## Значение, основанное на общей модели

Значение стандартного отклонения для аттестационного тестирования можно вывести из значения воспроизводимости, полученного для данного метода измерения.

Например, Горовиц предложил следующую модель для оценки стандартного отклонения воспроизводимости с использованием концентрации:

$$\sigma_R = 0,02 c^{0,8495}$$

где  $c$  – концентрация меры, определяемая в процентах (массовая доля).

## Значение, основанное на результатах повторяемости и воспроизводимости

При наличии значений для стандартных отклонений воспроизводимости и повторяемости, стандартное отклонение для аттестационного тестирования можно получить следующим образом:

$\sigma_R$  – стандартное отклонение воспроизводимости,

$\sigma_r$  – стандартное отклонение повторяемости.

Лабораторное стандартное отклонение рассчитывается как:

$$\sigma_L = \sqrt{\sigma_R^2 - \sigma_r^2}$$

Значение  $\hat{\sigma}$  рассчитывается как:

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\sigma_L^2 + \left(\frac{\sigma_r^2}{n}\right)}$$

где

$n$  — это число параллельных измерений, которое выполнит каждая лаборатория.

### Значение, основанное на данных, полученных в раунде аттестационного тестирования

Значение стандартного отклонения для аттестационного тестирования можно вывести из значения, полученного по результатам, представленным участниками данного раунда тестирования. Значение стандартного отклонения должно представлять собой робастное стандартное отклонение для результатов, о которых сообщили все участники, рассчитанное с использованием алгоритма А.

Расположите данные  $p$  в порядке возрастания:  $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$

Расположите робастные средние и робастные стандартные отклонения ( $x^*$  и  $s^*$ ) для этих данных.

Исходные значения для  $x^*$  и  $s^*$ :

$x^* =$  медиана  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, p$ )

$s^* = 1,483$  медиана  $|x_i - x^*|$  ( $i = 1, 2, \dots, p$ )

Обновите значения  $x^*$  и  $s^*$  следующим образом. Рассчитайте:

$$d = 1,5 s^*$$

Для каждого  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, p$ ) рассчитайте:

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta, & \text{если } x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta, & \text{если } x_i > x^* + \delta \\ x_i, & \text{другие случаи} \end{cases}$$

Теперь пересчитайте новые значения  $x^*$  и  $s^*$  как:

$$x^* = \sum \frac{x_i^*}{p}$$
$$s^* = 1,134 \sqrt{\frac{\sum (x_i^* - x^*)^2}{(p - 1)}}$$

Суммируя по  $i$ .

Робастное оценивание  $x^*$  и  $s^*$  вычисляется на основе итеративного расчета до достижения сходимости. Предполагается, что сходимость достигнута, когда между одной итерацией и следующей не происходит никаких изменений в третьем значении робастного стандартного отклонения и эквивалентном значении робастного среднего. Этот метод можно выполнять при помощи компьютера.

### 2.2.3. Критерии выбора числа измерений, которые должны быть выполнены в каждой участвующей лаборатории

Вариации в повторяемости метода означают, что в аттестационных тестах могут появиться погрешности. Когда вариации в повторяемости слишком высоки по сравнению со стандартным отклонением для аттестационного тестирования, существует риск получения ненадежных результатов. В этих условиях лаборатория может получить очень высокий фактор предвзятости в одном раунде, но не в другом, что значительно осложнит поиск причины.

Если мы хотим ограничить влияние вариаций в повторяемости, число параллельных измерений ( $n$ ), проводимых в каждой лаборатории, должно быть выбрано таким образом:

$$\frac{\sigma_r}{\sqrt{n}} \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

где

$\sigma_r$  – стандартное отклонение повторяемости, установленное до выполнения упражнения (посредством проведения экспериментального межлабораторного упражнения либо определенного лабораторией-организатором).

При выполнении этого условия стандартное отклонение повторения составляет не более 10% от стандартного отклонения для аттестационного тестирования.

Кроме того, все участвующие в межлабораторных тестах лаборатории должны проводить одинаковое число параллельных измерений.

### 2.2.4. Процедура тестирования на однородность<sup>5</sup>

Когда допустимо не проводить тесты на однородность для всех измеряемых величин, выбирается метод измерения и типовая измеряемая величина, которые в достаточной степени чувствительны к неоднородности образцов.

Подготовьте и упакуйте образцы для раунда аттестационного тестирования, убедившись в наличии достаточного числа образцов для проведения как аттестационного теста, так и теста на однородность.

Выберите случайным образом число ( $g$ ) упакованных образцов, где  $g \geq 10$ . Число образцов, включенных в тест на однородность, можно сократить, если имеются исторические данные для этих тестов, проведенных в соответствии с теми же самыми процедурами.

Подготовьте две тестовые порции каждого образца, сведя к минимуму, насколько это возможно, межтестовые различия.

Выберите эти  $2g$  тестовые порции наугад и протестируйте каждую из них, завершив серию тестов с соблюдением условий повторяемости.

Вычислите среднюю ( $\bar{x}$ ) внутривыборочную величину стандартного отклонения ( $s_w$ ) и межвыборочную величину стандартного отклонения ( $s_s$ ) следующим образом.

Данные для теста на однородность представлены в виде  $x_{t,k}$

где

$t$  представляет образец ( $t = 1, 2, \dots, g$ )

$k$  представляет порцию образца ( $k = 1, 2$ ).

Среднее значение для каждого образца определяется как:

$$x_{t..} = \frac{x_{t,1} + x_{t,2}}{2}$$

<sup>5</sup> Согласно Международной организации стандартизации 13528:2005.

Диапазон межтестовых порций:

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}|$$

Общее среднее значение рассчитывается как:

$$\bar{x}_{..} = \sum \bar{x}_{t..} / g$$

Стандартное отклонение общего среднего значения рассчитывается как:

$$s_x = \sqrt{\sum (x_{t..} - \bar{x}_{..})^2 / (g - 1)}$$

Внутривыборочное стандартное отклонение:

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)}$$

Где суммирование охватывает все образцы ( $t = 1, 2, \dots, g$ ).

Наконец, чтобы рассчитать межвыборочное стандартное отклонение:

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)}$$

### Критерии оценки теста на однородность

Сравните межвыборочное стандартное отклонение ( $S_s$ ) с требуемым стандартным отклонением для аттестационного тестирования ( $\hat{\sigma}$ ). Образцы соответствуют надлежащему критерию однородности, если:

$$s_s \leq 0,3 \hat{\sigma}.$$

Если этот критерий соблюдается, то межвыборочное стандартное отклонение составляет не более 10% от общего стандартного отклонения для аттестационного тестирования. При несоблюдении данного критерия координатор может рассмотреть одну из следующих возможностей.

- Можно изучить метод подготовки образцов, чтобы внести в него любые необходимые усовершенствования.
- Можно предоставить ряд образцов каждому участнику сличительного исследования для проведения измерения по каждому образцу. Неоднородность этих образцов приведет к увеличению внутривыборочного стандартного отклонения до значения:

$$\sigma_{r1} = \sqrt{\sigma_r^2 + s_s^2}$$

Это значение  $\sigma_{r1}$  можно использовать для увеличения числа параллельных измерений для каждого участника данного упражнения.

Межвыборочное стандартное отклонение может быть включено в стандартное отклонение для аттестационного тестирования, при этом  $\hat{\sigma}$  рассчитывается следующим образом:

где

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\hat{\sigma}_1^2 + s_s^2}$$

$\hat{\sigma}_1$  – стандартное отклонение при аттестационном тестировании без включения каких-либо допустимых отклонений гетерогенности образца.



### 2.2.5. Процедура тестирования стабильности

Лаборатория, проводящая тест на однородность, должна проводить и тесты на стабильность. При этом должны использоваться тот же метод и тот же продукт, что и при проведении теста на однородность.

Тестирование стабильности проводится после тестов на однородность. Разница во времени между первым и вторым должна быть аналогична времени, которое, по оценкам, проходит между подготовкой образцов для сравнительного испытания и максимальным периодом, в течение которого участники должны представить свои результаты.

Возьмите число ( $g$ ) образцов, где  $g \geq 3$ .

Подготовьте две тестовые порции каждого образца, как и для тестов на однородность.

Выберите наугад  $2g$  порции для получения результата измерения  $y_{t,k}$  для каждого образца, выполняя все измерения с соблюдением условий повторяемости.

Вычислите среднее  $\bar{y}$  (...) всех измерений.

#### Критерии оценки теста на стабильность

Сравните среднее значение, полученное в тесте на однородность, со средним значением, полученным в тесте на стабильность. Образцы считаются стабильными, если:

$$|\bar{x}_{..} - \bar{y}_{..}| \leq 0,3 \hat{\sigma}$$

Если этот критерий не соблюдается, необходимо проанализировать и по возможности улучшить процедуры подготовки и хранения образцов.

### 2.2.6. Инструкции для участников

Перед отправкой тестовых объектов организатор аттестационного тестирования заблаговременно уведомит участников об ожидаемой дате их прибытия и дате, до которой результаты должны быть предоставлены участвующей лабораторией.

Организатор аттестационного тестирования должен предоставить всем участникам подробные и хорошо задокументированные инструкции. Эти инструкции будут включать в себя:

- требование по обращению с тестовыми объектами так же, как и с большинством тестируемых в обычном порядке образцов (если только конкретные требования программы не предусматривают необходимость некоторого отклонения от этого принципа);
- условия хранения;
- методы тестирования, которые должны применяться или разрешены в конкретных случаях;
- процедуру подготовки и кондиционирования тестовых объектов;
- инструкции по обращению, включая требования безопасности;
- конкретные условия окружающей среды, при которых должны проводиться аттестационные испытания, и при необходимости требование о том, чтобы участники уведомляли о соответствующих условиях окружающей среды во время проведения измерений;
- конкретные инструкции в отношении того, каким образом должны сообщаться результаты (напр., единицы измерения, число значащих цифр или десятичных знаков) и инструкции в отношении погрешности результата (если это необходимо); в последнем случае должен быть включен коэффициент охвата и, если это возможно, вероятность этого охвата;
- крайний срок представления результатов;
- контактную информацию организатора в случае возникновения каких-либо вопросов;
- инструкции относительно предоставления результатов аттестационного тестирования (если применимо).

## 2.2.7. Расчет статистических параметров, связанных с результатами аттестационного тестирования

### Оценка погрешности участников

Если  $x$  — это результат (или среднее значение результатов), сообщенный участником для измерения одного из следующих параметров, которые должны быть определены в раунде аттестационного тестирования, погрешность ( $D$ ) можно рассчитать следующим образом:

$$D = x - X$$

где

$X$  – присвоенное значение.

Если участник получает результат, дающий смещение выше  $3,0 \hat{\sigma}$  или ниже  $-3,0 \hat{\sigma}$ , то результат будет считаться и отмечаться как «сигнал действия». Аналогичным образом, если участник получает результат, дающий погрешность выше  $2,0 \hat{\sigma}$  или ниже  $-2,0 \hat{\sigma}$ , то результат будет считаться и отмечаться как «предупреждающий сигнал».

Один сигнал действия или два последовательных предупреждающих сигнала означают, что лаборатория должна провести анализ выявленной в результатах погрешности.

### Относительная разница

Если  $x$  — это результат (или среднее значение результатов), сообщаемый участником для измерения одного из параметров, которые должны быть определены в ходе раунда аттестационного тестирования, то относительную разницу ( $D\%$ ) можно рассчитать следующим образом:

$$D\% = 100 (x - X)/X$$

где

$X$  – присвоенное значение.

Если участник получает результат, дающий относительную разницу выше  $300 \hat{\sigma}/X\%$  или ниже  $-300 \hat{\sigma}/X\%$ , то результат будет считаться и отмечаться как сигнал действия. Аналогичным образом, если участник получает результат, дающий относительную разницу выше  $200 \hat{\sigma}/X\%$  или ниже  $-200 \hat{\sigma}/X\%$ , то результат будет считаться и отмечаться как предупреждающий сигнал.

Один сигнал действия или два последовательных предупреждающих сигнала означают, что лаборатория должна провести анализ выявленной в результатах погрешности.

## 2.2.8. z-оценка

Значение z-оценки рассчитывается как:

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}}$$

где

$x$  - значение, о котором сообщил участник

$X$  - присвоенное значение

$\hat{\sigma}$  - стандартное отклонение для аттестационного тестирования.

Если участник получает результат, дающий z-оценку выше  $3,0 \hat{\sigma}$  или ниже  $-3,0 \hat{\sigma}$ , то результат будет считаться и отмечаться как сигнал действия. Аналогично, если участник получает результат, который дает z-оценку выше  $2,0 \hat{\sigma}$  или ниже  $-2,0 \hat{\sigma}$ , то результат будет считаться и отмечаться как предупреждающий сигнал.

Если в аттестационном тестировании участвует небольшое число лабораторий (напр., менее 10), к значимости z-оценки для отдельных раундов необходимо относиться с большой осторожностью. В таких случаях при оценке работы каждой лаборатории предпочтительно оценивать комбинацию результатов разных раундов.

### 2.2.9. Число $E_n$

Этот параметр рассчитывается как:

$$E_n = \frac{x - X}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

где

$X$  – присвоенное значение

$U_{ref}$  – расширенная погрешность в  $X$

$U_{lab}$  – расширенная погрешность в  $x$ , т.е. результат, полученный участником.

Значение выше 1,0 или ниже -1,0 эквивалентно значению z-оценки выше или ниже 2,0, соответственно, поэтому результат этого типа должен рассматриваться так, как определено в расчете значения z-оценки.

### 2.2.10. z'-оценка

Значение z'-оценки рассчитывается как:

$$z' = \frac{(x - X)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

где

$u_x$  – (нерасширенная) погрешность присвоенного значения  $X$ .

Результаты z'-оценки толкуются аналогичным образом, что и значения z-оценки.

Сравнение z-оценки с z'-оценкой показывает, что значения z'-оценки в одном раунде могут быть ниже соответствующих значений z-оценки при наличии постоянного множителя

$$\frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}}$$

Если

$$0,96 \leq \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_x^2}} \leq 1,00$$

то z-оценка будет очень близка к z'-оценке, и в этом случае можно сделать вывод, что погрешность в присваиваемом значении ничтожно мала.

### 2.2.11. Zeta-оценка ( $\zeta$ )

Этот параметр может быть использован только в том случае, если значение, присвоенное для аттестационного тестирования, не было рассчитано с использованием результатов, полученных в участвующих лабораториях.

$$zeta\ score = \frac{(x - X)}{\sqrt{u_x^2 + u_X^2}}$$

где

$u_x$  – значение стандартной погрешности (не расширенной), рассчитанной участвующей лабораторией, и

$u_X$  – стандартная погрешность (не расширенная) присвоенного значения  $X$ .

Интерпретация  $\zeta$ -оценки проводится по аналогии с интерпретацией  $z$ -оценки.

Если получено несколько  $\zeta$ -оценок, превышающих 3,0, подряд, то это может означать, что участник недооценивает источники погрешности.

Если лаборатория показывает очень большое смещение и интервал погрешности  $X \pm U_x$  не включает присвоенное значение, то для  $\zeta$ -оценки будут также получены очень высокие значения.

### 2.2.12. $E_z$ -оценка

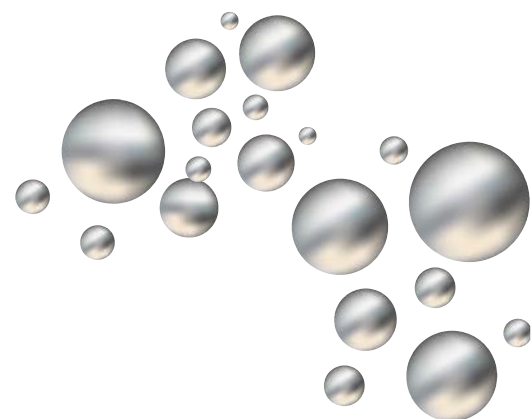
$E_z$  -оценка определяется как:

$$E_{z-} = \frac{x - (X - U_x)}{U_x}$$

$$E_{z+} = \frac{x - (X + U_x)}{U_x}$$

В этих случаях используется расширенная погрешность.

- Если оба значения ( $E_{z-}$  and  $E_{z+}$ ) находятся в диапазоне от -1,0 до 1,0, то результат считается удовлетворительным.
- Если одно из двух значений  $E_z$  попадает в диапазон от -1,0 до 1,0, то результат считается сомнительным.
- Если оба значения меньше -1,0 или больше 1,0, то результат считается неудовлетворительным.



### 3. Оценка уровня квалификации лаборатории

Каждая лаборатория может оценить эффективность своей работы, используя контрольный список, приведенный в приложении 3, который включает ряд вопросов, сгруппированных в разделы для сбора данных о лабораториях, и критерии, которые необходимо применять в процессе оценки. Для этого должна быть собрана информация об оборудовании, уровне квалификации, опыте участия в исследованиях по взаимокалибровке и аккредитации.



## 4. Библиография

### Библиография

1. National Research Council of the National Academies. Human biomonitoring of environmental chemicals. Washington (DC): National Academies Press; 2006. <https://doi.org/10.17226/11700>.
2. Calafat AM, Needham LL. What additional factors beyond state-of-the-art analytical methods are needed for optimal generation and interpretation of biomonitoring data? *Environ Health Perspect.* 2009;117:1481–5.
3. Cornellis R, Heinzow B, Herber RFM, Christensen JM, Poulsen OM, Sabbioni E et al. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure Appl Chem.* 1995;67(8–9):1575–608.
4. Final Report Summary – COPHES (European coordination action on human biomonitoring). Brussels: European Commission, Community Research and Development Information Service; 2013 ([https://cordis.europa.eu/result/rcn/58554\\_en.html](https://cordis.europa.eu/result/rcn/58554_en.html), accessed 28 February 2018).
5. Melia JL. Valencia: Valencia University Research Unit of Psychometrics; 2009 (<http://www.uv.es/meliajl/Docencia/Tablas/TablaR.PDF>, accessed 28 February 2018).

### Библиография

International Organization for Standardization [website]. Geneva: International Organization for Standardization; 2018 (<https://www.iso.org/standards-catalogue/browse-by-ics.html>, accessed 31 January 2018).

ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

ISO/IEC Guide 43-1:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

ISO/IEC Guide 43-2:1997. Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO Guide 33, second edition. Reference materials. Good practice in using reference materials.

G-ENAC-99; second edition. Cuestionario de autoevaluación de cumplimiento de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 para laboratorios [Self-assessment questionnaire for compliance with UNE EN ISO / IEC 17025: 2005 standard for laboratories]. Madrid: Entidad Nacional de Acreditación [National Accreditation Entity]; 2018 (<https://www.enac.es/>, accessed 7 February 2018).

# Приложение 1. Регистрация полученного образца

## 1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ОБРАЗЦА:

Центр:  
Город/страна:  
Дата забора проб:

## 2. ОБРАЗЕЦ ПОЛУЧЕН:

- Моча  
 Волосы       Пуповинная кровь

Подпись получившего:

## 3. ПРИЕМ ОБРАЗЦА:

Дата  
(день/месяц/год)      Время  
(час:мин)

### А) УПАКОВКА

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Поврежденная упаковка  
 Разморожено охлаждающее вещество  
 Другие: \_\_\_\_\_

### В) ОБРАЗЦЫ

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Пролитый образец/разбитый сосуд  
 Недостаточное количество/объем (укажите биосреду) \_\_\_\_\_  
 Несовпадение ИД кодов  
 Другие: \_\_\_\_\_

### С) ДОКУМЕНТЫ

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Отсутствие реестра собранных образцов  
 Отсутствие вопросника для забора проб волос  
 Отсутствие вопросника для забора проб мочи  
 Отсутствие вопросника для забора проб пуповинной крови  
 Отсутствие вопросника обследования  
 Несовпадение ИД кодов  
 Другие: \_\_\_\_\_

## 4. ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ НА ХРАНЕНИЕ/БИОБАНКИНГ:

## 5. КОММЕНТАРИИ:

### ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЕ КОДЫ ДЛЯ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ОБРАЗЦОВ

Моча      Волосы      Пуповинная кровь





# Приложение 3. Самооценка компетентности лаборатории

## Вопросник по оценке лаборатории

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ
------------------

**1. Данные о лице, заполнившем вопросник.**

Имя:.....

Должность:.....

Компания: .....

Адрес: .....

Город: .....

Почтовый индекс:.....

Страна: .....

Адрес электронной почты:.....

Телефон: .....

**2. Какие анализы проводятся в вашей лаборатории??**

ртуть в волосах     ртуть в моче     ртуть в пуповинной крови

**3. Какой(-ие) аналитический(-е) метод(-ы) вы используете?**

.....

**4. Пожалуйста, укажите тип, производителя и модель вашего аналитического оборудования**

.....

**5. Какое минимальное количество волос/мочи/крови требуется для измерений? мг или мл**

.....

ИНФОРМАЦИЯ О МЕТОДЕ

6. Аккредитована ли процедура анализа ртути в волосах/моче/пуповинной крови?

Нет       Да

Если да, просьба указать номер вашего технического приложения:

.....

7. Есть ли у вас общие стандартные рабочие процедуры валидации методов анализа?

Нет       Да

8. Имеются ли стандартные операционные процедуры для анализа содержания ртути в .....в вашей лаборатории?

Нет       Да

9. Есть ли у вас проверенный метод анализа содержания ртути в .....?

Нет       Да

10. Пожалуйста, предоставьте следующую информацию о вашем методе анализа.

Внутрисерийная повторяемость .....%

Предел количественного определения .....

Предел обнаружения .....

Точность .....

Погрешность .....

11. Как вы рассчитываете внутрисерийную повторяемость?

.....

12. Как вы рассчитываете предел количественного определения?

.....

13. Как вы рассчитываете предел обнаружения?

.....

14. Как вы рассчитываете степень точности?

.....

15. Какие компоненты вы используете для расчета погрешности?

.....

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

**16. Имеется ли у вас внутренняя система контроля качества?**

- Нет  Да

**17. Применяете ли вы следующие средства контроля качества?**

- .....
- |                                                        |                              |                                                                      |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Контроль качества при помощи прямой линии <sup>6</sup> | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите частоту .....</i> |
| Коэффициент регрессии                                  | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                          |
| Коэффициент линейности                                 | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                          |
| Наклон                                                 | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                          |
| Холостые образцы                                       | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите частоту .....</i> |
| Образцы контроля качества                              | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите частоту .....</i> |
| Слепые образцы                                         | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите частоту .....</i> |
| Дубликаты образцов                                     | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите частоту .....</i> |

**18. Используете ли вы сертифицированные референтные материалы?**

- Нет  Да *Пожалуйста, укажите производителя и концентрацию:*
- .....

**19. Используете ли вы референтные материалы?**

- Нет  Да *Пожалуйста, укажите производителя и концентрацию:*
- .....

**20. Используете ли вы откалиброванное/проверенное оборудование?**

- Нет  Да

**21. Есть ли у вас годовой план и программа калибровки оборудования?**

- Нет  Да

**22. Есть ли у вас записи об условиях хранения образцов, когда это необходимо?**

- Нет  Да *Пожалуйста, укажите производителя и концентрацию:*
- .....

**23. Есть ли у вас ежегодная программа по проведению сличительных испытаний?**

- Нет  Да

<sup>6</sup> Это связано с частотой калибровки для подтверждения того, что параметры графика соответствуют определенным критериям проверки.

24. Как часто вы принимаете участие? (Пожалуйста, укажите организатора и сколько раз в год))

.....

25. Оценка результатов ваших сличительных испытаний основана на:

- |              |                              |                                                             |
|--------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| z-оценке     | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                 |
| исле $E_n$   | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                 |
| $z'$ -оценке | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                 |
| Zeta-оценке  | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                 |
| Ez-оценке    | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да                                 |
| Другое       | <input type="checkbox"/> Нет | <input type="checkbox"/> Да <i>Пожалуйста, укажите.....</i> |

### Критерии оценки

Номер вопроса	Объяснение
6	<p>ДА: аккредитованные лаборатории должны считаться экспертными лабораториями; однако в этом случае ответы на большинство остальных вопросов должны быть утвердительными.</p> <p>НЕТ: уровень квалификации лаборатории можно оценить на основе ответов на оставшиеся вопросы.</p>
7	<p>ДА: первым шагом при разработке конкретного метода валидации должна стать разработка общей процедуры такой валидации.</p> <p>НЕТ: если метод определения ртути (вопрос 9) прошел валидацию, то соответствующий уровень квалификации может быть приемлемым.</p>
8	<p>ДА: вторым шагом при разработке конкретного метода валидации должна быть разработка отдельной процедуры валидации для анализа содержания ртути. Это должен быть изначальный этап валидации.</p> <p>НЕТ: если метод определения ртути (вопрос 9) прошел валидацию, то соответствующий уровень квалификации может быть приемлемым.</p>
9	<p>ДА: валидация метода является необходимым этапом при оценке уровня квалификации лаборатории. Кроме того, если на вопросы контроля качества даны надлежащие ответы, а в вопросе 10 предлагаются подходящие статистические параметры, то эффективность работы лаборатории можно считать достаточной.</p> <p>НЕТ: лаборатория должна иметь возможность провести валидацию этого метода. Как минимум желательно получить статистические параметры точности и предела обнаружения.</p>
10	<p>Эти значения позволяют оценить эффективность работы лаборатории. Сравнение различных лабораторий позволяет определить надежность каждого из них.</p>

Номер  
вопроса

Объяснение

- 11 Этот вопрос позволяет определить уровень статистической квалификации лаборатории.
- 12 Этот вопрос позволяет определить уровень статистической квалификации лаборатории.
- 13 Этот вопрос позволяет определить уровень статистической квалификации лаборатории.
- 14 Этот вопрос позволяет определить уровень статистической квалификации лаборатории.
- 15 Этот вопрос позволяет определить статистическую квалификацию лаборатории. В этом конкретном случае необходимо проанализировать возможность недооценки погрешности измерений, так как это может повлиять на сопоставимость результатов.
- 16 ДА: необходимо оценить масштаб внутреннего контроля качества, чтобы убедиться в том, что любое отклонение будет обнаружено.  
 НЕТ: первый шаг к уверенности в надежности результатов – наличие внутренней системы контроля качества.
- 17 ДА: необязательно осуществлять все виды контроля, но использование большего числа методов контроля качества обеспечивает более оптимальные результаты.  
 НЕТ: в лаборатории следует попытаться использовать хотя бы некоторые средства контроля качества, например, градуировочный график и некоторые виды контрольных образцов.
- 18 ДА: использование сертифицированных референтных материалов обеспечивает присвоенное значение. Для получения реального конечного значения в каждом случае могут понадобиться некоторые манипуляции (разбавления...)  
 НЕТ: как минимум, должны использоваться референтные материалы (вопрос 19).
- 19 ДА: лаборатория может использовать подходящие материалы при условии, что они были соответствующим образом охарактеризованы.  
 НЕТ: на этот вопрос можно не отвечать, если ответ на вопрос 18 утвердительный.
- 20 ДА: калибровка оборудования обеспечивает инструментальную повторяемость и позволяет избежать ошибок, связанных с оборудованием.  
 НЕТ: калибровка является первым шагом при проведении любого контроля качества оборудования. Никакие измерения не должны выполняться до калибровки критически важного оборудования.
- 21 ДА: ежегодный план и программа калибровки обеспечивают правильную работу всего оборудования. Следует проводить промежуточные проверки при необходимости.  
 НЕТ: все оборудование должно быть откалибровано до начала проведения анализов.
- 22 ДА: отслеживаемость измерений необходима для надлежащего контроля условий окружающей среды.  
 НЕТ: необходимо следить за температурой, влажностью и другими факторами по мере необходимости. В противном случае, окончательные результаты должны считаться ненадежными.
- 23 ДА: наличие ежегодных программ по проведению сличительных испытаний демонстрируют желание лаборатории подтверждать квалификацию и должны рассматриваться как положительный ответ.  
 НЕТ: только благодаря долгосрочному участию лаборатория получает эффективный инструмент для оценки своих результатов.

- |    |                                                                                                                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 24 | Длительное участие должно оцениваться положительно, независимо от его результатов.                                                                                                 |
| 25 | Z-оценка может быть недостаточным средством определения уровня квалификации лаборатории. Использование дополнительных методов помогает продемонстрировать возможности лаборатории. |

Критерии оценки лабораторий должны основываться на информации, полученной из ответов на вопросы 6-25 настоящей анкеты. Однако эти критерии могут варьироваться и применяться более или менее строго в зависимости от конкретных требований и ситуаций. В связи с этим могут применяться следующие критерии.

- Лаборатории, ответившие отрицательно на вопросы 16 или 20, должны быть автоматически исключены.
- Лаборатории, предоставившие менее девяти положительных ответов, должны улучшить свою систему проверки качества, например, путем осуществления некоторых из мероприятий, приведенных в таблице критериев оценки. В частности, валидация метода должна быть конечной целью для всех участников, поэтому настоятельно рекомендуется устанавливать критерии контроля качества на ее основе.
- В отношении лабораторий, предоставивших менее 18 положительных ответов, особое внимание следует уделить ответам на вопросы 10-15 и 24, поскольку они позволяют оценить уровень квалификации и, следовательно, рассматривать лабораторию в качестве кандидата.
- Положительные ответы на более чем 18 вопросов свидетельствуют о хорошем уровне квалификации в области проведения анализа. Поэтому такая лаборатория может считаться подходящей для проведения анализа. Однако она должна принять участие в специальных межлабораторных сличительных упражнениях для проведения обследований ВОЗ.

# Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в волосах человека

(сбор образцов, анализ содержания общей ртути,  
толкование результатов)

## Резюме

В данных стандартных операционных процедурах (СОП) описывается процесс оценки пренатального воздействия ртути в обследованиях на основе биомониторинга человека с использованием волос головы в качестве биологической среды. В этом документе подробно описаны процедуры забора проб волос, анализа содержания общей ртути и интерпретации результатов.

## Ключевые слова

Mercury – analysis  
Methylmercury Compounds – analysis  
Biomarkers – analysis  
Hair – chemistry  
Maternal Exposure  
Maternal-Fetal Exchange  
Infant, Newborn  
Environmental Exposure

## Авторы

Argelia Castaño Calvo  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания  
Marta Esteban López  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания  
Miguel Ángel Lucena  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III,  
Испания

# Содержание

<b>Условные сокращения</b> .....	<b>37</b>
<b>Введение: волосы человека как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека</b> .....	<b>38</b>
<b>1. Сбор образцов волос головы человека</b> .....	<b>39</b>
1.1. Сфера применения метода.....	39
1.2. Меры предосторожности.....	39
1.3. Необходимые материалы.....	40
1.4. Подготовка/предварительная обработка пробоотборных материалов.....	40
1.5. Процедура забора проб.....	41
1.6. Маркировка.....	46
1.7. Транспортировка и консервирование образцов.....	46
1.8. Прием образца.....	46
1.9. Пробоподготовка/разделение на аликвоты.....	47
1.10. Хранение и консервирование.....	50
1.11. Контроль качества.....	50
<b>2. Анализ содержания общей ртути в волосах человека</b> .....	<b>51</b>
2.1. Сфера применения метода.....	52
2.2. Технический принцип.....	52
2.3. Меры предосторожности.....	53
2.4. Оборудование, материалы и растворы.....	53
2.5. Калибровка.....	54
2.6. Процедуры.....	55
2.7. Контроль качества.....	58
2.8. Оценка метода.....	59
<b>3. Интерпретация данных</b> .....	<b>62</b>
3.1. Значения, необходимые для интерпретации.....	63
<b>Библиография</b> .....	<b>65</b>
<b>Приложение 1. Реестр собранных образцов волос</b> .....	<b>68</b>
<b>Приложение 2. Вопросник для забора проб волос</b> .....	<b>69</b>
<b>Приложение 3. Реестр приема образцов</b> .....	<b>70</b>
<b>Приложение 4. Проверочный список до забора проб</b> .....	<b>71</b>
<b>Приложение 5. Проверочный список после забора проб</b> .....	<b>72</b>



# Условные сокращения

БМЧ	биомониторинг человека
ИД	идентификационный (код)
МАГАТЭ	Международное агентство по атомной энергии
ПКО	предел количественного определения
ПО	предел обнаружения
СОП	стандартные операционные процедуры
СРМ	сертифицированный референтный материал
Hg	ртуть

# Введение: волосы человека как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека

Находящиеся в окружающей среде химические вещества могут попадать в организм человека и накапливаться в волосах. Человеческие волосы широко используются в различных научных областях, таких как судебно-медицинская и клиническая токсикология, медицина труда и допинг-контроль. В последние несколько лет они также использовались в обследованиях на основе биомониторинга человека (БМЧ) по изучению содержащихся в окружающей среде химических веществ. Использование этой биосреды в БМЧ имеет некоторые преимущества, такие как неинвазивный характер и простота отбора, транспортировки и хранения образцов, а также отсутствие необходимости в специальных материалах или специальном медицинском персонале для забора проб. Эта биосреда не подходит для анализа содержания многих химических веществ, но в случае изучения экспозиции к ртути (Hg), связанной с потреблением рыбы (1), она особенно полезна, поэтому в ряде исследований в различных популяциях использовались образцы волос для этой цели (2).

Как правило, использование волос в качестве биосреды для изучения воздействия метилртути является предпочтительным вариантом, т.к. забор проб волос осуществляется простым и неинвазивным способом. После попадания в волосы ртуть не может вернуться в кровь, что делает их хорошим долгосрочным маркером воздействия метилртути. В большинстве случаев ртуть в волосах присутствует в форме метилртути, особенно в группах населения с высоким уровнем потребления рыбы. Метилртуть проникает в волосы на этапе формирования, поэтому содержащиеся в волосах уровни указывают на относительно прямую связь с уровнями ртути в крови, что обеспечивает точный и надежный метод измерения уровня поступления метилртути (3).

Волосы — это биологический материал, рост которого происходит циклично при чередовании периодов роста и покоя. Считается, что волосы растут со скоростью 1 см в месяц, хотя эта скорость может меняться в зависимости от типа волос и местонахождения организма. По своей структуре волосы представляют собой поперечно связанную, частично кристалловидную, упорядоченную полимерную сеть, содержащую различные функциональные химические группы, которые могут связывать небольшие молекулы. Волосы состоят примерно на 65-95% из белков, большая доля которых отличается высоким содержанием серы. На долю воды приходится около 15-35%, а липидов – 1-9%. Содержание минералов в волосах составляет менее 1% (4,5).

В данных стандартных операционных процедурах (СОП) представлены подробные инструкции по забору и анализу образцов волос, растущих на голове человека, и интерпретации результатов. Процедуры контроля качества на протяжении всего процесса биомониторинга воздействия ртути на человека описаны в отдельных СОП и должны проводиться на каждом его этапе.



# 1. Сбор образцов волос головы человека

Процедура забора проб волос не требует сложного технического материала, и проводящие обследование на местах сотрудники смогут правильно собрать образцы после прохождения простого тренинга. Описанная здесь процедура позволяет избежать эстетических проблем даже в случае коротких волос и, таким образом, минимизирует вероятность того, что волонтеры откажутся от участия в обследовании по этой причине.

Процедуры забора проб волос немного различаются в зависимости от длины волос и от степени подвижности волонтера. В приведенной методике описаны различные варианты.

Особое внимание следует обратить на количество собранных волос (слишком мало волос может поставить под угрозу проведение анализа) и на необходимость обеспечения неподвижности пряди волос при срезании.

Размер образца зависит от количества, необходимого для последующего химического анализа. Это, в свою очередь, зависит от аналитического метода и предела количественного определения. Эти вопросы должны заранее обсуждаться и определяться с участием работников лаборатории, ответственной за проведение анализа.

Обеспечение неподвижности пряди волос – предельно важный шаг процедуры забора проб волос, так как необходимо безошибочно определить ближайший к коже головы конец. В настоящих СОП описываются различные варианты обеспечения неподвижности пряди волос. В случае использования скотча для фиксации особое внимание должно быть уделено сегменту анализируемого образца, который не должен быть заклеен им.

В данных СОП предлагается проводить контрольные операции во время приема образца с целью осуществления рутинного контроля для приема или отбраковки проб.

Даются подробные инструкции по подготовке образца волос человека к анализу содержания ртути.

## 1.1. Сфера применения метода

Этот метод используется для забора проб волос человека различной длины<sup>1</sup>:

короче 3,5 см (1,4 дюйма);

3,5-5 см (1,4-1,97 дюйма);

длиннее 5 см (1,91 дюйма).

В методе подготовки и разделения образцов на аликвоты также учитывается длина собранных волос, принимая во внимание две ситуации: зафиксированные и незафиксированные образцы.

## 1.2. Меры предосторожности

При заборе проб волос следует соблюдать следующие меры предосторожности.

- При работе с волосами не нужно принимать специальных мер предосторожности в отношении биологических опасностей.
- При заборе проб следует использовать перчатки и подходящие ножницы.

<sup>1</sup> Длина волос может меняться в зависимости от сегмента анализируемого образца.

## 1.3 Необходимые материалы

В таблице 1 перечислены материалы, необходимые для забора проб волос, их предназначение и любые возможные альтернативы.

Таблица 1. Материалы для забора проб волос для анализа содержания ртути

Материал	Предназначение	Альтернатива
<b>Спирт и вата</b>	Используются в качестве гигиенической меры предосторожности.	
<b>Латексные перчатки (без присыпки)</b>	Используются в качестве гигиенической меры предосторожности.	Аналогичные одноразовые перчатки без присыпки, изготовленные из других материалов
<b>Ножницы</b>	Хотя для взятия образца могут использоваться различные методы, рекомендуется использовать ножницы, специально предназначенные для стрижки волос. Так как прядь волос необходимо отрезать очень близко к коже головы, ножницы с тупыми концами помогут избежать повреждений.	Любые чистые и острые ножницы соответствующего размера
<b>Идентификационные этикетки</b>	Образцы должны быть однозначно идентифицированы.	Написание идентификационного кода прямо на бумажном конверте несмываемым маркером
<b>Несмываемый маркер</b>	Нужно указать кончик, который находится ближе всего к коже головы. Обычные ручки плохо пишут на скотче.	Любой другой пишущий материал, который гарантирует, что отметка будет оставаться хорошо различимой
<b>Скотч</b>	Используется для обеспечения неподвижности локона.	Любой другой материал, обеспечивающий неподвижность локона
<b>Бумажные пакеты</b>	Это основной контейнер образца. Бумажные материалы позволяют избежать проблем, связанных со статическим электричеством. Размер пакета должен соответствовать размеру образца (напр., 8x14 см; 12x20 см).	Бумажные конверты
<b>Пластиковые пакеты с застежкой</b>	Этот второй контейнер защищает образец от проникновения жидкостей. Размер пакета должен соответствовать размеру образца (напр., 8x14 см; 12x20 см).	Любой другой вид пластикового пакета, который обеспечивает изоляцию образца.

Примечание: проверочный список до забора проб приводится в приложении 4.

## 1.4 Подготовка/предварительная обработка пробоотборных материалов

Пробоотборный материал, необходимый для забора проб волос, не требует специальной подготовки или предварительной обработки. Однако в целях обеспечения гигиенических условий необходимо чистить ножницы перед каждым забором проб. Все материалы должны быть подготовлены и легко доступны для работника, отвечающего за забор проб волос на местах.

Очистка ножниц должна осуществляться следующим образом.

1. Наденьте пару одноразовых перчаток.
2. Смочите кусок ваты спиртом.
3. Протрите ножницы смоченным ватным тампоном (фото 1).



Фото 1. Очистка ножниц.  
© Instituto de Salud Carlos III

## 1.5. Процедура забора проб

Процедуры забора проб волос разной длины несколько различаются. От длины волос также зависит способ фиксации локона. Обратите внимание, что при разработке этого документа предполагалось, что для анализа будут использованы волосы, находящиеся на расстоянии не больше 3 см от кожи головы. Если анализ образцов проводится с использованием локонов разной длины, необходимо убедиться, что на анализируемом отрезке нет скотча.

Материалы, необходимые для взятия проб волос, должны быть готовы и легко доступны для лица или группы лиц, отвечающих за взятие проб волос.

Образцы должны быть собраны с одной и той же области головы всех волонтеров. Две пряди волос должны быть отрезаны в случае длинных волос, по одной с каждой стороны головы. Чтобы избежать эстетических проблем, забор проб в случае коротких волос должен производиться путем обрезки небольших локонов из разных мест, но в пределах одной и той же области головы.<sup>2</sup>

### 1.5.1. Волосы длиннее 5 см (1,97 дюйма)

Процедура отбора образцов волос длиной более 5 см (1,97 дюйма) описана ниже.

1. Возьмитесь за волосы в середине затылка и поднимите их в направлении верхней части головы (фото 2a и b).



Фотографии 2a и b. Захват волос; (a) в положении сидя, (b) в положении лежа.  
© Instituto de Salud Carlos III

<sup>2</sup> Видеозапись процедуры отбора волос доступна на веб-странице Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Instituto de Salud Carlos III (6).

2. Возьмите несколько прядей волос по горизонтали и сверните их в один локон, чтобы зафиксировать в неподвижном состоянии (фото 3а и б).



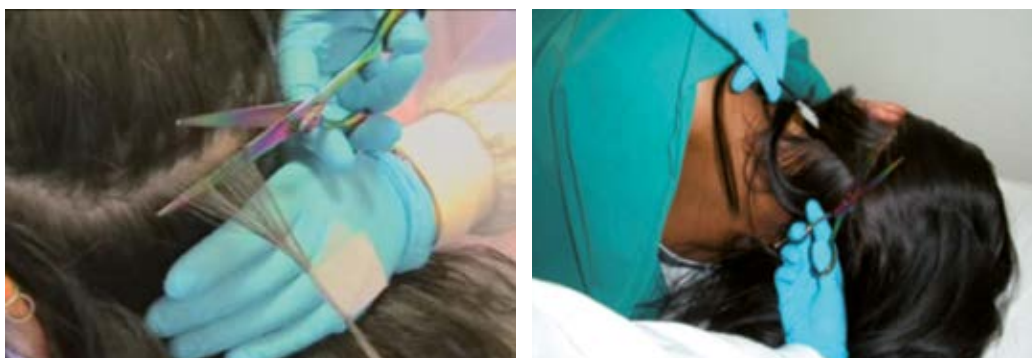
Фотографии 3а и б. Захват волос; (а) в положении сидя, (б) в положении лежа.  
© Instituto de Salud Carlos III

3. Закрепите локон скотчем на расстоянии 5-6 см (1,97-2,36 дюйма) от корня волос (фото 4а и б). Анализ проводится на 3 см прикорневого участка волос, поэтому убедитесь, что этот фрагмент не заклеен скотчем.

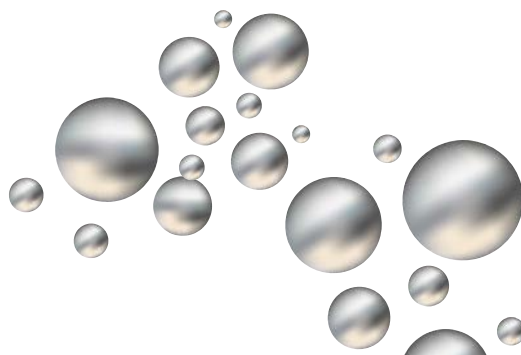


Фотографии 4а и б. Фиксация локона скотчем; (а) в положении сидя, (б) в положении лежа.  
© Instituto de Salud Carlos III

4. При помощи ножниц отрежьте образец волос как можно ближе к коже головы (фото 5а и б).



Фотографии 5а и б. Обрезание образца возле кожи головы; (а) в положении сидя, (б) в положении лежа.  
© Instituto de Salud Carlos III



5. Заклейте конец скотча и укажите стрелкой направление к корню волос (фото 6а и б).



Фото 6а и б. Заклеивание скотча (а), прикрепление этикетки с указанием направления к корням волос (б).  
© Instituto de Salud Carlos III

Примечание: минимальное расстояние от скотча до ближайшего к коже головы отрезка волос зависит от анализируемого образца (в данном случае первые 3 см). На этом отрезке не должно быть скотча.

6. Поместите образец волос в бумажный конверт и прикрепите этикетку с идентификационным (ИД) кодом (фото 7).



Фото 7. Укладывание волос в бумажный конверт.  
© Instituto de Salud Carlos III

7. Повторите процедуру со вторым локоном, взятым с другой стороны затылка.

8. Поместите бумажный конверт в пластиковый пакет с застежкой (фото 8).



Фото 8. Укладывание конверта в пластиковый пакет с застежкой.  
© Instituto de Salud Carlos III

Примечание: чтобы обеспечить сбор необходимого количества волос, в обрезанных локонах должно быть около 250 волос. Однако образцы могут быть разного веса в зависимости от типа и длины волос. Минимальное необходимое количество волос следует уточнить в лаборатории, в которой будет проводиться анализ.

### 1.5.2. Волосы короче 3,5 см (1,4 дюйма)

Для иммобилизации образцов волос короче 3,5 см не следует использовать скотч, т.к. его не должно быть на анализируемом участке волос.

Процедура взятия образцов волос такой длины следующая.

1. Отрежьте 5-10 прядей волос в разных местах на затылке (фото 9a и b).

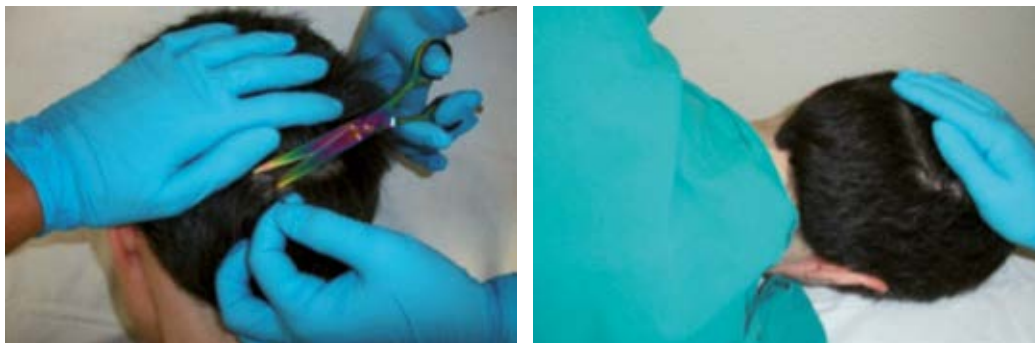


Фото 9a и b. Обрезание прядей волос; (a) в положении сидя, (b) в положении лежа.

© Instituto de Salud Carlos III

2. Поместите образец волос в бумажный конверт.
3. Повторяйте процедуру пока не соберете достаточное количество волос и пометьте бумажный конверт этикеткой с идентификационным кодом образца (фото 10a и b).

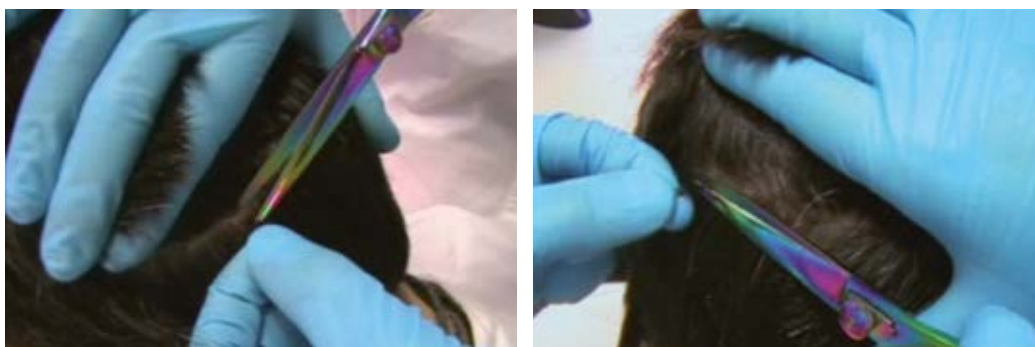


Фото 10a и b. Повторное обрезание прядей волос; (a) в положении сидя, (b) в положении лежа.

© Instituto de Salud Carlos III

4. Поместите бумажный конверт в пластиковый пакет с застежкой (фото 8).

Примечание: чтобы обеспечить сбор волос необходимого количества, национальный координатор обследования или ответственная лаборатория должны предоставить образец волос или фотографию в помощь работникам на местах; см. пример ниже.

Этого количества волос достаточно для прямого анализа ртути методом термического разложения - амальгамации золота - атомно-абсорбционной спектрометрии (фото 11).  
Примечание: в зависимости от метода анализа минимальное количество может меняться, поэтому его надо уточнять в проводящей анализ лаборатории.



Фото 11. Достаточное количество волос.

© Instituto de Salud Carlos III



### 1.5.3. Волосы длиной 3,5-5 см (1,4-1,97 дюйма)

При заборе проб волос такой длины, способ фиксации пряди определяется необходимостью избежать прилипание скотча к прикорневому участку (3 см от корня). Это требование будет меняться в зависимости от отрезка волос, подлежащего анализу.

Процедура взятия образцов волос такой длины следующая.

1. Подстригите волосы как можно ближе к коже головы, следуя инструкциям для волос длиной более 5 см.
2. При иммобилизации пряди убедитесь, что 3 см волос в прикорневой зоне доступны для анализа. Это можно сделать несколькими способами, три из которых описаны ниже.

#### *Первый вариант*

- a. Отрежьте кусочек скотча.
- b. Положите конец пряди на скотч (следите за тем, чтобы скотча не было на отрезке волос на расстоянии 3 см от кожи головы) (фото 12).



Фото 12. Прядь помещается на скотч.  
© Instituto de Salud Carlos III

- c. Положите другой кусочек скотча на первый.

#### *Второй вариант*

- a. Прикрепите прикорневой конец пряди волос к листку бумаги при помощи зажима (фото13).

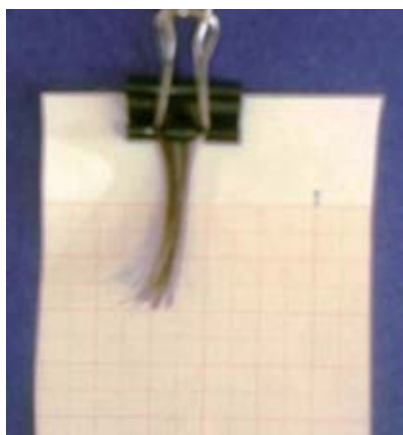


Фото 13. Фиксация пряди зажимом.  
© Instituto de Salud Carlos III

- b. Поместите образец волос в бумажный конверт и прикрепите этикету с идентификационным кодом.
- c. Повторите процесс со второй прядью, отрезанной с другой стороны затылка.
- d. Поместите бумажный конверт в пластиковый пакет с застежкой.

### Третий вариант

- a. Прикрепите прядь при помощи скоб как можно плотнее (фото 14).
- b. Убедитесь, что прядь полностью неподвижна.



Фото 14. Скрепление образца волос скобами.  
© Instituto de Salud Carlos III

## 1.6. Маркировка

Образец волос должен быть маркирован с указанием ИД кода и даты сразу же после забора проб. Эти две записи полезны в том случае, если одна из них была записана неправильно. Этикетка должна быть приклеена к первому контейнеру (бумажному конверту), если этикеток нет, код можно написать прямо на конверте.

## 1.7. Транспортировка и консервирование образцов

Образцы волос не требуют никаких специальных условий транспортировки; их можно перевозить при комнатной температуре. Однако следует проверять наличие соответствующей документации, идущей в комплекте с образцами, включая перечень всех образцов, а также информации о любом событии, произошедшем во время забора проб, которое может повлиять на результат анализа (приложение 1).

## 1.8. Прием образца

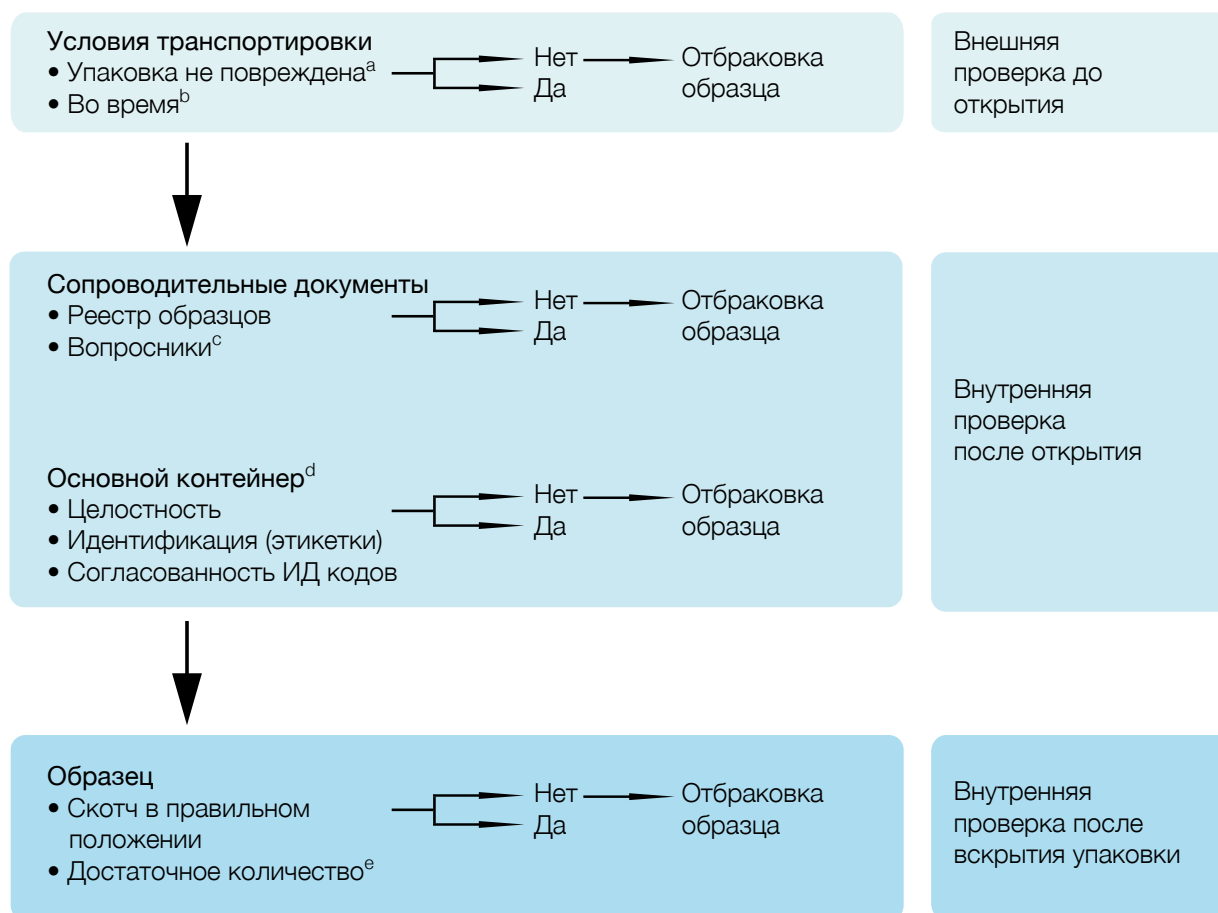
Критерии приема или отбраковки проб должны быть определены заранее и применены во время приема пробы. Эти критерии должны касаться условий транспортировки, сопроводительной документации, целостности упаковки, правильной идентификации и количества образцов (достаточно ли оно для анализа и биобанкинга, если образцы будут храниться и использоваться для других исследовательских целей).

Следующие пункты должны быть проверены при получении образцов.

- Целостность упаковки: упаковка должна быть правильно запечатана и не должна была подвергаться манипуляциям; на упаковке в месте забора проб может быть установлена защитная пломба.
- Сопроводительные документы: в упаковке должны находиться все образцы, перечисленные в реестре отобранных образцов (приложение 1); к ним должны прилагаться соответствующие документы (вопросники и т.д.).
- Правильная идентификация: полученные образцы и документы должны быть надлежащим образом идентифицированы при помощи соответствующего ИД кода (приложение 2).
- Количество и качество образцов: образцы должны быть собраны надлежащим образом (проверьте положение скотча и количество собранных волос).

Для выполнения единой процедуры и применения одних и тех же критериев ко всем полученным образцам, можно следовать плану, приведенному на рис.1.

Рис. 1. План приема образцов



<sup>a</sup> Упаковка должна быть правильно запечатана и не должна была подвергаться манипуляциям.

<sup>b</sup> Максимальный промежуток времени между взятием пробы и ее поступлением в лабораторию должен быть определен заранее.

<sup>c</sup> Если один или несколько вопросов в вопросниках имеют решающее значение для интерпретации результатов или являются критерием включения/исключения, их необходимо проверить.

<sup>d</sup> Следует проверить состояние полиэтиленового мешка с застежкой-молнией. Все образцы должны быть надлежащим образом идентифицированы, необходимо проверить соответствие ИД кодов образцов и вопросников.

<sup>e</sup> Размер образцов является критически важным моментом. Если образец недостаточного размера для проведения химического анализа, он должен быть отбракован.

Пример реестра приема проб содержится в приложении 3, а проверочные списки до и после забора проб – в приложениях 4 и 5.

## 1.9. Пробоподготовка/разделение на аликвоты

Все принятые образцы должны быть подготовлены к анализу и храниться в плотно закрытых полипропиленовых контейнерах во избежание порчи целевого анализируемого вещества и среды. Материалы, которые будут использоваться на этой фазе, перечислены в таблице 2.

В целях обеспечения конфиденциальности в лаборатории должны использоваться только цифровые идентификаторы проб. Однозначная идентификация образцов необходима для того, чтобы лабораторные результаты можно было связать с демографической информацией, информацией о питании и/или образе жизни, также собранной для целей исследования.

Таблица 2. Материал для разделения на аликвоты/подготовки образцов волос

Материал	Предназначение	Альтернатива
70% этиловый спирт	Для очистки щипцов и ножниц после обработки каждого образца.	
Латексные перчатки (без присыпки)	Используются в качестве гигиенической меры предосторожности.	Аналогичные одноразовые перчатки без присыпки, изготовленные из других материалов.
Графическая бумага	Образец для анализа должен быть отрезан от остальной части пряди.	Линейка.
Лабораторные щипцы	Для обращения с образцом.	Любой другой элемент, позволяющий правильно обращаться с образцом.
Ножницы	Образец волос, который будет анализироваться, надо разрезать на маленькие кусочки.	Любые чистые и острые ножницы соответствующего размера.
Шпилька	Используется для неподвижной фиксации пряди.	Любой другой предмет, позволяющий правильно зафиксировать прядь в неподвижном состоянии.
Полипропиленовый сосуд	Для хранения образцов волос.	Любой другой контейнер, защищающий образец от влаги.
Этикетки	Образцы должны быть однозначно идентифицированы.	Напишите ИД код несмываемым маркером.

ИД = идентификационный.

### 1.9.1. Образцы длинных волос зафиксированы в неподвижном состоянии

Зафиксированные в неподвижном состоянии образцы волос (т.е. образцы длиннее 5 см (1,97 дюйма) и образцы длиной 3,5-5 см (1,4-1,97 дюйма)) должны быть подготовлены следующим образом.

1. С помощью щипцов достаньте прядь волос из пакета с образцом.
2. Поместите прядь на лист графической бумаги, покрывающий рабочую поверхность, и зафиксируйте ее в неподвижном состоянии с помощью шпильки с противоположной прикорневому концу стороны (фото 15). Графическую бумагу необходимо менять после каждого образца.

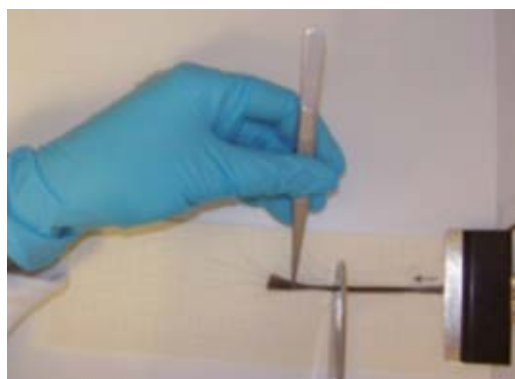


Фото 15. Закрепление образца в неподвижном состоянии при помощи шпильки.

© Instituto de Salud Carlos III

3. Отрежьте первые 3 см (или другую определенную длину для анализа) из прикорневого участка волос при помощи лабораторных щипцов.
4. Поместите этот сегмент в сосуд, маркированный кодом образца. Крышка должна быть маркирована тем же кодом. Оставшиеся волосы следует выбросить вместе с обычными отходами.
5. Измельчите образец на самые мелкие кусочки ножницами (фото 16).



Фото 16. Измельчение образца на мелкие кусочки.  
© Instituto de Salud Carlos III

6. Убедитесь, что конечный образец однороден (фото 17а и b).



Фото 17а и b. Обеспечение однородности образца. © Instituto de Salud Carlos III

7. Выполните аналогичную процедуру для остальных образцов.
8. Протирайте пинцет и ножницы 70% этиловым спиртом после каждого образца.
9. Для разделения волос на аликвоты взвесьте необходимое для лаборатории количество в полипропиленовом сосуде и отметьте на нем ИД код образца.

### 1.9.2. Образцы коротких волос без фиксации

Процедура подготовки образцов волос, которые не были зафиксированы в неподвижном состоянии (т.е. волосы короче 3,5 см (1,4 дюйма)), следующая.

1. Положите образец волос прямо в сосуд с помощью пинцета. Сосуд и пробка должны быть обозначены одним и тем же кодом.
2. Разрежьте волосы на мельчайшие кусочки ножницами.
3. Убедитесь, что конечный образец однороден.
4. Протирайте пинцет и ножницы 70% этиловым спиртом после каждого образца.
5. Для разделения волос на аликвоты взвесьте необходимое для лаборатории количество в полипропиленовом сосуде и отметьте на нем ИД код образца.

## 1.10. Хранение и консервирование

Образцы волос не нуждаются в специальных условиях хранения. Поэтому их можно хранить при комнатной температуре в сухом месте, например, в ящике или коробке.

Для обеспечения отслеживаемости образцов и аликвот необходимо разработать базу данных, включающую ИД код образца, ИД код аликвот при необходимости (например, внутренний код в соответствии с внутренней системой контроля качества), дату забора проб, дату разделения на аликвоты, а также (приблизительное) количество, оставшееся после анализа.

## 1.11. Контроль качества

### 1.11.1. Сопутствующие документы

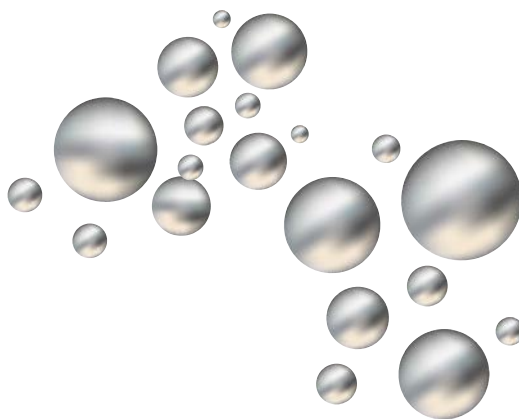
Возможность отслеживания выборки на протяжении всего обследования имеет решающее значение, поэтому этот аспект должен быть гарантирован. Как отмечалось выше, правильная маркировка образцов и связанных с ними документов имеет важное значение, но при этом необходимо также иметь возможность связать образец с информацией, предоставленной волонтером. С этой целью все документы, относящиеся к образцу (вопросники, реестры и т.д.), должны быть немедленно маркированы одним и тем же ИД кодом.

### 1.11.2. Проверочные списки

Сотрудники, проводящие обследование на местах, должны контролировать каждый этап процедуры забора проб для обеспечения высокого качества образцов. Помогают в этом проверочные списки, которые разрабатываются группой работников на местах в соответствии с каждой конкретной ситуацией.

Должны быть рассмотрены следующие контрольные точки.

- Предшествующий отбору проб этап: проверьте, что весь материал, необходимый для отбора проб, и все связанные с ним документы готовы к использованию (см. пример проверочного списка для этого этапа в приложении 4).
- Контроль после забора проб: проверьте, что для всех собранных образцов имеются соответствующие документы в упаковке для транспортировки. При этом необходимо проверить, что ИД коды документов соответствуют ИД кодам образцов. Работники на местах должны проверять правильность заполнения вопросников и реестров (см. пример проверочного списка для этого этапа в приложении 5).



## 2. Анализ содержания общей ртути в волосах человека

Для анализа содержания общей ртути в волосах человека используется множество аналитических методов, наиболее широко применяемыми из которых являются атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара (CVAAS) и атомно-флуоресцентная спектрометрия холодного пара (CVAFS). Некоторые методы, такие как нейтронно-активационный анализ или рентгеновская флуоресценция, позволяют проводить сегментарный анализ вдоль волос. Для анализа ртути в волосах используются также оптико-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICPOES), атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICPAES), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICPMS), атомно-абсорбционная спектрометрия с графитовой печью (GFAAS) и рентгеновское излучение, индуцированное частицами (PIXE). Большинство из этих методов требуют минерализации проб перед анализом, что повышает вероятность загрязнения или потерь. Напротив, использование методов прямого анализа твердых частиц, когда предварительной обработки пробы не требуется, имеют такие преимущества, как образование очень небольшого объема химических отходов и гораздо меньше возможностей загрязнения. Кроме того, количество волос, необходимых для анализа, может быть уменьшено, что увеличивает скорость обработки образцов. Эти преимущества делают прямой анализ содержания ртути с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии очень полезным методом для анализа волос в исследованиях на основе БМЧ (7). Этот метод сочетает в себе сжигание, амальгамацию золота и выявление ртути с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии и требует минимальной пробоподготовки (8).

Необходимость промывки образцов волос – спорный вопрос. Эту необходимость обосновывают тем, что на поверхности волос может находиться ртуть, присутствующая в атмосфере. В идеале при промывке должна удаляться только внешняя ртуть, оставляя внутреннее загрязнение нетронутым. Включение этапа мытья волос в процедуру анализа означает дополнительные манипуляции с образцом и, следовательно, возможность потери ртути или загрязнения образца.

Были испытаны различные методы промывки с использованием разных растворителей, и было доказано, что при некоторых из них внутренняя ртуть может удаляться (9-11). Вопрос о промывке проб волос следует рассматривать при проведении анализа в некоторых «горячих точках», где основным источником воздействия ртути является не потребление рыбы, а кустарная добыча золота, проживание вблизи промышленных объектов (например, угольных электро- и теплоэлектростанций, хлорщелочных заводов и т.д.) или в местах удаления отходов ртути (12). При этом в вопросник обследования следует включить конкретные вопросы для оценки этого потенциального воздействия.

Метод, описанный в настоящих СОП, позволяет надежно и точно определить общее содержание ртути в образцах волос в типичных диапазонах концентрации в случаях воздействия ртути, находящейся в окружающей среде или на рабочем месте.

Поскольку этот метод не требует предварительной обработки или извлечения проб, ожидается очень малое количество химических отходов, а вероятность загрязнения минимальна. Небольшое количество используемых проб волос и короткое время анализа обеспечивают высокую скорость обработки образцов.

Хотя для этой процедуры рекомендуется стандартное количество пробы 3,0-6,0 мг, лаборатория может установить свои собственные значения с учетом используемого оборудования, разработки и проверки метода анализа и ожидаемых значений для своих проб.

Особое внимание следует обратить на количество волос, полученных в лаборатории для анализа, так как слишком малое количество волос может быть недостаточно для проведения теста. В связи с этим настоятельно рекомендуется запрашивать как минимум 300 мг волос.

Предел количественного определения (ПКО) для описанных методов должен составлять не менее 0,01 нанограммов ртути на миллиграмм волос, чтобы избежать проблем с количественным определением ртути в группах населения, подвергающихся низкому уровню воздействия этого загрязняющего вещества.

ПКО 1 нг ртути был установлен при помощи конфигурации двух измерительных ячеек, как описано в данном документе. Так как максимальный вес образца с конфигурацией оборудования, описанной в данных СОП, составляет 100 мг, можно достичь ПКО на уровне 0,01 нг/мг. Нижние пределы обнаружения (ПО) могут быть достигнуты при необходимости с помощью приборов с третьей измерительной ячейкой.

Особое внимание следует обратить на коэффициенты восстановления для самых низких уровней, так как приемлемые коэффициенты восстановления всегда выше 80%.

Самый высокий уровень для градуировочного графика, используемого в данном методе анализа, составляет 25 нг ртути, хотя калибровочные уровни могут быть изменены лабораторией при валидации метода.

Несмотря на то, что анализатор ртути может достигать уровней до 1000 нг ртути, такие уровни не являются обязательными для определения ртути в пробах волос, поэтому они здесь не рассматриваются.

Показатели линейности, точности, достоверности и погрешности были определены для каждого уровня градуировочного графика. Каждая лаборатория должна установить свои уровни для валидации метода, однако при этом необходимо включить как минимум один уровень концентрации, близкой к ПКО.

В тех случаях, когда лаборатории располагают другим оборудованием для обнаружения ртути при помощи разложения проб волос в кислоте, рекомендуется следовать инструкциям, предоставленным производителями приборов. Приводимые в настоящих СОП инструкции по забору проб и обращению с ними, подходят для использования по назначению независимо от того, какое оборудование применяется для выявления ртути. ПКО и ПО должны быть проверены на соответствие образцам волос.

## 2.1. Сфера применения метода

Описанный в настоящих СОП метод позволяет быстро и достоверно определить количество ртути в волосах человека. Диапазон результатов количественного анализа составляет 1-25 нг общей ртути.

## 2.2. Технический принцип

В настоящих СОП уровень концентрации ртути в волосах определяется методом термического разложения - амальгамации золота - атомно-абсорбционной спектроскопии, который является очень чувствительным и селективным аналитическим методом, хорошо подходящим для анализа на следовом уровне. Этот метод широко используется в обследованиях на основе БМЧ, направленных на изучение длительного воздействия ртути посредством выявления очень низких концентраций в пробах, забранных неинвазивным способом.

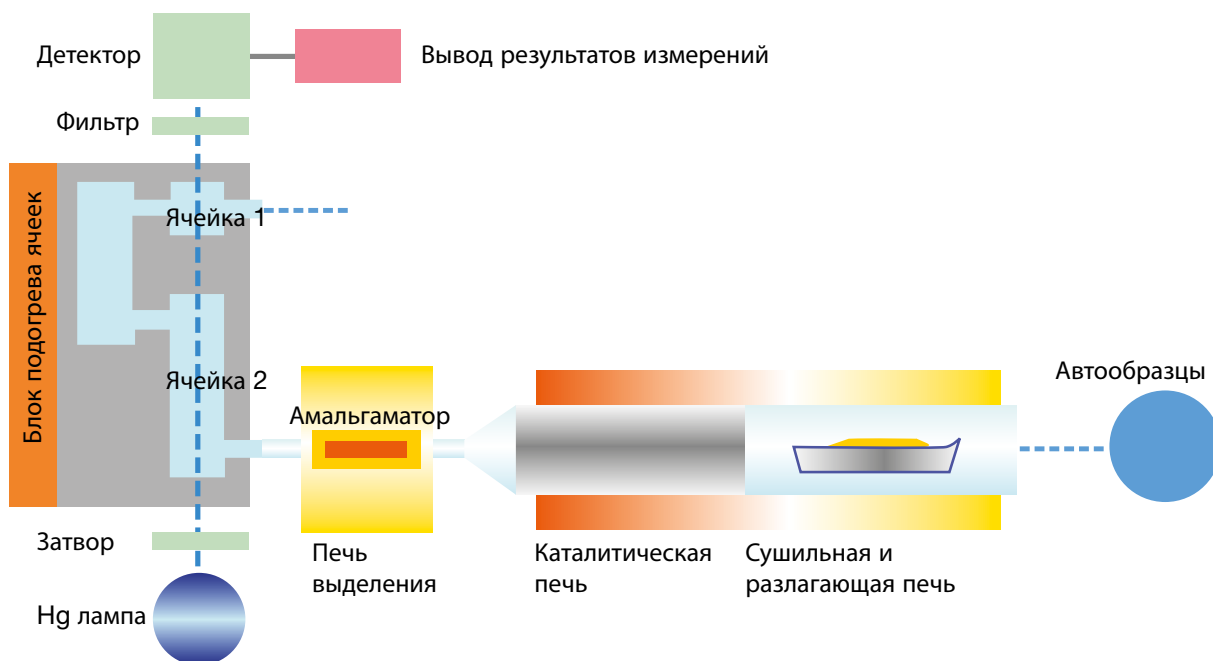
Образцы волос взвешивают и вводят в пробоотборник без предварительной обработки. Затем проба вводится в прямой анализатор ртути (рис. 2), где она сначала высушивается, а затем термически разлагается под действием непрерывного потока кислорода. Продукты сгорания переносятся и далее разлагаются на горячем слое катализатора. Пары ртути улавливаются в амальгаматоре золота и затем десорбируются для количественного определения. Содержание ртути определяется методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии при 254 нм.

Количественное определение ртути осуществляется при помощи градуировочного графика, построенного на основе измерений референтных материалов волос человека, анализируемых таким же образом, как и образцы волос.

Прямой анализатор ртути может быть сконфигурирован различными способами в зависимости от типа и модели. Для описанной здесь процедуры была использована стандартная версия, оснащенная двумя измерительными ячейками с разной длиной пути потока. Ориентировочные значения для рабочих диапазонов двух измерительных ячеек составляют 0-20 нг ртути (низкий диапазон) и 20-1000 нг ртути (высокий диапазон).



Рис. 2. Прямой анализатор ртути



Hg = ртуть.

*Примечание:* стандартная модель анализатора Milestone DMA-80 (нарисованная здесь) оснащена двумя измерительными ячейками, ртутной лампой и ртутным детектором.

*Источник:* Milestone (13).

## 2.3. Меры предосторожности

Необходимо принимать следующие меры предосторожности при анализе общей ртути в волосах человека.

- При работе с волосами не нужно принимать специальных мер предосторожности в отношении биологических опасностей.
- Работа со всеми растворами должна осуществляться в перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- Особую осторожность следует проявлять с концентрированной соляной кислотой, так как она является едким химическим веществом, которое может вызвать серьезные повреждения глаз и кожи.
- Возможные опасности, связанные с использованием оборудования, включают воздействие ультрафиолетового излучения, высокого напряжения и высоких температур.

## 2.4. Оборудование, материалы и растворы

### 2.4.1. Оборудование

Для анализа общей ртути в волосах человека необходимо следующее оборудование:

- прямой анализатор ртути (напр. Milestone DMA-80).

### 2.4.2. Материалы

Для анализа общей ртути в волосах человека необходимы следующие материалы:

- аналитические весы (с разрешением 0,01 мг);
- микропипетка, регулируемая в диапазоне от 100 до 1000 мкл;

- ножницы;
- шпатель;
- никелевые лодочки, 0,5 мл;
- кварцевые лодочки, 1,5 мл;
- антистатические щипцы;
- лотковый конвейер для проб;
- мерная колба объемом 100 мл;
- перчатки без талька.

### 2.4.3. Реагенты, химикаты и газы

Для анализа общей ртути в волосах человека необходимы следующие реагенты, химикаты и газы:

- газообразный кислород (чистота 99,995%);
- 70% этиловый спирт (чистый для анализа);
- 37% соляная кислота (чистая для анализа);
- очищенная вода (бидистиллированная вода).

### 2.4.4. Растворы

Для анализа общей ртути в волосах человека необходим следующий раствор:

- 0,37% соляной кислоты (добавьте пипеткой 1 мл 37% соляной кислоты в мерную колбу объемом 100 мл, затем заполните ее до номинального объема сверхчистой водой).

### 2.4.5. Калибровочные стандарты

Используются два стандартных образца волос с разными уровнями содержания ртути. Используемые в этих СОП стандартные образцы:

- NIES CRM № 13 (NIES-13):  $4,42 \pm 0,20$  нг/мг;
- Стандартные образцы МАГАТЭ-086: 0,573 (0,534-0,612) нг/мг.

## 2.5. Калибровка

Калибровка производится с использованием стандартных образцов волос человека NIES-13 и МАГАТЭ-086 с содержанием ртути в диапазоне 1-25 нг.

В таблице 3 указан приблизительный вес референтного материала, который следует взвешивать в трех экземплярах для каждой точки калибровки.

Затем калибровочные стандарты измеряются в аналогичных условиях, что и образцы. Параметры квадратичного уравнения и коэффициент корреляции  $r_2$  рассчитываются на полученном в результате градуировочном графике. Эти параметры должны соответствовать диапазонам, установленным при валидации метода.

Частота калибровки должна определяться каждой лабораторией. В качестве ориентировочного значения новую калибровку следует проводить каждые три месяца. Новая калибровка должна выполняться также в том случае, если значения контрольного образца не попадают в установленный диапазон.

Таблица 3. Вес референтных материалов

Hg (нг)	Референтный образец	Вес (мг)
0		0,00
1	МАГАТЭ-086	1,75
2,5	МАГАТЭ-086	4,36
5	МАГАТЭ-086	8,73
10	NIES 13	2,26
15	NIES 13	3,39
20	NIES 13	4,53
25	NIES 13	5,66

Hg = ртуть, МАГАТЭ = Международное агентство по атомной энергии, NIES = NIES Национальный институт экологических исследований.

## 2.6. Процедуры

### 2.6.1. Условия для аналитического оборудования.

#### Технические данные

Технические данные для аналитического оборудования:

- метод: атомно-абсорбционная спектрометрия;
- система выявления ртути: однолучевой спектрофотометр с последовательным потоком через две измерительные ячейки;
- источник света: ртутная лампа низкого давления;
- длина волны: 253,65 нм;
- фильтр помех: 254 нм, полоса пропускания 9 нм;
- детектор: кремниевый ультрафиолетовый фотодетектор;
- автопробоотборник: встроенный, 40 положений;
- газ-носитель: кислород, входной газ 4 бар (60 фунтов на кв. дюйм), скорость потока около 200 мл/мин.

Перечисленные здесь технические данные были установлены во время конфигурации используемого в данном случае прибора.

#### Этап 1. Подготовка прямого анализатора ртути

Следующие операции необходимо выполнять в соответствии с руководством для пользователя: подача кислорода, запуск прямого анализатора ртути и создание файла данных.

#### Этап 2. Чистка системы

Пустая позиция должна измеряться соответствующим методом. Перечисленные здесь условия измерения были установлены для конфигурации используемого в данном случае прибора и должны быть оптимизированы для других приборов в соответствии с указаниями изготовителя:

- время сушки: 10 секунд;
- температура сушки: 200 °С;

- время разложения: 240 секунд;
- температура разложения: 650 °С;
- время очистки: 60 секунд.

Выполнение этого этапа повторяется до тех пор, пока не будут получены два последовательных значения поглощения ниже 0,003. Если желаемый фоновый уровень не достигнут, прямой анализатор ртути следует очистить путем анализа раствора соляной кислоты (0,37%) в кварцевой лодочке для сжигания, а затем повторить этап очистки всей системы.

### Этап 3. Специальная проверка системы

Три пустые никелевые лодочки для сжигания должны быть проанализированы по предыдущему методу. Полученные значения абсорбции должны быть меньше 0,003, в противном случае необходимо очистить лодочку.

### Этап 4. Контроль качества до проведения измерений

Два образца сертифицированного референтного материала МАГАТЭ-086, содержащего около 5 нг ртути (около 8,7 мг материала), должны быть проанализированы при обеспечении следующих параметров (ориентировочные параметры, которые необходимо оптимизировать для других приборов в соответствии с инструкциями изготовителя):

- температура сушки: 200 °С;
- время сушки: 60 секунд;
- температура разложения: 650 °С;
- время разложения: 150 секунд;
- время очистки: 60 секунд.

Концентрация, определенная для второго образца референтного материала, должна быть в пределах погрешности для этой точки, описанной в процессе валидации метода. Если это не так, то измерения следует повторять до тех пор, пока не будет получено значение в этом диапазоне. Если такое значение не получено после пяти попыток, следует провести повторную калибровку системы.

После успешного завершения предыдущих четырех этапов прямой анализатор ртути готов к анализу пробы.

## 2.6.2. Аналитическое определение

### Взвешивание образца

При обращении как с лодочками для сжигания, так и с опорой, используемой для взвешивания образцов волос, необходимо использовать пинцет.

Установите опору для лодочки сжигания на весы. Поместите никелевую лодочку для сжигания на опору и обнулите весы.

Откройте колбу, содержащую образец, и с помощью лопаточки переместите небольшие порции волос на лодочку до достижения веса 3,0-6,0 мг.

Поместите лодочку с образцом на лоток и запишите код образца, вес и положение лотка в журнале взвешивания. Для каждого образца должны быть подготовлены три копии для параллельных измерений.

Лопатку необходимо очищать 70% этиловым спиртом после работы с каждым образцом.

Чтобы убедиться, что анализатор измеряет правильно, контрольные пробы, состоящие из референтного материала соответствующего веса, который будет случайным образом изменяться

между точками градуировочного графика, должны взвешиваться после анализа трех испытуемых образцов (девять лодочек для сжигания).

### Анализ образцов

Никелевые лодочки для сжигания с испытуемыми и контрольными образцами должны быть помещены в автопробоотборник прямого анализатора ртути в том порядке, в котором они взвешивались.

Затем необходимо запрограммировать анализ испытуемых и контрольных образцов путем ввода их кода и веса, а также выбора метода анализа и последней действующей калибровки для волос человека. Параметры метода следующие (ориентировочные параметры должны быть оптимизированы для других приборов в соответствии с инструкциями производителя):

- температура сушки: 200 °С;
- время сушки: 60 секунд;
- температура разложения: 650 °С;
- время разложения: 150 секунд;
- время очистки: 60 секунд.

При таких условиях анализ каждого образца займет около пяти минут.

#### 2.6.3. Вычисление аналитических результатов

Данные регистрируются непосредственно аппаратурой и выражаются в нанограммах ртути на миллиграмм волос (нг Hg/мг) путем интерполяции измерений на градуировочный график.

Окончательное регистрируемое значение соответствует среднему значению трех параллельных измерений одного образца. Стандартное отклонение этих измерений может быть рассчитано по следующей формуле.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

SD – стандартное отклонение

$c_i$  – значение отдельного образца  $\bar{c}$  – среднее значение

$n$  – число измерений

Погрешность измерений может быть рассчитана при помощи формулы, выведенной в процедуре валидации метода.

#### 2.6.4. Диапазон регистрируемых результатов

Подлежат регистрации значения ртути в диапазоне между ПКО (1 нг ртути) и наивысшим калибровочным стандартом (25 нг ртути).

Если количество ртути, выявленное в образце, выходит за пределы этого диапазона, необходимо провести повторное тестирование образца следующим образом.

- Если значение ниже 1 нг (наименьший уровень концентрации ртути, включенный в калибровку), то, исходя из полученного уровня концентрации, необходимо взвесить необходимое количество волос для трех новых параллельных измерений, чтобы получить новое определение в пределах калибровочного диапазона. С учетом органического содержания пробы и вместимости используемых никелевых лодочек максимальный размер пробы, который может быть введен в прямой анализатор ртути DMA-80, составляет 100 мг.
- Если значение выше 25 нг (самое высокое стандартное значение ртути, включенное в калибровку), то, исходя из полученного уровня концентрации, необходимо взвесить необходимое количество волос для трех новых параллельных измерений, чтобы получить новое определение в пределах калибровочного диапазона. Образец должен весить не менее 1 мг.

Действительными считаются только те измерения, которые были получены между двумя контрольными образцами, значения которых лежат в пределах установленного диапазона (заданное значение для референтного материала  $\pm$  погрешность в этом уровне). Необходимо заново откалибровать оборудование, если значения для контрольных образцов не попадают в установленный диапазон.

Если концентрация, определенная при одном параллельном измерении, не находится в диапазоне, определенном по среднему значению  $\pm$  погрешность, то для определения того, следует ли отсеивать подозрительное значение, нужно применять тест Диксона.

$$Q = \frac{X_{\text{suspected}} - X_{\text{nearest}}}{X_{\text{highest}} - X_{\text{lowest}}}$$

Q – значение Q для оценки при помощи Q-теста Диксона

X – одиночное значение (подозрительное значение, ближайшее к подозрительному значению, наибольшее и наименьшее значение)

Если значение Q больше или равно 0,970, то подозрительное значение может быть отброшено, а уровень концентрации рассчитан как среднее из двух оставшихся значений. Если оно ниже, необходимо повторить анализ пробы.

## 2.7. Контроль качества

Точность и достоверность анализов биомаркеров, проводимых токсикологическими лабораториями, необходимо постоянно проверять посредством применения мер по обеспечению качества.

В целом, обеспечение качества в лабораториях включает внутренний и внешний контроль качества (см. также программу контроля качества биомониторинга воздействия ртути на человека).

### 2.7.1. Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества служит для систематического контроля повторяемости, проверки случайных ошибок и оценки достоверности количественных лабораторных исследований.

На практике повторяемость контролируется с помощью контрольного материала (референтного материала), который измеряется в рамках каждой аналитической серии. Результаты внутреннего контроля качества, проводимого ежедневно или для каждой партии, заносятся в контрольные диаграммы.

Если контрольного материала нет в продаже, его можно приготовить путем добавления в имеющийся биологический материал (кровь, моча и т.д.) определенного количества аналита (биомаркера). Аликвоты такого материала могут быть использованы как для внутреннего контроля качества, так и для программ межлабораторных сличений. Доказано, что эти аликвоты остаются однородными при определенных условиях хранения и транспортировки, при этом концентрация аналита остается неизменной. Контрольный материал должен охватывать весь диапазон концентраций (напр., низкое, среднее и высокое значение Q), а также включать в себя холостые пробы.

Достоверность желательно проверять с помощью сертифицированного референтного материала (CRM). CRM — это материал (биологический материал), содержащий сертифицированный уровень концентрации одного или более аналитов. Сертификация проводится в рамках программы, которая используется для анализа контрольных материалов лабораториями, обладающими высокой квалификацией в области анализа биомаркеров.

Сертифицированное значение устанавливается для каждого аналита после процедуры проверки,

которая включает в себя экспертное заключение, а также статистические процедуры. Поэтому CRM дорого стоит и должен использоваться только при проверке или переоценке аналитического метода.

При выполнении данных СОП материалы контроля качества используются для того, чтобы оценить точность и достоверность процесса анализа и определить, дает ли аналитическая система приемлемые результаты, которые являются точными и достоверными.

Для оценки настоящего метода использовались два референтных материала, содержащих различные уровни ртути, а именно референтные материалы NIES CRM No.13 (4,42 нг/мг) и МАГАТЭ-086 (0,573 нг/мг).

Контрольные образцы определенного веса, который случайным образом изменяется между точками градуировочного графика, анализируются через каждые три образца (девять измерений).

Действительными считаются только те измерения, которые были получены между двумя референтными образцами, значения которых лежат в пределах установленного диапазона (заданное значение для референтного материала  $\pm$  погрешность на этом уровне).

Два слепых образца волос анализируются каждый год в рамках программы внутреннего контроля качества.

### 2.7.2. Внешний контроль качества

Внешний контроль качества является средством улучшения сопоставимости и достоверности аналитических результатов. Сопоставимость — это предпосылка достоверности, благодаря которой обеспечивается возможность сравнения аналитических результатов разных лабораторий между собой и с соответствующими предельными значениями. Сопоставимые и достоверные результаты БМЧ необходимы для достижения равных условий для профилактики заболеваний независимо от лаборатории, в которой анализируется биологический образец.

Межлабораторные сличительные испытания (МСИ) выступают в качестве средства гармонизации методов анализа и их применения, тем самым улучшая сопоставимость результатов анализа. Для этой цели могут использоваться контрольные материалы (референтные материалы). МСИ необходимы даже в тех случаях, когда лаборатории используют одни и те же аналитические СОП.

Схема внешней оценки качества (EQUAS) – одно из средств повышения достоверности аналитических результатов. Для этой цели контрольный материал обычно анализируется в референтных лабораториях, продемонстрировавших высокий уровень подготовки для проведения анализа конкретного биомаркера. Результаты, полученные в референтных лабораториях, берутся за основу определения заданных значений и диапазонов допусков для каждого из исследуемых биомаркеров. Лаборатории, участвующие в EQUAS, имеют сертификаты для результатов, которые попадают в диапазоны допусков.

Внешний контроль качества осуществляется посредством участия в круговых обследованиях (три раза в год). В качестве примера можно привести регулярное участие в Многоэлементной схеме внешней оценки качества провинции Квебек (QMEQAS), организуемой Centre de Toxicologie du Quebec – Institut National de Santé Publique (Канада).

## 2.8. Оценка метода

### 2.8.1. Функция реагирования

Взаимосвязь между ответом аналитического прибора и уровнем концентрации или количеством аналита, введенного в прибор, называется «градуировочный график».

В рамках настоящих СОП ответ метода тестируется для диапазона 0-25 нг ртути, а для градуировочного графика устанавливается квадратичная регрессионная модель.

Полученные данные статистически анализируются для расчета регрессионной кривой и коэффициента детерминации.

Должна быть получена кривая с коэффициентом детерминации выше 0,997.

### 2.8.2. Точность

Это мера степени расхождения аналитических результатов из-за случайных ошибок.

Точность описывается статистически с помощью стандартного отклонения или доверительного интервала. Можно различить следующее:

- точность при повторяющихся условиях (повторяемость);
- точность при сопоставимых условиях (воспроизводимость).

Необходимо определить материалы, используемые при проведении этих измерений, и методы расчета.

Различные уровни ртути, используемые при калибровке (см. раздел 2.5), изменялись в трех экземплярах в течение 16 различных дней двумя разными аналитиками для установления точности для каждого уровня (как показано в таблицах 4-6).

Таблица 4. Максимально допустимое стандартное отклонение

Концентрация (нг Hg)	RSDrepro	RSDrepet
1	4,9	6,4
2,5	4,1	4,9
5	3,4	3,6
10	1,2	2,3
15	0,8	1,4
20	0,5	0,9
25	0,3	1,1

Hg = ртуть; нг = нанограмм; RSDrepet = относительное стандартное отклонение для повторяемости; RSDrepro = относительное стандартное отклонение для воспроизводимости.

### 2.8.3. Достоверность

Это мера отклонения измеренного значения от правильного («истинного») значения вследствие систематической ошибки. Для проверки достоверности какого-либо метода могут быть использованы следующие подходы:

- проведение тестов методом «введено-найденно» (процедуры добавки);
- участие в межлабораторных сличительных исследованиях, при которых теоретическое значение определяется уполномоченными референтными лабораториями;
- сравнение проверяемой аналитической процедуры с референтной процедурой, сертифицированной для определения параметра в соответствующей матрице пробы;
- сравнение результатов анализа для СРМ с сертифицированным референтным значением.

В нашем случае для определения достоверности метода использовали два стандартных образца волос, содержащих различные уровни ртути, а именно NIES CRM No.13 (4,42 42 нг/мг) и МАГАТЭ-086 (0,573 573 нг/мг).

Различные уровни ртути, используемые при калибровке (см. раздел 2.5), измерялись для



определения показателя достоверности для каждого уровня. Сводные данные об относительной степени извлечения приведены в таблице 5.

**Таблица 5. Уровни концентрации ртути и степень извлечения**

Концентрация (нг Hg)	Степень извлечения (%)	Диапазон (%)
1	101,7	83,2-131,0
2,5	99,5	88,5-126,2
5	100,9	94,5-135,7
10	98,5	88,2-102,7
15	100,6	97,7-106,7
20	100,4	97,8-103,1
25	99,7	97,1-130,2

Hg = ртуть; нг = нанограмм.

Степень извлечения с учетом погрешности измерений должна включать 100%. Если это не так, то начальная точка концентрации градуировочного графика должна быть переоценена в соответствии с ПКО, полученным для данного метода.

#### 2.8.4. Погрешность измерений

Это определяется как общий доверительный интервал или прогностический диапазон измеренных результатов после учета возможных ошибок. Стандартная погрешность измерений эквивалентна стандартному отклонению ряда измерений. При определении комбинированной стандартной погрешности измерений учитываются все рабочие этапы, коэффициенты помех и факторы влияния, а также их взаимовлияние. Расширенная погрешность измерений включает в себя функцию доверительного интервала.

Погрешность для каждого из оцениваемых уровней ртути приведена в таблице 6.

**Таблица 6. Концентрации ртути и уровень погрешности измерений**

Концентрация (нг Hg)	Погрешность (%)
1	18,0
2,5	11,3
5	10,0
10	5,5
15	4,9
20	4,7
25	4,6

Hg = ртуть; нг = нанограмм.

Погрешность измерений рассчитывается в соответствии с документами *EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing* (EA-4/16) [Руководство по выражению погрешности при количественном тестировании] (14) и *Guide to the expression of uncertainty in measurement* [Руководство по выражению погрешности измерений] (15).

### 2.8.5. Предел количественного определения

Нижний ПКО указывает на наименьшую возможную концентрацию аналита, которая может быть определена с заранее заданной погрешностью (обычно 33%). Верхний ПКО указывает на наибольшую возможную концентрацию аналита, которая может быть определена.

ПКО должен быть включен в градуировочный график и может быть рассчитан различными методами.

#### Определение соотношения сигнал/фоновый шум

Фоновый шум определяется следующим образом.

- Интенсивность фонового шума ( $s_0$ ) определяется по отношению к аналиту.
- ПО рассчитывается как среднее значение интенсивности фонового шума, умноженное на 3 ( $ПО = 3 \times s_0$ ).
- ПКО вычисляется как среднее значение интенсивности фонового шума, умноженное на 9 ( $ПКО = 9 \times s_0$ ).

#### Другие процедуры

Следует отметить, что на выбор метода и используемого подхода влияют холостые значения в нативных образцах:

- процедура получения стандартного отклонения (согласно EURACHEM);
- процедура получения холостого значения (в соответствии с DIN 32 645);
- процедура построения градуировочного графика (в соответствии с DIN 32 645).

В данных СОП ПКО рассчитывается посредством построения градуировочного графика, и полученный результат ниже наименьшего значения графика, а именно 1 нг ртути, поэтому это и будет применяемый ПКО.

Если учитывать, что максимальный вес образца составляет 100 мг, то ПКО концентрации составляет 0,01 нг ртути/мг волос.

## 3. Интерпретация данных

Токсичность метилртути относится к проблемам общественного здравоохранения, вызывающим большую обеспокоенность, поскольку все население подвергается ее воздействию через продукты питания. Особую озабоченность вызывает проблема воздействия метилртути на развивающийся плод, очень маленьких детей, беременных женщин и женщин детородного возраста, поскольку это химическое вещество может проходить через плаценту и гематоэнцефалический барьер, что оказывает серьезное негативное влияние на развивающуюся нервную систему. Хотя о неврологических эффектах метилртути уже давно хорошо известно, сложность оценки вредного хронического воздействия ртути, находящейся в окружающей среде, затрудняет установление соответствующих значений на основе влияния на здоровье. Особенно это связано с тем, что диапазон и масштабы неврологического воздействия метилртути варьируется в зависимости

от временного интервала, в течение которого происходит воздействие. Было отмечено, что у взрослых негативному влиянию в основном подвергаются определенные области мозга, в то время как воздействие на этапе развития организма приводит к более продолжительным и широкомасштабным последствиям. В этом случае затрагиваются процессы нейронного деления и миграции, и изменяется цитоархитектоника развивающегося мозга (16-18). Ввиду такой разницы в ущербе здоровью клинические проявления также различаются, что можно было наглядно наблюдать в городе Минамата после крупномасштабного отравления населения ртутью. Так, у взрослых наблюдалась потеря чувствительности конечностей, атаксия, проблемы со слухом и зрением, потеря равновесия, неразборчивость речи, а в тяжелых случаях – потеря сознания и смерть. У детей, родившихся после инцидента, последствия были еще более тяжелыми с рядом широко распространенных эффектов, включая умственную отсталость, плохие рефлексы, нарушение функций мозжечка, нарушения роста и питания, дизартрия и деформация конечностей, а в 75-95% случаев – гиперкинезия, гиперсаливация, косоглазие, расстройства пирамидальной системы и пароксизмальные расстройства (19).

И хотя о воздействии метилртути на человека много стало известно после инцидента в городе Минамата, ситуация в области изучения воздействия метилртути, находящейся в окружающей среде совершенно иная. Уровни воздействия метилртути на популяцию в целом в результате потребления рыбы значительно ниже уровней воздействия метилртути, находившейся в рыбе после сбросов ртути в залив Минамата, что значительно затрудняет оценку неблагоприятных последствий. Сложности возникают в связи с трудностью определения и оценки неврологических последствий, таких как пониженный интеллектуальный коэффициент, которые могут быть малозаметными и неспецифическими. Может также иметь место взаимодействие между неблагоприятным воздействием метилртути и питательными веществами, находящимися в рыбе. Рыба – это высококачественный продукт питания, благодаря которому в организм человека поступают полиненасыщенные кислоты и другие питательные вещества, которые необходимы для правильного развития нервной системы и могут противодействовать неблагоприятному воздействию метилртути (20,21). Это одна из гипотез, которая была предложена для объяснения различий результатов исследований, проведенных в Новой Зеландии, а также на Фарерских и Сейшельских островах. Эта неопределенность в отношении последствий воздействия низкого уровня также относится и к другим неблагоприятным эффектам, связанным с воздействием метилртути (например, сердечно-сосудистые и иммунологические последствия) (22).

В свете вышеизложенного интерпретация результатов тестов по измерению концентрации ртути в волосах затруднена, о чем свидетельствует отсутствие общепринятого значения, разработанного на основе оценки влияния на здоровье, для обоснования интерпретации данных.

Для интерпретации результатов тестов по измерению концентрации ртути в волосах требуется сбор основных данных о воздействии ртути. Эту информацию можно собрать, включив некоторые конкретные вопросы в эпидемиологический вопросник. Поскольку пища является важным источником воздействия ртути, находящейся в окружающей среде, а некоторые питательные вещества влияют на ее усвоение, вопросник должен содержать разделы, посвященные характеристике рациона питания (12,22-25). Уровень концентрации метилртути в рыбе зависит от вида и размера рыбы, а также от региона, в котором она была поймана (26-29), поэтому у опрашиваемых следует спросить о видах потребляемой рыбы и частоте потребления.

Если предположить, что волосы растут со скоростью 1 см в месяц, то длина анализируемого сегмента волос даст информацию об экспозиции на разных промежутках времени. Рацион питания может меняться в зависимости от времени года, следовательно, уровень ртути в волосах также может меняться, поэтому целесообразно включить вопросы о рационе питания в разное время года (например, частота регулярного потребления и в течение последних трех месяцев).

### 3.1. Значения, необходимые для интерпретации

Определение референтных значений на основе анализа данных БМЧ позволяет проводить сравнение между разными группами населения. Эти значения представляют собой уровень химической концентрации в отдельной группе (или подгруппе) населения вследствие воздействия

в определенный промежуток времени и вычисляются при помощи анализа уровней концентрации в волосах, крови и моче или других биосредах. Референтные значения обычно основаны на 90-ом или 95-ом процентиле и соответствующем 95% доверительном интервале (30,31) и могут быть репрезентативными для населения в целом или только для конкретных групп населения. Однако их следует пересматривать и уточнять, т.к. они характеризуют определенную группу населения в конкретный отрезок времени, и на них могут влиять такие факторы, как возраст, географический регион, привычки и образ жизни, генетические полиморфизмы и даже усовершенствованные аналитические методы (32).

Референтные значения — это статистическое описание типичных диапазонов концентраций, наблюдаемых у референтных групп населения, но они не основаны на оценке влияния на здоровье (31). Для интерпретации уровней какого-либо соединения в организме человека с токсикологической точки зрения, необходимо определить ориентировочные значения, разработанные на основе оценки влияния на здоровье. Хотя предпочтительно использовать значения БМЧ, определенные Немецкой комиссией по биомониторингу человека, такие значения были определены только для нескольких соединений. Эти значения БМЧ предоставляют четкую шкалу для интерпретации отдельных результатов и действий, которые необходимо предпринять, в зависимости от того, находятся ли они выше или ниже значений БМЧ I или БМЧ II.

К другим ориентировочным медико-санитарным значениям, способствующим интерпретации данных БМЧ, относятся так называемые «эквиваленты биомониторинга». Они определяются как уровни концентрации химического вещества (или метаболита) в волосах, крови, моче или других тканях, соответствующие ориентировочным значениям воздействия, таким как переносимое суточное поступление (TDI), референтная доза (RfD), референтная концентрация (RfC) или дозы, связанные с конкретным видом риска (26). Однако эквиваленты биомониторинга не дают порогового значения, позволяющего проводить различие между безопасным и небезопасным уровнем воздействия, и не позволяют предсказывать неблагоприятные последствия превышения этого значения. Поэтому их не следует использовать для интерпретации отдельных данных с целью предсказания возможных негативных эффектов (33).

В том, что касается содержания ртути в волосах, определенное значение БМЧ отсутствует. Значение БМЧ для содержания ртути в крови было получено Немецкой комиссией по биомониторингу человека на основе концентрации ртути в волосах, составляющей 5 мг/кг (34), и поэтому может быть использовано для определения уровня ртути в волосах. В таблице 7 приведены значения, полученные в различных учреждениях, которые обычно используются при интерпретации уровней содержания ртути в волосах. Однако следует отметить, что эти значения определяются для уязвимых групп населения (детей, женщин детородного возраста, беременных женщин), а не для популяции в целом.

Помимо значений, приведенных в таблице 7, полученные в результате анализов данные можно сравнивать с референтными значениями (95-й процентиль) других обследований; однако учитывая вышеизложенные комментарии относительно референтных значений, обследуемая популяция должна быть как можно более сопоставимой (т.е. быть одного возраста, вести одинаковый образ жизни и наблюдаться в примерно один и тот же период времени и т.д.).

**Таблица 7. Концентрации ртути и уровень погрешности измерений**

Учреждение	Уровни в волосах	Библиографический источник
Управление по охране окружающей среды США (US EPA)	1,0 µg/g	(35)
Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA)	1,9 µg/g	(29)
Федеральное агентство по охране окружающей среды Германии (UBA)	5,0 µg/g	(34)

## Библиография

1. Harkins DK, Susten AS. Hair analysis: exploring the state of the science. *Environ Health Perspect.* 2003;111:576–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241447/pdf/ehp0111-000576.pdf>, accessed 31 January 2018).
2. Srogi K. Mercury content of hair in different populations relative to fish consumption. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2007;189:107–30 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193738>, accessed 31 January 2018).
3. McDowell MA, Dillon CF, Osterloh J, Bolger PM, Pellizzari E, Fernando R et al. Hair mercury levels in U.S. children and women of childbearing age: reference range data from NHANES 1999–2000. *Environ Health Perspect.* 2004;112:1165–71 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1247476/>, accessed 31 January 2018).
4. Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63:9–18 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138238>, accessed 31 January 2018).
5. Tobin DJ. *Hair in toxicology: An important bio-monitor.* Cambridge: RSC Publishing; 2005.
6. Instituto de Salud Carlos III [website]. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2018 ([http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-servicios-aplicados-formacion-investigacion/fd-centros-unidades/fd-centro-nacional-sanidad-ambiental/fd-servicios-cientifico-tecnicos\\_sanidad-ambiental/s-c-t-cnsa-toxicologia-ambiental.shtml](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-servicios-aplicados-formacion-investigacion/fd-centros-unidades/fd-centro-nacional-sanidad-ambiental/fd-servicios-cientifico-tecnicos_sanidad-ambiental/s-c-t-cnsa-toxicologia-ambiental.shtml), accessed 31 January 2018).
7. Esteban M, Schindler BK, Jiménez-Guerrero JA, Koch HM, Angerer J, Rosado M et al. Mercury analysis in hair: Comparability and quality assessment within the transnational COPHES/DEMOCOPHES project. *Environ Res.* 2014;141:24–30 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483984>, accessed 31 January 2018).
8. Jiménez-Guerrero JA, Navarro C, Cañas A, Lucena MA, Castaño A. Development, validation and ISO/IEC 17025:2005 accreditation of an atomic absorption method to determine total mercury in human hair. 8th International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health, Espoo, Finland, 6–8 September 2010.
9. Veiga MM, Baker RF. *Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners.* Vienna: United Nations Industrial Development Organization; 2004.
10. Li YF, Chen C, Li B, Wang J, Gao Y, Zhao Y, Chai Z. Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: suitable or not? *Environ Res.* 2008;107:39–44 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935107001430?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
11. Fewtrell L, Kaufmann R, Prüss-Üstün A, editors. *Lead: Assessing the environmental burden of disease at national and local levels.* Geneva: World Health Organization; 2003 ([http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf), accessed 31 January 2018).
12. *Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure.* Geneva: United Nations Environment Programme/World Health Organization; 2008 (<http://www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/>, accessed 31 January 2018).
13. DMA 80. In: *Milestone [website].* Sorisole: Milestone; 2018 (<https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/>, accessed 31 January 2018).
14. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing (EA-4/16). European Accreditation; 2003 (<http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-16-g-rev00-december-2003-rev>, accessed 19 January 2018).

15. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Working Group 1 of the Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG 1); 2008 ([https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](https://www.bipm.org/utis/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf), accessed 19 January 2018).
16. Clarkson TW. Mercury: major issues in environmental health. *Environ Health Perspect.* 1992;100:31–38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519577/>, accessed 31 January 2018).
17. Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull.* 2001;55:197–203 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470315>, accessed 31 January 2018).
18. Johansson C, Castoldi AF, Onishchenko N, Manzo L, Vahter M, Ceccatelli S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. *Neurotox Res.* 2007;11:241–60 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449462>, accessed 31 January 2018).
19. Harada M. Congenital Minamata disease: Intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology.* 1978;18:285–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/362594>, accessed 31 January 2018).
20. Myers GJ, Davidson PW, Strain JJ. Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. *J Nutr.* 2007; 137:2805–8 (<https://pdfs.semanticscholar.org/d543/5eed77f9079b1057c5bd5a66b28d8f7778fd6.pdf>, accessed 31 January 2018).
21. Choi AL, Cordier S, Weihe P, Grandjean P. Negative confounding in the evaluation of toxicity: the case of methylmercury in fish and seafood. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38:877–93 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597522/>, accessed 31 January 2018).
22. Karagas MR, Choi AL, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E et al. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environ Health Perspect.* 2012; 120:799–806 (<https://ehp.niehs.nih.gov/1104494/>, accessed 31 January 2018).
23. Champan L, Chan HM. The influence of nutrition on methylmercury intoxication. *Environ Health Perspect.* 2000;108(1):29–56 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1637774/>, accessed 31 January 2018).
24. Chen CY, Serrel N, Evers DC, Fleishman BJ, Lambert KF, Weiss J et al. Meeting report: Methylmercury in marine ecosystems – from sources to seafood consumers. *Environ Health Perspect.* 2008;116:1706–12 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599767/>, accessed 31 January 2018).
25. Castaño A, Cutanda F, Esteban M, Pärt P, Navarro C, Gómez S et al. Fish consumption patterns and hair mercury levels in children and their mothers in 17 EU countries. *Environ Res.* 2015; 141:58–68.doi: 10.1016/j.envres.2014.10.029.
26. National Research Council. Toxicological effects of methylmercury. Washington, DC: National Academy Press; 2000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/>, accessed 31 January 2018).
27. Burger J, Gochfeld M. Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. *Sci Total Environ.* 2011; 409:1418–29 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300121/>, accessed 31 January 2018).
28. Miniero R, Abate V, Brambilla G, Davoli E, De Felip E, De Filippis SP et al. Persistent toxic substances in Mediterranean aquatic species. *Sci Total Environ.* 2014;494–495:18–27 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969714008237?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
29. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *EFSA Journal.* 2012;10(12):2985 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2985/abstract>, accessed 31 January 2018).

30. Poulsen OM, Holst E, Christensen JM. Calculation and application of coverage intervals for biological reference values. *Pure Appl Chem*. 1997; 69:1601–11 (<https://doi.org/10.1351/pac199769071601>, accessed 31 January 2018).
31. Ewers U, Krause C, Schulz C, Wilhelm M. Reference values and human biological monitoring values for environmental toxins. *Int Arch Occup Environ Health*. 1999; 72:255–60 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491780>, accessed 31 January 2018).
32. Manini P, De Palma G, Mutti A. Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability. *Toxicol Lett*. 2007;168:210–18 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157456>, accessed 31 January 2018).
33. Hays MS, Aylward LL. Interpreting human biomonitoring data in a public health risk context using Biomonitoring Equivalents. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215:145–48 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911002331?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
34. UBA. Substance monograph: Mercury – reference values and human biomonitoring (HBM) levels. Opinion of the Human Biomonitoring Commission of the German Environmental Agency. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt; 1999.
35. Mercury study report to congress. Vol. IV: An assessment of exposure to mercury in the United States. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 1997 (<https://www3.epa.gov/airtoxics/112nmerc/volume4.pdf>, accessed 31 January 2018).
36. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 922. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization; 2004 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO\\_TRS\\_922.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42849/1/WHO_TRS_922.pdf), accessed 31 January 2018).





## Приложение 2. Вопросник для забора проб волос

---

ИД код:

Дата опроса:

Место взятия образцов:

Работник на местах:

---

### 1. Образец взят

Да  Нет Причина: .....

---

2. Дата забора пробы (день/месяц/год): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

### 3. Естественный цвет волос:

<input type="checkbox"/> Черные	<input type="checkbox"/> Рыжие
<input type="checkbox"/> Темно-коричневые	<input type="checkbox"/> Седые
<input type="checkbox"/> Коричневые	<input type="checkbox"/> Белые
<input type="checkbox"/> Светлые	

### 4. Естественная структура волос:

Прямые  
 Вьющиеся  
 Кучерявые

### 5. Окрашивались/подкрашивались ли волосы в последние 6 месяцев?

Нет  Да Сколько месяцев назад .....

Сколько месяцев назад .....

### 6. Подвергались ли волосы какой-либо обработке в последний год, напр., делалась ли химическая завивка, или выпрямлялись с помощью выпрямителя для волос?

Нет  Да Сколько месяцев назад .....

Сколько месяцев назад .....

### 7. Когда волосы мылись в последний раз:

Дней назад Уточните.....  
 Вчера  
 Сегодня

8. Длина отобранных волос (от кожи головы): \_\_\_\_\_ см

### 9. Маркировка образца:

Да  Нет Причина: .....

---

### 10. Комментарии:

---

Примечание: в данном вопроснике собрана только основная информация, касающаяся образца волос. Информация, связанная с воздействием ртути, не включена.

# Приложение 3. Реестр приема образцов

---

## 1. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ОБРАЗЦА:

Центр:  
Город/страна:  
Дата забора проб:

---

## 2. ОБРАЗЕЦ ПОЛУЧЕН:

Волосы

---

Подпись получившего:

## 3. ПРИЕМ ОБРАЗЦА:

### А) УПАКОВКА

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Поврежденная упаковка  
 Разморожено охлаждающее вещество  
 Другие: \_\_\_\_\_

Дата  
(день/месяц/год)

Время  
(часы: минуты)

### В) ОБРАЗЕЦ

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Недостаточное количество/объем (укажите биосреду)\_\_\_\_  
 Несовпадение ИД кодов  
 Другие: \_\_\_\_\_

### С) ДОКУМЕНТЫ

- ПРОБЛЕМ НЕ ВЫЯВЛЕНО  
 ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНЫ:  
 Отсутствие реестра собранных образцов  
 Отсутствие вопросника для забора проб волос  
 Отсутствие вопросника обследования  
 Несовпадение ИД кодов  
 Другие: \_\_\_\_\_
- 

## 4. ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ НА ХРАНЕНИЕ/БИОБАНКИНГ:

---

## 5. КОММЕНТАРИИ:

---

### ИД КОДЫ ДЛЯ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ОБРАЗЦОВ

---

Пуповинная кровь      Моча  
                             

---

## Приложение 4. Проверочный список до забора проб

**1. Подготовлены ли для работы на местах пробоотборные материалы?**

- Спирт и вата
- Латексные перчатки
- Ножницы
- Идентификационные этикетки
- Несмываемый маркер
- Скотч
- Бумажные пакеты
- Пластиковые пакеты с застежкой

**2. Готовы ли все документы, относящиеся к забору проб?**

- Реестр собранных образцов волос
- Вопросники для забора проб волос
- Бланк осознанного согласия

**3. Замечания** .....

.....

.....

## Приложение 5. Проверочный список после забора проб

1. Были ли все образцы правильно маркированы и зарегистрированы в реестре собранных образцов волос?

Да  Нет

Пожалуйста, опишите каждую выявленную проблему и ее решение: .....

.....  
.....

2. Были ли все бланки осознанного согласия подписаны и маркированы?

Да  Нет

Пожалуйста, опишите каждую выявленную проблему и ее решение: .....

.....  
.....

3. Были ли все вопросники для забора проб правильно заполнены и маркированы?

Да  Нет

Пожалуйста, опишите каждую выявленную проблему и ее решение: .....

.....  
.....

4. Есть ли связь между ИД кодами образцов и документов?

Да  Нет

Пожалуйста, опишите каждую выявленную проблему и ее решение: .....

.....  
.....

# Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в пуповинной крови

(сбор образцов, анализ содержания общей ртути, толкование результатов)

## Резюме

В данных стандартных операционных процедурах описывается процесс оценки пренатального воздействия ртути в обследованиях на основе биомониторинга человека с использованием пуповинной крови в качестве биологической среды. В этом документе подробно описаны процедуры забора пуповинной крови, анализа содержания общей ртути и интерпретации результатов.

## Ключевые слова

Mercury – analysis  
Methylmercury Compounds – analysis  
Biomarkers – analysis  
Fetal Blood – chemistry  
Umbilical Cord – chemistry  
Maternal Exposure Maternal-Fetal Exchange  
Infant, Newborn  
Environmental Exposure

## Авторы

Milena Horvat  
Институт им. Йозефа Стефана, Словения  
Darja Mazej  
Институт им. Йозефа Стефана, Словения  
Majda Palvin  
Институт им. Йозефа Стефана, Словения  
Greet Schoeters  
VITO, Беретанг, Бельгия  
Janja Snoj Tratnik  
Институт им. Йозефа Стефана, Словения

# Содержание

<b>Условные сокращения.....</b>	<b>75</b>
<b>Введение: пуповинная кровь как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Забор проб пуповинной крови .....</b>	<b>77</b>
1.1. Сфера применения метода .....	77
1.2. Меры предосторожности .....	77
1.3. Необходимые материалы.....	77
1.4. Подготовка/предварительная обработка пробоотборного материала.....	77
1.5. Процедура забора проб.....	78
1.6. Маркировка .....	79
1.7. Транспортировка и консервирование образцов .....	79
1.8. Прием образцов .....	79
1.9. Пробоподготовка и разделение на аликвоты.....	80
1.10. Хранение и консервирование .....	81
1.11. Контроль качества: отслеживаемость .....	81
<b>2. Анализ содержания общей ртути в пуповинной крови.....</b>	<b>81</b>
2.1. Сфера применения метода .....	82
2.2. Технический принцип .....	82
2.3. Меры предосторожности .....	83
2.4. Оборудование, материалы и растворы.....	83
2.5. Калибровка .....	85
2.6. Процедуры .....	85
2.7. Контроль качества .....	89
2.8. Оценка метода .....	90
<b>3. Интерпретация результатов .....</b>	<b>94</b>
<b>Библиография .....</b>	<b>96</b>
<b>Приложение 1. Бланк для забора проб пуповинной крови .....</b>	<b>98</b>
<b>Приложение 2. Регистрация проб пуповинной крови.....</b>	<b>99</b>

## Условные сокращения

ИД	идентификационный (код)
ПКО	предел количественного определения
ПО	предел обнаружения
СОП	стандартные операционные процедуры
Hg	ртуть

# Введение: пуповинная кровь как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека

Ртуть (Hg) является токсичным и стойким загрязнителем, который биоаккумулируется с постоянным повышением концентрации в каждом новом звене пищевой цепочки (1,2). Люди подвергаются воздействию метилртути, главным образом, через продукты питания, особенно при употреблении в пищу пресноводных и морских рыб (3). Они могут также подвергаться воздействию элементарной или неорганической ртути в результате вдыхания во время профессиональной деятельности и через стоматологические амальгамы (4). Воздействие элементарной или неорганической ртути может также происходить в результате использования некоторых кремов для осветления кожи и мыла, присутствия ртути в некоторых традиционных лекарственных средствах, использования ртути в культурной практике и случайных разливов ртути в домах, школах или других местах (5).

Хотя население в целом подвергается воздействию низких уровней ртути, возникновение и серьезность неблагоприятных последствий воздействия ртути для здоровья человека зависит от ее химической формы, дозы, возраста или стадии развития людей (считается, что наиболее восприимчивым к такому воздействию является плод), а также от его продолжительности и пути (1,6).

Основными объектами токсичного воздействия ртути являются нервная система, почки и сердечно-сосудистая система, причем наиболее чувствительными к ее токсическому воздействию являются развивающиеся системы органов (например, нервная система плода). Последствия для нервной системы являются наиболее чувствительными конечными точками токсикологического воздействия элементарной ртути и метилртути, а повреждение почек – ключевой конечной точкой воздействия неорганических соединений ртути (1).

Выбор биологических сред для оценки воздействия на человека зависит от соединений ртути, характера воздействия (например, хронического, острого) и времени взятия проб после воздействия (7). Присутствие ртути в крови говорит о кратковременном воздействии органической и неорганической ртути, но не дает информации о длительном воздействии и его вариациях (7-9). Уровни метилртути в пуповинной крови и волосах – подходящие биомаркеры низкого пренатального воздействия метилртути ввиду ее избирательного переноса через биологические барьеры, такие как кровь, волосы и плацента. Неорганическая ртуть не обладает такими свойствами. Уровни в пуповинной крови пропорциональны уровням в материнской крови (хотя последние немного выше) (10,11). В качестве биомаркера пренатального воздействия предпочтительнее использовать показатели содержания ртути в пуповинной крови, поскольку они дают информацию о воздействии как на матерей, так и на их детей (12).

Ртуть, содержащаяся в пуповинной крови, может служить более веским показателем связи с нейроповеденческими дефектами у ребенка по сравнению с ртутью, содержащейся в волосах матери (13). На концентрации ртути в волосах могут влиять несколько факторов, в том числе цвет волос и переменные темпы их роста, что ограничивает ее пользу как показателя концентрации ртути в организме (14). Пробы пуповинной крови берутся неинвазивным способом, но необходимо чтобы это осуществлялось медсестрой непосредственно после родов.





# 1. Забор проб пуповинной крови

## 1.1. Сфера применения метода

Забор проб пуповинной крови необходимо проводить сразу же после родов в родильной палате. Для этого можно применять два основных метода.

- Забор проб пуповинной крови методом «in utero» после рождения ребенка, но до рождения плаценты; обычно проводится врачом или акушеркой.
- Забор проб пуповинной крови методом «ex utero» после рождения ребенка и зажимания пуповины. Этот метод может проводиться в отдельном месте и может выполняться медсестрами и/или научным персоналом.

ВОЗ рекомендует использовать для забора проб пуповинной крови только методы «ex-utero», чтобы избежать каких-либо негативных последствий для матери и ребенка.

## 1.2. Меры предосторожности

Все меры предосторожности, необходимые для работы с образцами крови, применимы для забора проб пуповинной крови.

- Пользуйтесь только продуктами, специально разработанными для взятия пуповинной крови; при использовании игл и шприцов, используйте безопасную иглу, которая может быть отделена от бочки шприца.
- Перчатки следует носить в любое время при заборе проб пуповинной крови.
- Если перчатки были проколоты или сильно загрязнены при использовании, необходимо их снять и выбросить, помыть руки и надеть чистые перчатки.
- По окончании работы с пробами следует всегда снимать и выбрасывать перчатки, а также мыть руки.
- При необходимости следует использовать дезинфицирующие средства.

## 1.3. Необходимые материалы

Для забора проб пуповинной крови требуются следующие материалы:

- регистрационные бланки для образцов;
- пробоотборные материалы:
  - иглы и шприцы;
  - пробирка В1: полипропиленовая пробирка вместимостью 50 мл, содержащая 0,5 мл этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК);
  - пробирка В2: полипропиленовая безметалловая пробирка объемом 10 мл.

Родильный дом должен заранее получить коробки с маркированными пробирками для сбора крови, подготовленные в научно-исследовательской лаборатории.

Должны быть предоставлены инструкции для связи с научно-исследовательским персоналом, а также для сбора, хранения и транспортировки образцов.

## 1.4. Подготовка/предварительная обработка пробоотборного материала

Все пробирки необходимо промыть в 10% растворе азотной кислоты и дистиллированной воды для устранения фонового загрязнения. Подробно эта процедура описана ниже.

1. Приготовьте 10% раствор азотной кислоты из азотной кислоты (65% сверхчистой) и дистиллированной воды.
2. Поместите раствор в резервуар.
3. Откройте пробирки и поместите их вместе с крышками в резервуар. Убедитесь, что все предметы полностью погружены в раствор.
4. Пробирки должны находиться в резервуаре как минимум три часа (желательно оставить на ночь).
5. Выньте пробирки из резервуара с кислотой и поместите их в резервуар с дистиллированной водой. Встряхните их 2-3 минуты. Затем переместите пробирки и крышки во второй резервуар с дистиллированной водой. Снова встряхните их 2-3 минуты.
6. Выньте пробирки и крышки и положите их лицевой стороной вниз на чистую фильтровальную бумагу, чтобы высушить.
7. По окончании просушки завинтите крышки, предварительно обработанные азотной кислотой. Сделайте отметку на пробирке В1, указывающую на минимальный необходимый объем пуповинной крови (10 мл). Поместите предварительно обработанный сосуд в полиэтиленовый пакет с застежкой.

Раствор кислоты можно использовать повторно в течение месяца после его приготовления. Все процедуры должны быть выполнены в химическом вытяжном шкафу с использованием соответствующих средств индивидуальной защиты.

Для проверки на наличие загрязняющих веществ после процедуры очистки необходимо случайным образом отобрать 5% всех пробирок и проанализировать их на наличие ртутного загрязнения. Для этого пробирки следует наполнить дистиллированной водой и потрясти в течение 10 минут. Аликвота должна быть проанализирована на наличие соответствующих биомаркеров (общая ртуть).

## 1.5. Процедура забора проб

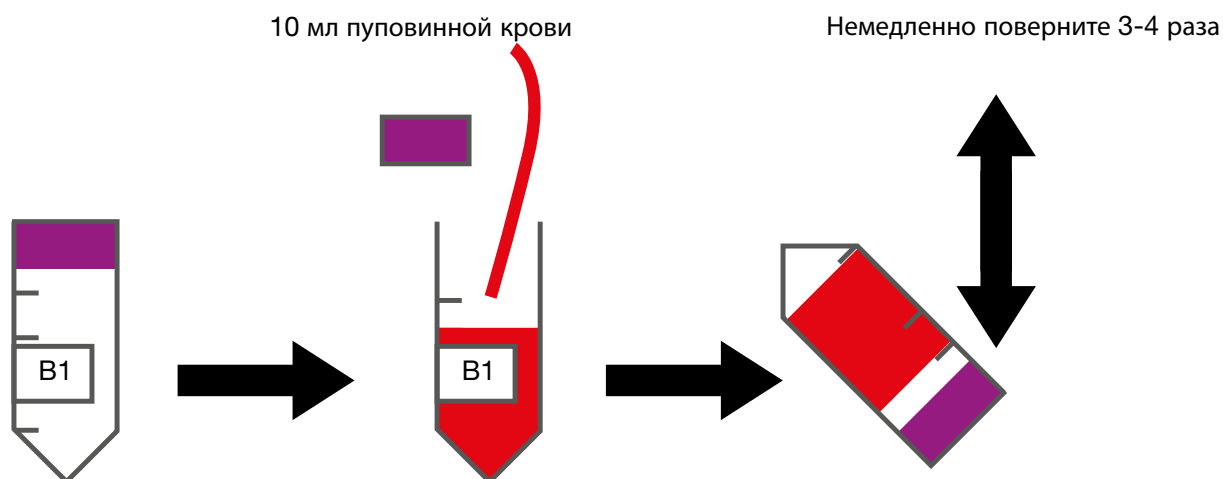
Процедура забора проб пуповинной крови методом «ex-utero» выглядит следующим образом.

1. После зажима пуповины и отделения младенца от плаценты сотрите всю материнскую кровь с пуповины с помощью марли, пропитанной спиртом или антисептической жидкостью на йодной основе в венепункции (место прокола вены). Протирайте как минимум 30 секунд. Стерилизация пуповины в месте прокола очень важна, так как она предотвратит любое загрязнение пуповинной крови.
2. Подождите, пока венепункция высохнет.
3. Снимите колпачки с игл и держите их поблизости, т.к. в конце процедуры необходимо будет заново надеть их на иглы.
4. Проткните вену пуповины в месте стерилизации и наберите кровь в шприц.
5. После заполнения шприца поменяйте иглу на более узкую и вставьте ее в крышку вакуумного контейнера так, чтобы кровь стекала в пробирку.
6. Если кровоток прекращается, пожалуйста, перейдите к стерилизации другого участка ближе к плаценте и используйте вторую иглу для дальнейшего сбора крови.
7. В конце процедуры сбора крови, на иглы должны быть надеты сохраненные колпачки для предотвращения несчастных случаев.
8. После сбора подождите 10 минут. Затем аккуратно поверните трубку, чтобы тщательно перемешать образец крови.

Образец пуповинной крови должен быть взят и маркирован следующим образом (см. рис. 1).

1. Соберите пуповинную кровь в пробирку В1 (минимум 10 мл).
2. Пробирка В1: поверните три-четыре раза, чтобы кровь смешалась с ЭДТК.
3. Положите пробирку В1 в пакет с застежкой и отнесите в лабораторию.
4. Заполните бланк для забора проб (приложение 1).

**Рис. 1. Забор проб пуповинной крови**



Запишите информацию участницы в бланке регистрации (приложение 2). Необходимо задокументировать следующую информацию:

- имя участницы;
- идентификационный (ИД) код образца;
- дата и время рождения ребенка;
- время начала и окончания процедуры забора проб пуповинной крови;
- объем собранной пуповинной крови.

Бланк должен быть предоставлен в координационный центр или координатору обследования.

## 1.6. Маркировка

Пластиковый пакет, вопросники и все пробирки должны быть маркированы ИД кодом участницы.

## 1.7. Транспортировка и консервирование образцов

Образцы должны быть отправлены в лабораторию местной больницы или в другое специальное хранилище в больнице в течение двух часов после забора проб. Во время транспортировки образцы должны держаться в холодильнике или в холодном контейнере при температуре ниже 4 °С.

## 1.8. Прием образцов

Критерии приема или отбраковки образцов должны быть определены заранее и применены во время приема образцов. Эти критерии должны касаться условий транспортировки, сопроводительной документации, целостности упаковки, правильной идентификации и количества образца (достаточное для анализа и биобанкинга, если образцы будут храниться в других исследовательских целях).

Следующие пункты должны быть проверены при получении образцов пуповинной крови.

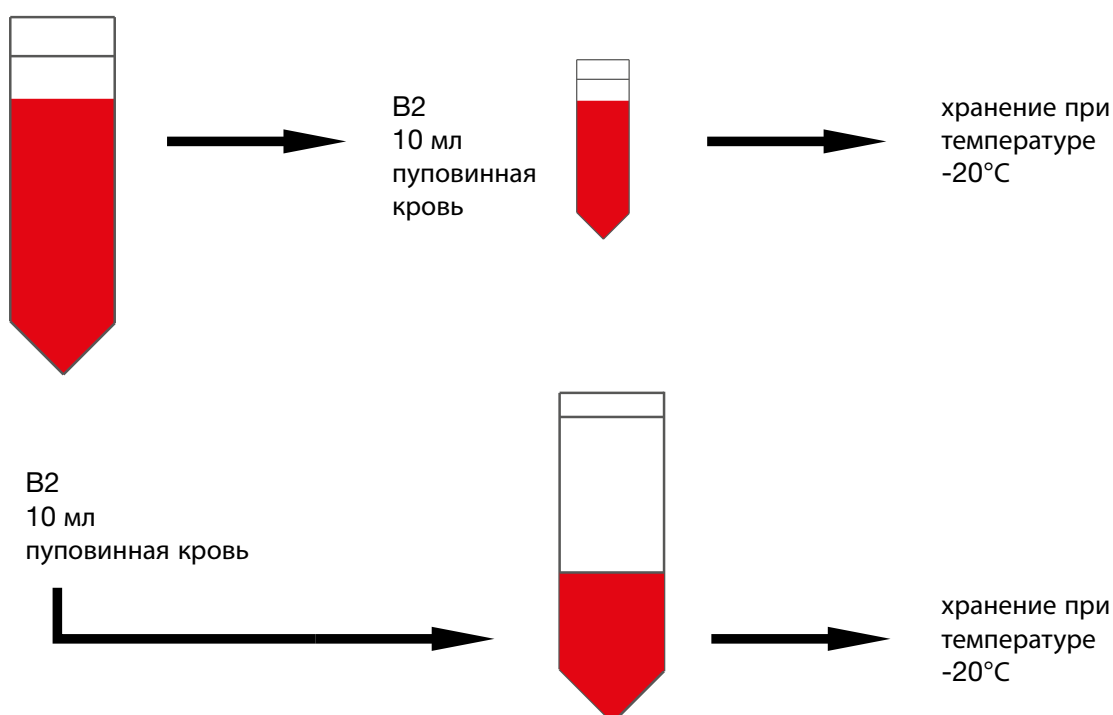
- Количество и качество образцов: образец небольшого объема (<0,25 мл) не принимается.
- Предполагаемое заражение: из-за ненадлежащих процедур или устройств забора проб.
- Целостность упаковки: должна быть правильно запечатана и не должна подвергаться никаким манипуляциям (примечание: на упаковке в месте отбора образцов может быть поставлена защитная пломба).
- Сопроводительные документы: в упаковке должны находиться все образцы, перечисленные в реестре собранных образцов; к ним должны прилагаться соответствующие документы (вопросники и т.д.).
- Правильная идентификация: полученные образцы и документы должны быть надлежащим образом идентифицированы соответствующим ИД кодом.

## 1.9. Пробоподготовка и разделение на аликвоты

Разделение на аликвоты может быть произведено в больничной лаборатории в безртутной атмосфере. Работники лаборатории должны заранее подготовить коробки с маркированными пробирками для аликвот. Для измерения ртути оптимальное количество образца составляет 1-2 мл (минимум 0,5 мл). В случае хранения больших количеств, рекомендуется помещать аликвоты объемом 1-2 мл в отдельные сосуды, а не хранить в больших объемах в одном сосуде. Частая разморозка крови может привести к потере содержащейся в ней ртути.

На рис. 2 показан процесс аликвотирования и хранения. В пробирке В2 хранится аликвота пуповинной крови объемом 2 мл при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  для анализа содержания ртути. Пробирка В1 с оставшейся кровью хранится для возможного последующего дублирования анализа ртути или анализа на предмет содержания других загрязняющих веществ (если образцы планируется хранить для других исследовательских целей).

Рис. 2. Разделение на аликвоты и хранение образцов



## 1.10. Хранение и консервирование

Все разделенные на аликвоты образцы должны храниться в морозильной камере при температуре ниже  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. Было доказано, что характеристики образцов остаются стабильными при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких месяцев или при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких лет.

## 1.11. Контроль качества: отслеживаемость

Возможность отслеживания выборки на протяжении всего обследования имеет решающее значение, поэтому этот аспект должен быть гарантирован. Образец пуповинной крови должен быть маркирован при помощи ИД кода. Как отмечалось выше, правильная маркировка образцов и связанных с ними документов имеет важное значение, но при этом необходимо также иметь возможность связать образец с информацией, предоставленной волонтером. С этой целью все документы, относящиеся к образцу (вопросники, реестры и т.д.), должны быть немедленно маркированы одним и тем же ИД кодом.

## 2. Анализ содержания общей ртути в пуповинной крови

Определение общей ртути в пуповинной крови требует применения чувствительных методов анализа, выполняемых в условиях надлежащего контроля качества. Для анализа общей ртути в крови человека существует множество аналитических методов, некоторые из которых автоматизированы. В принципе, существует два подхода: (1) методы, основанные на кислотном разложении с последующей атомно-абсорбционной спектроскопией холодного пара (CVAAS), атомно-флуоресцентной спектрометрией холодного пара (CVAFS) и/или масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (ICPMS); и (2) методы, основанные на термическом разложении и CVAAS. Метод, описанный в этих стандартных рабочих процедурах (СОП), основан на втором принципе, сочетающем горение, амальгамацию золота и обнаружение ртути методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Он позволяет надежно и достоверно выявлять общую ртуть в пробах крови при типичных диапазонах концентрации, попадающую в организм в результате воздействия из окружающей среды и на рабочем месте. Для проведения этих измерений необходимо предоставить специальный прибор, как описано ниже. При отсутствии такого прибора лаборатории могут использовать метод, описанный в СОП по оценке общего содержания ртути в моче или аналогичные процедуры (15).

Многие лаборатории также используют методику, предложенную в руководстве, подготовленном Японским национальным институтом по болезни Минамата (15). Этот метод предлагается в СОП по оценке содержания общей ртути в моче и может также использоваться для анализа крови. Это простой, чувствительный, эффективный и, прежде всего, малозатратный метод, поскольку для его применения требуется простое оборудование с атмосферным воздухом в качестве газ-носителя.

Метод, описанный в настоящих СОП, не требует предварительной обработки или извлечения образцов, в его результате получается очень малое количество химических отходов, а вероятность загрязнения минимальна.

Если лаборатории располагают другим оборудованием для обнаружения ртути в разложенных кислотой образцах, рекомендуется следовать инструкциям, предоставленным производителями

приборов. Приведенные в настоящих СОП инструкции по забору проб и обращению с ними подходят для использования со всеми приборами для обнаружения ртути. Следует проверить пределы обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО), чтобы оценить, применимы ли они к образцам крови.

## 2.1. Сфера применения метода

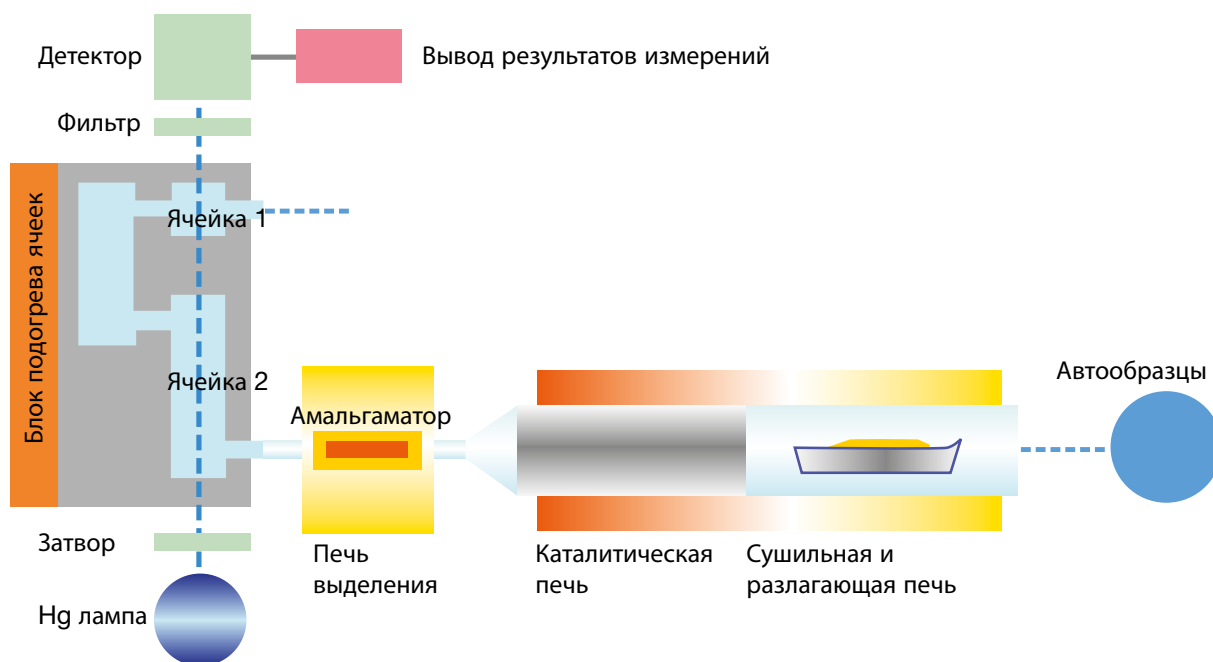
Метод, описанный в данных СОП, предназначен для определения содержания общей ртути в цельной пуповинной крови. Для образца в 200 мг ПКО составляет 0,2 нг/мл. Концентрация общей ртути в пуповинной крови лиц, не потребляющих в пищу рыбу, обычно варьируется от 0,5 до 5,0 нг/мл. В случае высокого уровня потребления рыбы зачастую встречаются значения, превышающие 10 нг/мл. Описанный в данных СОП метод может охватывать все обычно регистрируемые диапазоны.

## 2.2. Технический принцип

В настоящих СОП уровень концентрации ртути в крови определяется методом термического разложения - амальгамации золота - атомно-абсорбционной спектроскопии, который является очень чувствительным и селективным аналитическим методом, хорошо подходящим для анализа на следовом уровне. Образцы крови взвешивают и вливают в лодочку без какой-либо предварительной обработки. Затем образец вводится в прямой анализатор ртути (рис. 3), где он сначала высушивается, а затем термически разлагается под действием непрерывного потока кислорода. Продукты сгорания переносятся и далее разлагаются на горячем слое катализатора. Пары ртути улавливаются на амальгаматоре золота и затем нагреваются, в результате чего все пары ртути попадают в абсорбционную ячейку атомно-абсорбционного спектрофотометра. Содержание ртути определяется методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии при 253,7 нм.

Количество ртути определяется при помощи градуировочного графика, построенного с использованием стандартных растворов ртути. Прямой анализатор ртути может быть

Рис. 3. Прямой анализатор ртути



Hg = ртуть.

*Примечание:* стандартная модель анализатора Milestone DMA-80 (нарисованная здесь) оснащена двумя измерительными ячейками, ртутной лампой и ртутным детектором.

*Источник:* Milestone (13).

сконфигурирован различными способами в зависимости от типа и модели. Для описанной здесь процедуры была использована измерительная ячейка с рабочим диапазоном 0-20 нг ртути (низкий диапазон).

## 2.3. Меры предосторожности

Необходимо принимать следующие меры предосторожности при анализе общей ртути в пуповинной крови.

- Выбрасывайте одноразовые пластиковые, стеклянные и бумажные материалы (например, наконечники пипеток, автодозаторные пробирки и перчатки), которые соприкасаются с биологическими жидкостями человека, такими как кровь, в специальные пакеты для удаления опасных биологических отходов в автоклаве. Храните эти пакеты в соответствующих контейнерах до тех пор, пока их не запечатают и не поместят в автоклав.
- Работу со всеми растворами необходимо проводить в перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- Особую осторожность следует проявлять с концентрированной соляной кислотой, так как она является едким химическим веществом, которое может вызвать серьезные повреждения глаз и кожи.
- Возможные опасности, связанные с использованием оборудования, включают воздействие ультрафиолетового излучения, высокого напряжения и высоких температур.
- По окончании работы протрите все рабочие поверхности, на которых обрабатывалась биологическая жидкость, 10% раствором гипохлорита натрия или его эквивалентом. Утилизируйте все биологические образцы и разбавленные материалы для исследования в автоклавном мешке для биологически опасных отходов в конце анализа в соответствии с указаниями по утилизации опасных отходов.

## 2.4. Оборудование, материалы и растворы

### 2.4.1. Оборудование

Для анализа общей ртути в пуповинной крови необходимо следующее оборудование:

- прямой анализатор ртути (например, Milestone DMA-80).

### 2.4.2. Материалы

Для анализа общей ртути в пуповинной крови необходимы следующие материалы:

- аналитические весы (с разрешением до 0,1 мг);
- микролитровая пипетка на 100 мкл;
- микролитровая пипетка, регулируемая в диапазоне от 20 до 200 мкл;
- микролитровая пипетка, регулируемая в диапазоне от 100 до 1000 мкл;
- пробирка для аликвот образцов крови – криопробирка, 2 мл;
- лабораторный вихревой встряхиватель;
- кварцевые лодочки (1,5 мл);
- лоточный конвейер для проб;
- перчатки без талька.

### 2.4.3. Реагенты, химикаты и газы

Для анализа общей ртути в пуповинной крови необходимы следующие реагенты, химикаты и газы:

- газообразный кислород (чистота 99,995%);
- 70% этиловый спирт (чистый для анализа);
- 37% соляная кислота (чистая для анализа);
- дистиллированная вода (бидистиллят).

### 2.4.4. Стандартные растворы

#### Основной стандартный раствор

Первичный стандартный раствор ртути (основной раствор) с концентрацией 1 мг/мл готовится путем взвешивания 0,25 г элементарной жидкой ртути ( $Hg^0$ ) в стеклянной колбе из пирекса объемом 250 мл. К этому добавляется 2 мл азотной кислоты, которая разбавляется бидистиллированной водой до 250 мл. Раствор необходимо хранить в холодильнике.

#### Промежуточный стандартный раствор

Промежуточный стандартный раствор ртути с концентрацией 5 мкг/мл готовится в 5% азотной кислоте путем соответствующего разбавления бидистиллированной водой. Калибровочные стандарты предпочтительно готовить в стеклянных колбах, при хранении в холодильнике они остаются стабильными на протяжении одного года. Перед разбавлением и приготовлением рабочих стандартных растворов промежуточные стандартные растворы должны нагреваться до комнатной температуры.

#### Рабочие стандартные растворы

Рабочие стандартные растворы ртути в двух различных концентрациях (2 нг/мл и 10 нг/мл) готовятся в 5% соляной кислоте путем соответствующего разбавления. Их желательно хранить в стеклянных колбах (тефлоновые также пригодны). Рабочие стандартные растворы следует хранить в холодильнике, когда ими не пользуются. Эти растворы следует вынимать из холодильника примерно за два часа до использования, чтобы они могли нагреться до комнатной температуры. Рабочие стандартные растворы готовятся еженедельно, но пользователям рекомендуется проверять их стабильность в лабораторных условиях.

### 2.4.5. Референтные материалы

Следует использовать сертифицированные референтные материалы, предназначенные для измерения общей ртути в крови. Например, для валидации и регулярного контроля качества данных СОП использовался материал Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1 с референтным значением 2,2 нг/г (2,0-2,4 нг/г). В таблице 1 перечислены другие имеющиеся референтные материалы, которые можно использовать для измерения содержания общей ртути в крови человека.

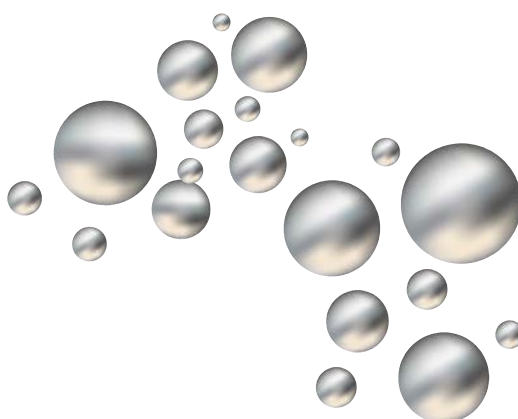




Таблица 1. Референтные материалы, предназначенные для измерения содержания общей ртути в крови

Референтные материалы	Референтные значения (нг/мл)
NIST 955с Свинец в крови коз	17,8 ± 1,6
NIST-966 Токсические металлы в крови	31,4 ± 1,7
SERO210105 Следовые элементы в цельной крови, уровень 1	1,97 ± 0,2
SERO210205 Следовые элементы в цельной крови, уровень 2	15,2 ± 1,6
SERO210305 Следовые элементы в цельной крови, уровень 3	31,4 ± 3,4

*Примечание:* новые референтные материалы постоянно разрабатываются и заменяют устаревшие, поэтому пользователям данных СОП рекомендуется регулярно проверять наличие соответствующих референтных материалов.

## 2.5. Калибровка

Калибровка производится с использованием рабочих стандартных растворов, описанных в разделе 2.4.4.

Для того, чтобы охватить соответствующий диапазон измерений, пипеткой отмеряют известный объем калибровочного стандарта. Обычно необходимо покрыть диапазон 0-20 нг (типичные охватываемые объемы - 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 нг). Объем калибровочного стандарта не должен превышать 0,2 мл. Новый градуировочный график выстраивается еженедельно или даже реже, так как калибровочные измерения очень стабильны. Программное обеспечение прибора позволяет автоматически считывать показания с градуировочных графиков, хранящихся в системе. Однако необходимо ежедневно использовать рабочие калибровочные стандарты, охватывающие диапазон концентрации ртути в образце (обычно 0,2; 1,0 и 10,0 нг), для проверки правильности градуировочных графиков, хранящихся в системе.

В начале проведения измерений необходимо проверить адекватность градуировочного графика. Используются стандартные растворы объемом 2 и 10 нг/мл. Если ртутные стандарты не находятся в требуемом диапазоне, необходимо повторить градуировочный график.

## 2.6. Процедуры

### 2.6.1. Настройка аналитического оборудования

#### Технические данные

Технические данные для аналитического оборудования:

- метод: атомно-абсорбционная спектрометрия;
- система выявления ртути: однолучевой спектрофотометр с последовательным потоком через две измерительные ячейки;
- источник света: ртутная лампа низкого давления;
- длина волны: 253,65 нм;
- фильтр против помех: 254 нм, полоса пропускания 9 нм;
- детектор: кремниевый ультрафиолетовый фотодетектор;
- рабочие диапазоны:
  - низкий диапазон: 0–7,5 нг (предел поглощения ячейки 1: 0,45);
  - ПКО: 0,005 нг;
- автопроботборник: встроенный, 40 положений;

- газ-носитель: кислород, входной газ 4 бар (60 фунтов на кв. дюйм), скорость потока около 200 мл/мин.

Перечисленные здесь технические данные были установлены во время конфигурации используемого в данном случае прибора.

### **Этап 1. Подготовка прямого анализатора ртути**

Следующие операции необходимо выполнять в соответствии с руководством для пользователя: подача кислорода, запуск прямого анализатора ртути и создание файла данных.

### **Этап 2. Очистка системы**

Перед проведением измерений систему необходимо очистить. Сначала моющее средство вводится при помощи пипетки в две кварцевые лодочки, а затем устанавливается пустая позиция. Пустая позиция должна измеряться при помощи соответствующей программы. Оптимальный вариант предлагается ниже, но пользователям рекомендуется проверить его в своей собственной конфигурации:

- время сушки: 0 с (при использовании моющего средства время продлевается до 60 с);
- температура сушки: 200 °C;
- время разложения: 150 с;
- температура разложения: 650 °C;
- время очистки: 60 с.

### **Этап 3. Проверка фона системы**

Необходимо проанализировать три пустые кварцевые лодочки для сжигания в соответствии с предыдущим методом, чтобы проверить, что поглощение (измеренное с точки зрения высоты пика) конечных образцов меньше, чем 0,0030. Приемлемый фон системы должен быть установлен лабораторией в соответствии с инструкциями производителя. Если уровень поглощения выше 0,0030, то необходимо анализировать другие кварцевые лодочки для сжигания до получения заданного значения. Если желаемый фоновый уровень не достигнут после анализа пяти кварцевых лодочек для сжигания, систему следует очистить, повторив анализ с использованием раствора моющего средства в кварцевой лодочке для сжигания с последующим проведением описанной выше процедуры.

### **Этап 4. Контроль рабочего стандартного раствора**

Для проверки ячейки 1 (низкий диапазон) необходимо провести два параллельных измерения каждого стандартного раствора (2 нг/мл и 10 нг/мл), содержащих примерно 0,2 нг и 1 нг ртути (100 мкл рабочего стандартного раствора). Стандартный раствор ртути измеряется следующим образом:

- температура сушки: 200 °C;
- время сушки: 60 с;
- температура разложения: 650 °C;
- время разложения: 150 с;
- время очистки: 60 с.

Концентрация, определенная для рабочего стандартного раствора ртути, сравнивается с концентрацией, установленной при помощи градуировочного графика. Если заданное значение отличается более чем на 10%, то измерения следует повторять до тех пор, пока не будет получено значение в заданном диапазоне. Если такое значение не получено после пяти попыток, следует приготовить новый стандартный раствор. Если и после этого желаемое значение не достигается,

то систему следует заново откалибровать с помощью набора вновь подготовленных рабочих калибровочных стандартов.

## Этап 5. Контроль качества до начала измерений

Два образца сертифицированного референтного материала (напр., Seronorm Whole Blood L-1), содержащего приблизительно 0,2 нг ртути (примерно 100 мг материала), следует отмерить для проверки ячейки 1 (низкий диапазон). Референтный материал измеряется следующим образом:

- температура сушки: 200 °C;
- время сушки: 120 с;
- температура разложения: 650 °C;
- время разложения: 180 с;
- время очистки: 60 с.

Концентрация, определенная для образца референтного материала, должна быть в диапазоне погрешности сертифицированного значения. Если это не так, то измерения следует повторять до тех пор, пока не будет получено значение в этом диапазоне. Если такое значение не получено после пяти попыток, следует провести повторную калибровку системы.

После успешного завершения предыдущих пяти этапов прямой анализатор ртути готов к анализу пробы.

### 2.6.2. Аналитическое определение

#### Взвешивание образца

При обращении как с лодочками для сжигания, так и с опорой, используемой для взвешивания образцов крови, необходимо использовать пинцет.

Установите опору для лодочки сжигания на весы. Поместите кварцевую лодочку на опору и обнулите весы.

Откройте сосуд, содержащий образец, отмерьте приблизительно 20 мкл крови, поместите на лодочку и взвесьте. Поместите лодочку с образцом на лоток и запишите код образца, вес и положение лотка в журнале взвешивания. Для каждого образца необходимо подготовить две копии для параллельных измерений. Необходимо измерять одну холостую после каждого образца. Для каждого образца необходимо использовать специальные пипеточные наконечники с фильтром.

#### Анализ пробы

Кварцевые лодочки для сжигания, содержащие испытуемые и контрольные образцы, должны быть помещены в автопробоотборник прямого анализатора ртути в том порядке, в котором они взвешивались.

Затем необходимо запрограммировать анализ этих образцов путем ввода их кода и веса, а также выбора метода анализа. Параметры метода следующие:

- температура сушки: 200 °C;
- время сушки: 200 с;
- температура разложения: 650 °C;
- время разложения: 180 с;
- время очистки: 60 с.

Примечание: ориентируемые параметры должны быть оптимизированы для каждого прибора в соответствии с указаниями изготовителя.

Пример последовательности использования образцов приведен ниже:

- моющее средство;
- моющее средство;
- холостой образец (8х);
- рабочий стандарт 2 нг/мл;
- рабочий стандарт 2 нг/мл;
- холостой образец;
- рабочий стандарт 10 нг/мл;
- рабочий стандарт 10 нг/мл;
- холостой образец;
- референтный материал;
- референтный материал;
- холостой образец;
- холостой образец;
- образец 1;
- образец 1;
- холостой образец;
- образец 2;
- образец 2;
- холостой образец;
- рабочий стандарт 2 нг/мл;
- рабочий стандарт 10 нг/мл;
- холостой образец;
- образец 5;
- образец 5;
- холостой образец;
- образец 8;
- образец 8;
- рабочий стандарт 2 нг/мл;
- рабочий стандарт 10 нг/мл;
- холостой образец.

### 2.6.3. Вычисление аналитических результатов

Данные регистрируются непосредственно аппаратурой и выражаются в нанogramмах ртути на грамм крови путем интерполяции измерений на градуировочный график.

Окончательное регистрируемое значение соответствует среднему значению двух независимых измерений. Если значения различаются более чем на 10%, необходимо провести повторное измерение образца и зарегистрировать средние значения двух схожих результатов.

### 2.6.4. Диапазон регистрируемых результатов

Подлежат регистрации значения ртути, лежащие в пределах диапазона, определенного при помощи градуировочного графика. Если количество ртути, выявленное в испытуемом образце, выходит за пределы этого диапазона, необходимо провести повторное тестирование образца следующим образом.

- Если значение ниже наименьшего уровня концентрации ртути, включенного в калибровку,

необходимо взвесить требуемое количество крови для двух новых параллельных измерений, чтобы получить новое определение в пределах калибровочного диапазона. Максимальный объем крови, взятый для этого анализа, не должен превышать 250 мг.

- Если значение выше самой высокой калибровочной точки, меньшие количества образца следует взвешивать для получения показаний в диапазоне калибровки.

## 2.7. Контроль качества

Точность и достоверность анализов биомаркеров, проводимых в лабораториях, должны постоянно проверяться посредством применения мер по обеспечению качества.

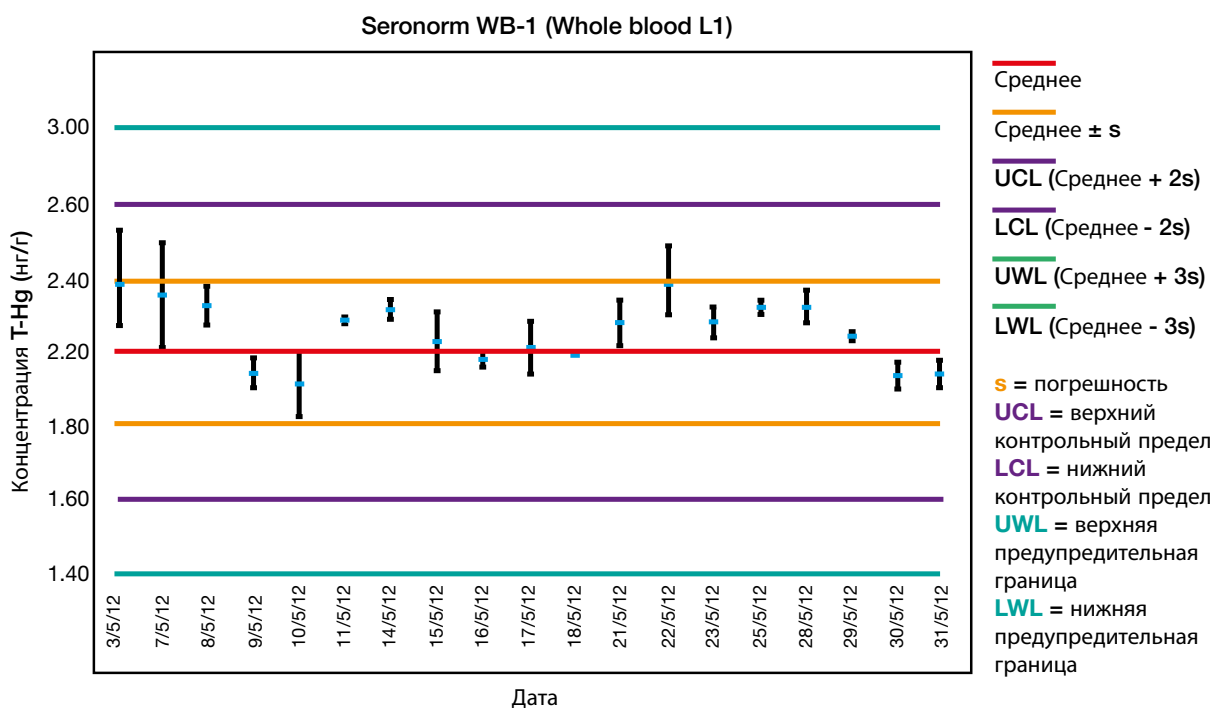
В целом, обеспечение качества в лабораториях включает внутренний и внешний контроль качества (см. также программу контроля качества биомониторинга воздействия ртути на человека), как описано ниже.

- Внутренний контроль качества представляет собой набор процедур, используемых сотрудниками лаборатории для непрерывной оценки результатов по мере их получения, чтобы определить, являются ли они достаточно надежными для публикации.
- Внешняя оценка качества — это система объективной проверки работы лаборатории с использованием внешней системы контроля качества. Внешний контроль качества может осуществляться путем участия в соответствующих межлабораторных сличительных испытаниях, если таковые проводятся.

В данных СОП материалы контроля качества используются для оценки точности и достоверности. На рис. 4 приведен пример диаграммы контроля качества для референтного материала крови. Для контроля качества в данных СОП использовались референтные образцы Seronorm Whole Blood L-1 ( $2,2 \pm 0,2$  нг/мл).

Лабораториям рекомендуется строго и постоянно контролировать эффективность аналитического метода, согласно требованиям стандарта Международной организации по стандартизации/Международной электротехнической комиссии (ISO/IEC) 17 025:2005 (17).

Рис. 4. Пример диаграммы контроля качества



T-Hg = общая ртуть.

## 2.8. Оценка метода

Каждая лаборатория должна отвечать требованиям стандарта ISO/IEC 17025-2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (17). Метод должен быть проверен на соответствие критериям эффективности (чувствительность, линейность, восстановление, устойчивость к внешним воздействиям, точность, достоверность, ПО и т.д.) и должен сопровождаться оценкой погрешности измерений, так как последняя является фундаментальным свойством результата и требованием стандарта ISO/IEC 17025:2005. Рекомендуется пользоваться руководствами EURACHEM (18), имеющимися в свободном доступе, особенно теми, которые касаются протоколов валидации и оценки погрешности. Уровни концентрации ртути в крови могут быть очень низкими, а показатель ПКО должен быть ниже 0,1 нг/мл, чтобы сделать возможным измерение концентрации в популяции в целом. Тем, кто использует методологию, описанную в настоящих СОП, настоятельно рекомендуется при проведении аналитических измерений придерживаться глоссария Terminology in analytical measurement: Introduction to VIM 3 (19).

Для метода, описанного в данных СОП, критерии эффективности и оценка погрешности измерений приведены ниже.

### 2.8.1. Предел обнаружения и предел количественного определения

ПКО был определен из самой нижней точки калибровочной кривой, которая составляла 0,05 нг. С учетом измеренной массы образца (0,2 г), ПКО составил 0,25 нг/г.

ПО был определен как ПКО/3 и составил 0,8 нг/г.

### 2.8.2. Точность

В качестве показателя степени воспроизводимости описанного аналитического метода используется рутинный анализ образцов пуповинной крови на протяжении более длительного периода времени (например, одного года). В целях демонстрации, результаты одной серии измерений (n=15) содержания общей ртути в пуповинной крови приведены в таблице 2. Анализ каждого образца проводился в двух параллельных измерениях.

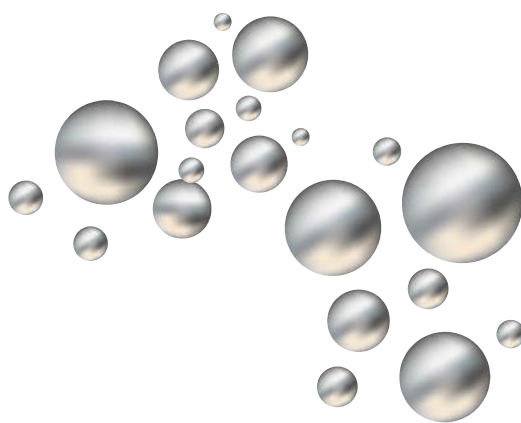


Таблица 2. Результаты дубликатных измерений общей ртути в образцах пуповинной крови и их относительные различия

Образец	Результат D1 (нг/г)	Результат D2 (нг/г)	Среднее значение ((D1+D2)/2)	Разница (D1-D2)	Относительная разница ((D1-D2)/среднее)
Пуповинная кровь 1	0,87	0,86	0,87	0,01	0,012
Пуповинная кровь 2	3,24	3,25	3,25	-0,01	-0,003
Пуповинная кровь 3	5,45	5,68	5,57	-0,23	-0,041
Пуповинная кровь 4	1,22	1,22	1,22	0,00	0,000
Пуповинная кровь 5	1,28	1,40	1,34	-0,12	-0,090
Пуповинная кровь 6	4,67	4,55	4,61	0,12	0,026
Пуповинная кровь 7	1,34	1,32	1,33	0,02	0,015
Пуповинная кровь 8	2,92	2,92	2,92	0,00	0,000
Пуповинная кровь 9	1,16	1,21	1,19	-0,05	-0,042
Пуповинная кровь 10	1,85	1,58	1,72	0,27	0,157
Пуповинная кровь 11	3,67	3,73	3,70	-0,06	-0,016
Пуповинная кровь 12	1,42	1,36	1,39	0,06	0,043
Пуповинная кровь 13	2,83	2,81	2,82	0,02	0,007
Пуповинная кровь 14	1,94	1,98	2,00	-0,04	-0,020
Пуповинная кровь 15	1,19	1,24	1,22	-0,05	-0,041

D1 = измерение 1; D2 = измерение 2.

Для оценки воспроизводимости или повторяемости стандартное отклонение параллельных измерений рассчитывается по следующему уравнению.

$$RSD_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

$RSD_d$  – относительное стандартное отклонение дубликатных измерений

$S_d$  – стандартное отклонение относительной разницы ((D1-D2)/среднее)

n – число параллельных измерений (n=2)

Повторяемость, рассчитанная для данного набора измерений, составила 3,9%.

### 2.8.3. Правильность

Правильность наших результатов была оценена с использованием референтного материала Seronorm WB-1 (Whole blood L1). В качестве меры правильности наших результатов, показатель восстановления (R) рассчитывался на основе измерений эталонного материала на протяжении одного месяца. Наблюдаемые уровни сравнивались с эталонным значением по следующему уравнению.

$$R = \frac{\text{наблюдаемое значение}}{\text{референтное значение}}$$

R – восстановление

Пример измерений общей ртути в референтном материале приведен в таблице 3.

Таблица 3. Измерение общей ртути в референтном материале Seronorm WB-1 (Whole blood L1)

Измерение	Измеренное значение (нг/г)	Истинное значение (нг/г)	Восстановление (%)
День 1	2,39	2,2	109
День 2	2,35	2,2	107
День 3	2,32	2,2	105
День 4	2,14	2,2	97
День 5	2,11	2,2	96
День 6	2,28	2,2	104
День 7	2,31	2,2	105
День 8	2,23	2,2	101
День 9	2,17	2,2	99
День 10	2,21	2,2	100
День 11	2,19	2,2	99
День 12	2,27	2,2	103
День 13	2,39	2,2	109
День 14	2,28	2,2	104
День 15	2,32	2,2	105
День 16	2,32	2,2	105
День 17	2,24	2,2	102
День 18	2,13	2,2	97
День 19	2,14	2,2	97

На основе измерений, приведенных в таблице 3, восстановление составило 102%.



### 2.8.4. Погрешность измерений

Погрешность измерений содержания общей ртути в пуповинной крови путем термической десорбции и CVAAS была оценена на основе стандарта ISO 21748:2010 «Руководство по использованию показателей повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений». Для этой цели использовались данные о воспроизводимости (повторяемости) и восстановлении из нашего валидационного исследования.

Погрешность воспроизводимости ( $u_{rep}$ ) составила 3,9% (раздел 2.8.2), в то время как погрешность восстановления ( $u(R_m)$  или  $u_{rec}$ ) составила 1,7 % и рассчитывалась по следующему уравнению.

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})}{C_{ref}}^2}$$

$R_m$  – восстановление

$s_{obs}$  – стандартное отклонение наблюдаемых данных

$C_{obs}$  – среднее значение наблюдаемых данных

$C_{ref}$  – референтное значение

$u(C_{ref})$  – погрешность референтного значения

На заключительном этапе (этап 4), была рассчитана суммарная погрешность. Перед сложением все составляющие погрешности должны быть выражены как стандартные погрешности (стандартные отклонения). Суммарная погрешность ( $u_c$ ) рассчитывалась по следующему уравнению.

$$u_c = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

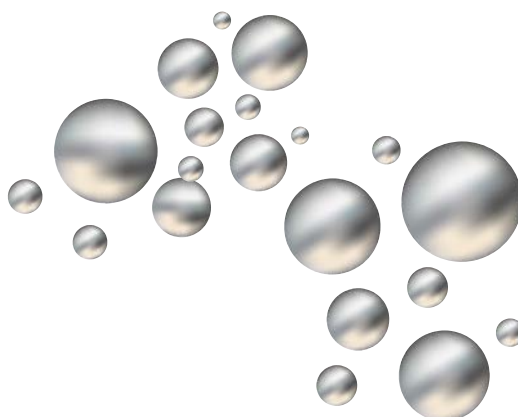
$u_c$  – суммарная погрешность

$u_{rep}$  – ошибка из-за воспроизводимости

$u_{rec}$  – ошибка из-за восстановления

Расширенная погрешность ( $U$ ) выражалась путем умножения  $u_c$  на коэффициент  $k$ . Выбор коэффициента  $k$  основан на желаемом уровне уверенности. При приблизительном уровне уверенности 95% коэффициент  $k$  равен 2.

Предположительная погрешность измерения содержания общей ртути в пуповинной крови путем термического разложения и CVAAS составляет 4,3%, расширенная погрешность ( $k=2$ ) – 8,4%. Оценка действительна для «нормального» диапазона экспозиции, который ниже 5,8 нг/г.



### 3. Интерпретация результатов

Наличие ртути в крови указывает на воздействие ртути в результате потребления зараженной рыбы или питьевой воды, вдыхания паров элементарной ртути, через стоматологические амальгамы или во время медикаментозного лечения. Присутствие ртути в крови указывает на недавнее или текущее воздействие ртути. Существует прямая зависимость между концентрацией ртути в крови человека и потреблением рыбы, загрязненной метилртутью. Обычно концентрация метилртути в крови достигает максимума в течение 4-14 часов и выводится из крови и других тканей организма через 20-30 часов (6).

На начальном этапе анализа данных (описательная статистика) для каждого биомаркера рассчитываются основные статистические значения: минимальное и максимальное значения, процентная доля субъектов, у которых значение биомаркера выше ПКО или ПО, и среднее геометрическое значение. Значения в процентилях, т.е. значения переменной, ниже которой падает определенная процентная доля наблюдений, также могут быть рассчитаны: 50-й百分иль (P50; медиана), 90-й百分иль (P90) и 95-й百分иль (P95). Могут также регистрироваться процентные доли результатов, превышающих референтные значения или значения, разработанные на основе оценки влияния на здоровье (20).

Данные биомониторинга человека можно интерпретировать путем сравнения измеренных уровней биомаркеров с референтными значениями биомониторинга, актуальных для здоровья людей. В этом контексте Комиссия по биомониторингу человека Германии вывела референтные значения для нескольких соединений (21). Эти значения были определены либо на основе зависимости эффекта воздействия от уровня (например, для кадмия, свинца, ртути и пентахлорфенола), либо на основе допустимых суточных значений потребления (20).

Средние геометрические значения содержания ртути в крови в большинстве национальных обследований в Европе были ниже или около 1 мкг/л. Однако в некоторых подгруппах населения уровни воздействия превышали безопасные для здоровья 5 мкг/л (20).

ВОЗ считает, что нормальный средний уровень концентрации ртути в крови составляет 5-10 мкг/л у лиц, не потребляющих зараженную рыбу (6). Национальный исследовательский комитет Соединенных Штатов Америки определяет 2 мкг/л в качестве нормальной средней концентрации ртути для групп населения, не потребляющих или почти не потребляющих рыбу в США (22).

Рассчитанные при помощи биомониторинга уровни ртути в пуповинной крови составляют около 5-6 мкг/л, а в крови – около 4-5 мкг/л. Эта зависимость, как правило, прямо пропорциональна.

В таблице 4 приведен пример концентраций в крови в популяциях различных провинций Канады из исследования 2003 г. «Программа арктического мониторинга и оценки» (AMAP) (23).

Таблица 4. Резюме данных из Канады об уровнях содержания ртути и метилртути в материнской крови

Страна/ национальность/ регион	Число обследованных лиц	Среднее содержание ртути (мкг/л)	Диапазон содержания ртути (мкг/л)	Среднее содержание метилртути (мкг/л)	Диапазон содержания метилртути (мкг/л)
Канада	134	0,9	нв-4,2	0,69	нв-3,6
Европеоидная 1 (1994-1999 гг.)					
Метисы/дэне (1994-1995 гг.)	92	1,4	нв-6,0	0,8	нв-4,0
Другие (1995 г.)	13	1,3	0,2-3,4	1,2	нв-3,0
Баффин 1 (1996 г.)	31	6,7	нв-34	6,0	нв-29
Инувик 1 (1998-1999 гг.)	31	2,1	0,6-24	1,8	нв-21
Китикмеот 1 (1994-1995 гг.)	63	3,4	нв-13	2,9	нв-11
Киваллик 1 (1996-1997 гг.)	17	3,7	0,6–12	2,7	0,4–9,7
Нунавик 2 (1995-2000 гг.)	162	9,8	1,6-44	нд	нд

нв = не выявлено; нд = недоступно.

Источник: АМАР 2003 (23).

Средние соотношения между уровнем потребления (мкг/кг в день) и уровнем в крови (мкг/л) в одной популяции, как ожидается, будут в целом одинаковыми. Количественная связь между уровнями ртути в крови и среднесуточной дозой (или потреблением) ртути (особенно метилртути) достаточно хорошо изучена.

Поэтому такие преобразования доз часто можно делать с уверенностью при наличии достаточной информации о разных формах ртути и других факторах. Однако при преобразовании доз следует учитывать неоднородность населения (24). Например, у взрослой женщины при среднем суточном потреблении 0,1 мкг метилртути на килограмм массы тела (0,1 мкг/кг в сутки), по оценкам, уровень метилртути в пуповинной крови составляет около 5-6 мкг/л (24).



# Библиография

1. Ртуть и здоровье [информационный веб-бюллетень]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2013 г. (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>, по состоянию на 26 октября 2020 г.).
2. Holmes P, James KA, Levy LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci Total Environ.* 2009;408:171–82 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969709009061?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
3. Hong YS, Kim YM, Lee KE. Methylmercury exposure and health effects. *J Prev Med Public Health.* 2012;45(6):353–63 (<https://www.jpmp.org/journal/view.php?doi=10.3961/jpmp.2012.45.6.353>, accessed 31 January 2018).
4. Woods JS, Martin MD, Leroux BG, DeRouen TA, Leitao JG, Bernardo MF et al. The contribution of dental amalgam to urinary mercury excretion in children. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1527–31 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2022658/>, accessed 31 January 2018).
5. Zeitz P, Orr MF, Kaye WE. Public health consequences of mercury spills: hazardous substances emergency events surveillance system, 1993–1998. *Environ Health Perspect.* 2002;110:129–3. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240725/pdf/ehp0110-000129.pdf>, accessed 31 January 2018).
6. Methylmercury. Environmental Health Criteria 101. Geneva: World Health Organization and International Programme on Chemistry Safety; 1990 ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38082/1/9241571012\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38082/1/9241571012_eng.pdf), accessed 31 January 2018).
7. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2008 (<http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf?ua=1>, accessed 31 January 2018).
8. Mason HJ, Hindell P, Williams NR. Biological monitoring and exposure to mercury. *Occup Med.* 2001;51:2–11 ([https://www.researchgate.net/publication/12095723\\_Biological\\_monitoring\\_and\\_exposure\\_to\\_mercury](https://www.researchgate.net/publication/12095723_Biological_monitoring_and_exposure_to_mercury), accessed 31 January 2018).
9. Barregård L. Biological monitoring of exposure to mercury vapour. *Scand J Work Environ Health.* 1993;19(1):45–9 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/8159972/>, accessed 31 January 2018).
10. Miklavčič A, Cuderman P, Mazej D, Snoj Tratnik J, Krsnik M, Planinšek P et al. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environ Res.* 2011;111:1201–7 ([http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/41/131/41131311.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/41/131/41131311.pdf), accessed 31 January 2018).
11. Gradjean P, Jørgensen PJ, Weihe P. Validity of mercury exposure biomarkers. In: Wilson SH, Suk WA, editors. *Biomarkers of environmentally associated disease*. Boca Raton: CRC Press; 2002:235–47.
12. Smolders R, Schramm K-W, Nickmilder M, Schoeters G. Applicability of non-invasively collected matrices for human biomonitoring. *Environ Health.* 2009;8:8 (<https://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-8-8>, accessed 31 January 2018).
13. Gradjean P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Weihe P. Umbilical cord mercury concentration as a biomarker of prenatal exposure to methylmercury. *Environ Health Perspect.* 2005;113:905–8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257654/>, accessed 31 January 2018).
14. Miklavčič A, Casetta A, Snoj Tratnik J, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M et al. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res.* 2013;120:7–17 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393511200268X?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).

15. Akagi H. Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. In: Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations, Manila, 26–27 November 1997. Minamata: National Institute for Minamata Disease; 1998:131–41.
16. DMA 80. In: Milestone [website]. Sorisole: Milestone; 2018 (<https://www.milestonesrl.com/en/mercury/dma-80/>, accessed 31 January 2018).
17. ISO/IEC 17025:2005 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. Женева: Международная организация по стандартизации; 2005 г. (<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:ru>, по состоянию на 17 октября 2020 г.).
18. Eurachem [website]. Olomouc: Eurachem; 2018 (<http://www.eurachem.org>, accessed 31 January 2018).
19. Barwick VJ, Prichard E, editors. Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3. Eurachem; 2011 ([https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM\\_2011\\_Final\\_web.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM_2011_Final_web.pdf), accessed 12 December 2017).
20. Биомониторинг человека: факты и цифры. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2015 г. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/164589>, по состоянию на 26 октября 2020 г.).
21. Schulz C, Conrad A, Becker K, Kolossa-Gehring M, Seiwert M, Seifert B. Twenty years of the German Environmental Survey (GerES): Human biomonitoring – temporal and spatial (West Germany/East Germany) differences in population exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(3–4):271–97 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463907000454?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
22. National Research Council. Toxicological effects of methylmercury. Washington, DC: National Academy Press; 2000 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225778/>, accessed 31 January 2018).
23. AMAP Assessment 2002: Human health in the Arctic. Oslo: Arctic Monitoring and Assessment Programme; 2003 (<https://www.amap.no/documents/doc/amap-assessment-2002-human-health-in-the-arctic/95>, accessed 31 January 2018).
24. Stern AH. A revised probabilistic estimate of the maternal methyl mercury intake dose corresponding to a measured cord blood mercury concentration. *Environ Health Perspect*. 2005;113(2):155–63 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277858/>, accessed 31 January 2018).

# Приложение 1. Бланк для забора проб пуповинной крови

Имя матери	
Номер медицинской карты	
ИД номер обследования матери	
Медицинский работник	Подпись:  Имя печатными буквами:
1. Дата и время забора проб	-----/-----/-----/ (день/месяц/год) Начало: -----/----- (часы/минуты)
2. За сколько часов до взятия проб вы в последний раз ели?	__ __ часы
3. Объем собранной крови (примерно)	__ __ __ мл

## Приложение 2. Регистрация проб пуповинной крови

Заполняется акушеркой

Название больницы: \_\_\_\_\_

Имя акушерки, осуществляющей забор проб: \_\_\_\_\_

Имя пациента	ИД номер пробы	Информация о рождении ребенка	Забор проб пуповинной крови	Информация о пробе Пробирка 1	Информация о пробе Пробирка 2
		Дата: _____ Время: _____	Время начала забора Время окончания забора	<b>Пробирка В1 с ЭДТК:</b> объем= _____мл <b>(мин. 10 мл)</b> температура хранения -20 °С	<b>Пробирка В2:</b> объем= _____мл <b>(мин. 2 мл)</b> температура хранения -20 °С
		Дата: _____ Время: _____	Время начала забора Время окончания забора	<b>Пробирка В1 с ЭДТК:</b> объем= _____мл <b>(мин. 10 мл)</b> температура хранения -20 °С	<b>Пробирка В2:</b> объем= _____мл <b>(мин. 2 мл)</b> температура хранения -20 °С
		Дата: _____ Время: _____	Время начала забора Время окончания забора	<b>Пробирка В1 с ЭДТК:</b> объем= _____мл <b>(мин. 10 мл)</b> температура хранения -20 °С	<b>Пробирка В2:</b> объем= _____мл <b>(мин. 2 мл)</b> температура хранения -20 °С

ЭДТК = этилендиаминтетрауксусная кислота.

# Стандартные операционные процедуры для оценки содержания ртути в моче

(сбор образцов, анализ содержания общей ртути, толкование результатов)

## Резюме

В данных стандартных операционных процедурах описывается процесс оценки воздействия ртути в обследованиях на основе биомониторинга человека с использованием мочи в качестве биологической среды. В этом документе подробно описаны процедуры забора проб мочи, анализа содержания общей ртути и интерпретации результатов.

## Ключевые слова

Mercury – analysis  
Mercury – urine  
Methylmercury Compounds – analysis  
Urine – chemistry  
Biomarkers – analysis  
Maternal Exposure  
Maternal-Fetal Exchange  
Infant, Newborn  
Environmental Exposure

## Авторы

Milena Horvat  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения  
Vesna Fajon  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения  
Janja Snoj Tratnik  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения  
Argelia Castaño  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III, Испания  
Marta Esteban  
Национальный центр гигиены окружающей среды, Институт здравоохранения им. Карлоса III, Испания  
Greet Schoeters  
VITO, Беретанг, Бельгия



# Содержание

<b>Условные сокращения</b> .....	<b>102</b>
<b>Введение: моча как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека</b> .....	<b>103</b>
<b>1. Забор образцов мочи</b> .....	<b>104</b>
1.1. Сфера применения метода .....	104
1.2. Меры предосторожности .....	104
1.3. Необходимые материалы.....	104
1.4. Подготовка/предварительная обработка материалов, необходимых для забора проб.....	106
1.5. Процедура забора проб .....	107
1.6. Маркировка .....	108
1.7. Транспортировка и консервирование образцов .....	108
1.8. Прием образцов .....	108
1.9. Пробоподготовка/разделение на аликвоты .....	110
1.10. Хранение и консервирование .....	110
1.11. Контроль качества .....	110
<b>2. Анализ содержания общей ртути в моче</b> .....	<b>111</b>
2.1. Сфера применения метода .....	111
2.2. Технический принцип .....	111
2.3. Меры предосторожности .....	112
2.4. Оборудование, материалы и растворы.....	112
2.5. Калибровка .....	114
2.6. Процедура .....	115
2.7. Вычисление аналитических результатов.....	116
2.8. Контроль качества .....	216
2.9. Оценка метода .....	117
<b>3. Анализ креатинина в моче</b> .....	<b>122</b>
3.1. Сфера применения метода .....	122
3.2. Технический принцип .....	123
3.3. Меры предосторожности .....	123
3.4. Оборудование, материалы и растворы.....	123
3.5. Пробоподготовка и разделение на аликвоты.....	125
3.6. Процедура .....	126
3.7. Контроль качества .....	126
3.8. Оценка метода .....	128
3.9. Источники ошибки.....	129
3.10. Альтернативный метод: определение относительной плотности образцов мочи .....	130
<b>4. Интерпретация результатов</b> .....	<b>131</b>
<b>Библиография</b> .....	<b>132</b>
<b>Приложение 1. Инструкции по забору проб мочи для участников обследования</b> .....	<b>135</b>
<b>Приложение 2. Вопросник для забора проб мочи</b> .....	<b>136</b>
<b>Приложение 3. Список приема образцов</b> .....	<b>137</b>

# Условные сокращения

БМЧ	биомониторинг человека
ИД	идентификационный (код)
ОП	относительная плотность
ПКО	предел количественного определения
ПО	предел обнаружения
СОП	стандартные операционные процедуры
CVAAS	атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара
Hg	ртуть

## Введение: моча как биосреда, используемая для биомониторинга воздействия ртути на человека

Ртуть (Hg) — это природный элемент, который распространяется в окружающей среде в результате как природных, так и антропогенных процессов. Она устойчива в окружающей среде и встречается в различных химических формах, а именно: в форме элементарной ртути, неорганической ртути (соединения  $Hg^{2+}$ ) и органической ртути (в основном метилртути, MeHg) (1).

Наиболее всего от ядовитого воздействия ртути страдают почки, нервная и сердечно-сосудистая системы. Воздействие элементарной ртути и метилртути больше всего вредит нервной системе человека, а воздействие неорганических соединений ртути в основном приводит к повреждению почек (1,2).

Воздействие элементарной или неорганической ртути происходит в результате разливов ртути, использования стоматологических амальгам, вдыхания паров ртути в помещении, в котором были разбиты термометры и ртутьсодержащие лампочки, использования некоторых осветляющих кожу кремов, мыла и некоторых ртутьсодержащих традиционных лекарственных препаратов, а также применения ртути в культурных традициях и воздействия на рабочем месте (3-5).

Уровень воздействия можно оценить путем измерения содержания загрязняющих веществ в различных биосредах, таких как волосы, кровь или моча, которые являются полезными инструментами для оценки воздействия ртути как на отдельных лиц, так и на целые популяции (3,6-8).

Уровни ртути в моче обычно считаются наилучшим показателем недавнего воздействия неорганической ртути или паров элементарной ртути, поскольку считается, что содержащаяся в моче ртуть наиболее точно отражает уровни этого элемента, присутствующие в почках (3).

Моча легко собирается и доступна в больших количествах, чем другие биосреды. Разовые порции мочи обычно используются вместо суточных проб, так как последние более неудобны для сбора, и существует большая вероятность их загрязнения из-за постоянного вскрытия сосуда.

Недостатком разовых проб мочи является непостоянство объема произведенной мочи и тот факт, что концентрация эндогенных и экзогенных химических веществ может значительно различаться от опорожнения к опорожнению в зависимости от гидробаланса, времени последнего мочеиспускания и т.д. Поэтому разовые образцы требуют регулировки посредством разбавления. Для корректировки концентрации мочевого биомаркера можно использовать несколько методов, например, это можно делать посредством корректировки уровня креатинина или измерения относительной плотности (9-11).

Хотя разовые пробы мочи могут быть взяты в любое время суток, рекомендуется брать образцы мочи при первом мочеиспускании утром, поскольку в противном случае целевой биомаркер может оказаться ниже предела количественного определения (ПКО) из-за разбавления образца. Также возможен забор проб мочи по истечении как минимум пяти часов после последнего мочеиспускания.



# 1. Забор проб мочи

## 1.1. Сфера применения метода

Метод забора проб мочи, описанный в данных стандартных операционных процедурах (СОП), позволяет проводить анализ концентрации ртути и охватывает все преаналитические фазы оценки воздействия ртути при помощи мочи на основе биомониторинга человека (БМЧ). Соблюдение процедуры забора проб, подробно описанной в настоящих СОП, позволяет техническим специалистам на местах надлежащим образом собирать и обрабатывать биологические пробы до того, как они будут проанализированы в лаборатории.

## 1.2. Меры предосторожности

Образцы мочи будут собираться самими женщинами, выбранными для участия в обследовании. Однако при работе с образцами (разделение на аликвоты или проведение любых других манипуляций) следует соблюдать требования техники безопасности, установленные для работы с биологическими материалами.

- Работа с физиологическими жидкостями или тканями должна проводиться в перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- Утилизируйте одноразовые пластиковые, стеклянные и бумажные материалы (напр., наконечники пипеток, автодозаторные пробирки и перчатки), которые соприкасаются с биологическими жидкостями человека, такими как моча, в специальные пакеты для утилизации опасных биологических отходов в автоклаве.
- Храните эти пакеты в соответствующих контейнерах до тех пор, пока они не будут запечатаны и помещены в автоклав.

## 1.3. Необходимые материалы

В таблице 1 приведены материалы, необходимые для отбора проб и предварительной обработки пробоотборного материала.

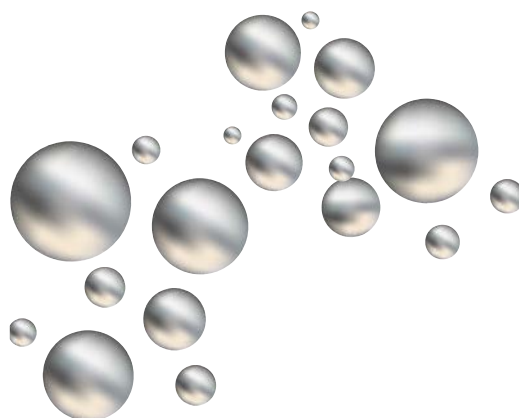


Таблица 1. Материалы для забора проб мочи

Материал	Предназначение	Альтернатива
Сверхчистая 65% азотная кислота	Используется для очистки сосудов с целью устранения загрязнения фоновым металлом.	
Дистиллированная вода	Используется в процессе очистки.	Бидистиллированная вода
Контейнеры	Три разных резервуара для процесса очистки; 1 - для раствора кислоты и 2 - для воды.	
Сосуды для мочи (см. ниже)	Сосуды, которые могут быть плотно закрыты. Объем сосуда зависит от количества мочи, необходимого для анализа и биобанкинга (если планируется).	
Кислотостойкие перчатки	Меры безопасности.	
Этикетки	Образцы должны быть однозначно идентифицированы.	Написание ИД кода непосредственно на сосуде с помощью перманентного маркера
Перманентный маркер	Необязателен, но очень полезен для отметки минимального количества образца, которое необходимо собрать.	Любые другие письменные принадлежности, обеспечивающие, что маркировка останется четко различимой.
Фильтровальная бумага	Используется при промывке сосудов.	
Пластиковые пакеты с застежкой	Используются для дальнейшей изоляции сосуда.	Любой другой тип пакетов
Изотермическая упаковка	Пробы мочи должны храниться при температуре 4 °С до доставки в лабораторию.	
Этикетки с защитой от замерзания для идентификации образцов	Используются для маркировки образцов.	
Сульфаминовая кислота 2М	С целью предотвращения потери ртути из мочи до анализа.	

ИД = идентификационный (код).

Для анализа на предмет содержания ртути до забора проб мочи в пробирку необходимо добавить сульфаминовую кислоту 2М в пропорции 10 мкл консервантного раствора на 1 мл мочи (напр., в пробирку, содержащую 50 мкл консерванта, можно добавить до 5 мл мочи для анализа содержания ртути).

## 1.4. Подготовка/предварительная обработка материалов, необходимых для забора проб

Сосуды, используемые для забора проб мочи, должны быть предварительно очищены для устранения загрязнения фоновыми металлами. Все сосуды и их крышки должны быть промыты раствором азотной кислоты в соответствии со следующей процедурой. Обратите внимание, что предварительная промывка сосудов должна проводиться в химическом вытяжном шкафу в соответствии с надлежащей лабораторной практикой и с соблюдением лабораторных правил техники безопасности. При этом работа должна проводиться в средствах личной защиты.

1. Разметьте различные емкости в соответствии с содержащимся в них раствором: 10% азотная кислота; бак для промывки 1; бак для промывки 2.
2. Поместите их в химический вытяжной шкаф.
3. Приготовьте разбавленный раствор азотной кислоты из сверхчистой 65% азотной кислоты и очищенной воды. (Примечание: 18 л раствора кислоты (2,8 л 65% азотной кислоты и 15,2 л бидистиллированной воды) требуется для очистки примерно 240 емкостей вместимостью 100 мл. Кислотный раствор можно использовать в течение одного месяца после приготовления).
4. Заполните баки соответствующим раствором.
5. Откройте сосуды и поместите их в бак с кислотным раствором вместе с крышками (оставьте на ночь или как минимум на три часа). Убедитесь, что емкости и крышки полностью погружены в раствор (фото 1).

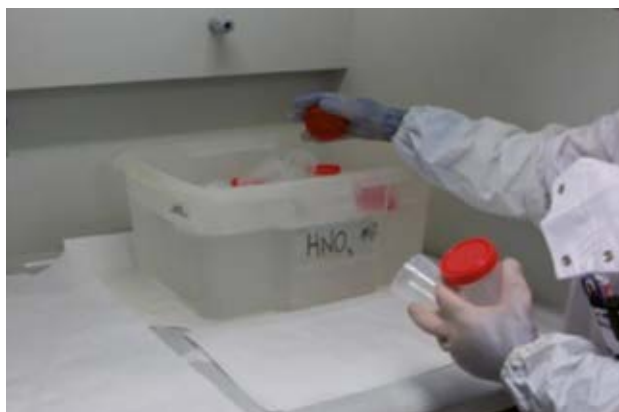


Фото 1. Емкости и крышки помещаются в кислотный раствор.

© Instituto de Salud Carlos III

6. Выньте емкости из бака с кислотным раствором и поместите их в первый бак с очищенной водой, встряхните 2-3 минуты. Затем переместите емкости и крышки во второй бак, снова встряхните 2-3 минуты (фото 2).



Фото 2. Споласкивание емкостей в баке с очищенной водой.

© Instituto de Salud Carlos III

7. Выньте емкости и крышки из второго бака с водой и поместите их вверх дном на чистый лист фильтровальной бумаги в химический вытяжной шкаф для просушки (фото 3).

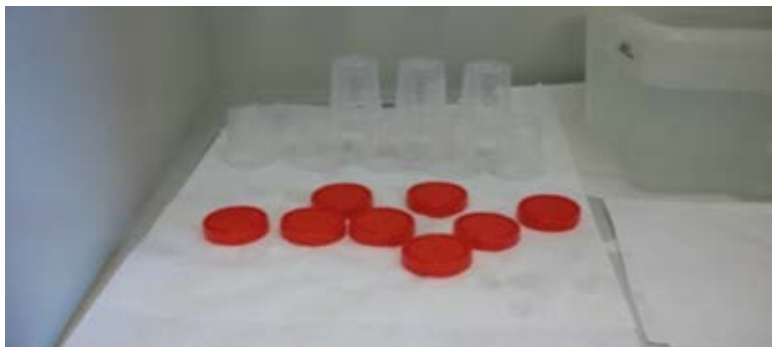


Фото 3. Сушка емкостей и крышек в вытяжном шкафу.

© Instituto de Salud Carlos III

8. Закройте емкости крышками, затем пометьте на них минимальный требуемый объем образца (примечание: это не обязательно, но полезно, чтобы избежать взятия проб недостаточного объема). Поместите каждую промытую емкость в пластиковый пакет с застежкой (фото 4а и b).



Фото 4а и b. Пометка минимального объема (а) и вложение емкостей в пластиковый пакет с застежкой.

© Instituto de Salud Carlos III

После процедуры мойки следует проверить наличие загрязнения, случайно выбрав 5% промытых емкостей и наполнив их очищенной водой. После 10 минут встряхивания из каждой емкости следует взять по одной аликвоте для определения концентрации ртути.

Наконец, если емкости поступают из разных партий, необходимо записать информацию о партиях емкостей, отправленных в каждый робоотборный центр.

## 1.5. Процедура забора проб

Желательно, чтобы лица, проводящие обследование на местах, заранее предоставляли емкости для сбора мочи волонтерам, чтобы те могли собрать первую утреннюю порцию мочи. (В качестве альтернативы можно взять у матери образец мочи при ее поступлении в родильное отделение до рождения ребенка). Каждая емкость должна сопровождаться подробными письменными инструкциями по забору проб мочи (см. пример в приложении 1). В дополнение к этим письменным инструкциям лица, проводящие обследование на местах, должны лично объяснить волонтерам, как собирать образец мочи, а также прояснить любые вопросы и сомнения. Вопросники для сбора образцов мочи (приложение 2) следует заполнять во время забора проб.

Собранные пробы мочи должны храниться при температуре 4 °C до их доставки в лабораторию. В качестве альтернативы образцы мочи можно разделить на аликвоты в родильном отделении и заморозить при температуре -20 °C. В этом случае пробы должны храниться в замороженном состоянии во время транспортировки в лабораторию.

Примечание: контрольные холостые пробы следует регулярно использовать (как минимум по одной в каждом родильном отделении). Контейнеры для холостых проб необходимо открывать в родильном отделении, при этом с ними необходимо обращаться в точности так же, как с контейнерами для обычных проб, но без взятия проб. Это позволяет оценить потенциальное заражение образцов в месте забора проб.

## 1.6. Маркировка

Контейнеры для образцов мочи можно маркировать двумя способами.

- Заранее после процедуры мойки: к контейнеру прикрепляется этикетка с идентификационным (ИД) кодом и пробелом для указания даты забора проб.
- После взятия пробы: сразу же после того, как волонтер доставит образец, работник должен прикрепить к контейнеру этикетку с указанием ИД кода и даты забора проб.

## 1.7. Транспортировка и консервирование образцов

Образцы мочи должны храниться при температуре 4 °С до доставки в лабораторию, где они будут разделены на аликвоты и проанализированы или будут храниться до проведения анализа. (В качестве альтернативы, образцы могут разделяться на аликвоты и замораживаться в родильном отделении). Более того, образцы мочи должны перевозиться с соблюдением соответствующих правил транспортировки биологического материала. На фото 5 показана надлежащая изотермическая упаковка для транспортировки образцов.



Фото 5. Пример изотермической упаковки.  
© Instituto de Salud Carlos III

## 1.8. Прием образцов

Следующие пункты должны быть проверены при получении образцов мочи.

- Условия перевозки и хранения образцов (образцы, которые перевозились и хранились при высокой температуре, не могут быть приняты).
- Использование консервантов во время забора проб (для отбора проб мочи на анализ ртути следует использовать контейнеры с сульфаминовой кислотой 2M).
- Упаковка должна быть правильно запечатана и не должна была подвергаться никаким манипуляциям (примечание: на упаковке в месте забора образцов может быть поставлена защитная пломба).
- В упаковке должны находиться все образцы, перечисленные в реестре собранных образцов.
- Все образцы должны сопровождаться соответствующими документами (вопросники и т.д.).
- Все полученные образцы и документы должны быть надлежащим образом идентифицированы при помощи соответствующего ИД кода.
- Образцы должны быть правильно собраны (в достаточном объеме).
- Транспортировочный контейнер не должен быть загрязнен.



В приложении 3 приводится образец бланка принятия проб мочи. Пункты данного документа могут варьироваться в зависимости от требований к сохранности проб или стабильности/консервированию аналита.

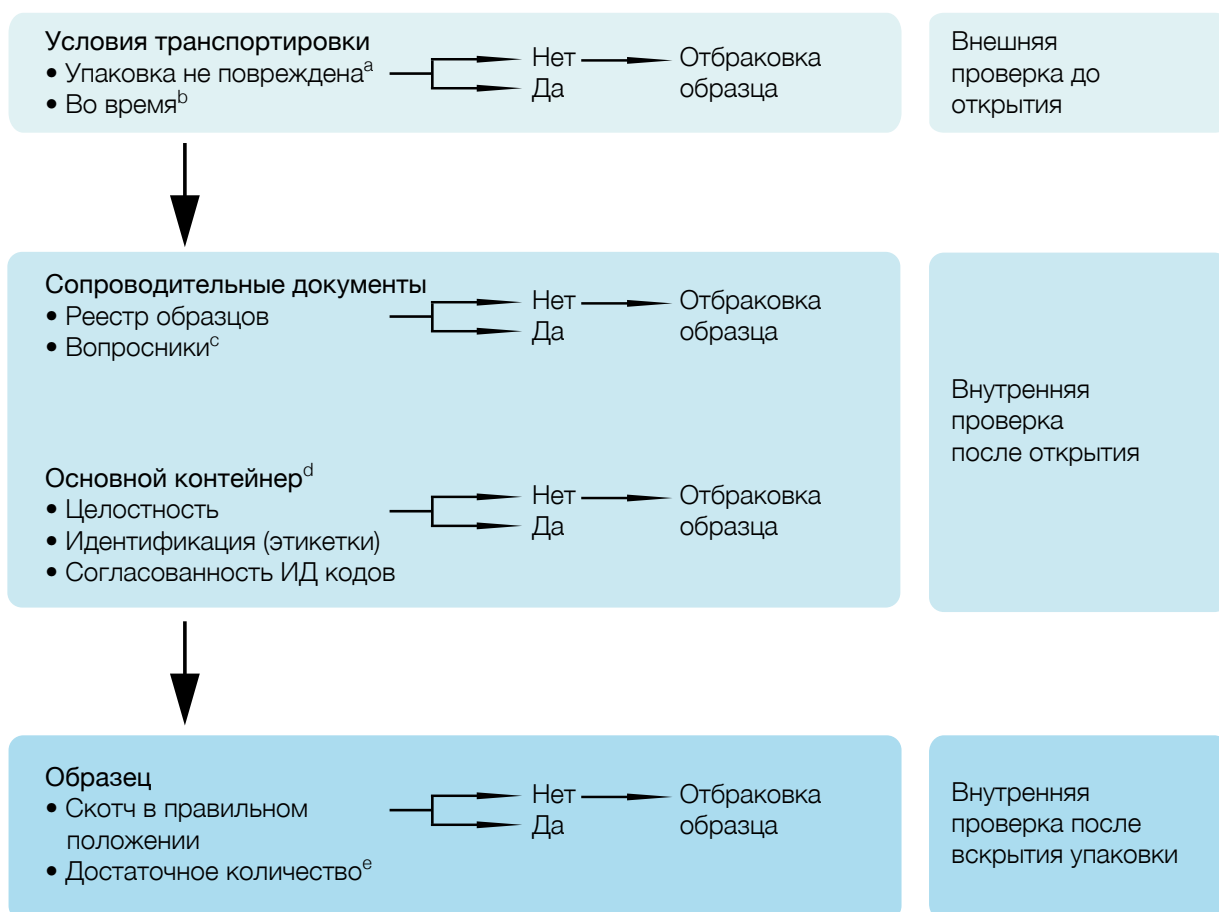
Примечание: если использовались рабочие холостые пробы (например, емкости с очищенной водой), их следует проверять и регистрировать таким же образом, как и остальные образцы.

### 1.8.1. Критерии приема/отбраковки проб

Критерии приема или отбраковки пробы должны быть определены заранее и применены во время приема пробы. Эти критерии должны касаться условий транспортировки, прилагаемой документации, целостности

упаковки, правильной идентификации, количества образца (достаточное для анализа и биобанкинга, если образцы будут храниться в других исследовательских целях). Для выполнения единой процедуры и применения одинаковых критериев ко всем полученным образцам, можно следовать плану, приведенному на рис.1.

Рис. 1. План приема образцов



<sup>a</sup> Упаковка должна быть правильно запечатана и не должна была подвергаться манипуляциям.

<sup>b</sup> Максимальный промежуток времени между взятием пробы и ее поступлением в лабораторию должен быть определен заранее.

<sup>c</sup> Если один или несколько вопросов в вопросниках имеют решающее значение для интерпретации результатов или являются критерием включения/исключения, их необходимо проверить.

<sup>d</sup> Следует проверить состояние полиэтиленового мешка с застежкой-молнией. Все образцы должны быть надлежащим образом идентифицированы, необходимо проверить соответствие ИД кодов образцов и вопросников.

<sup>e</sup> Размер образцов является критически важным моментом. Если образец недостаточного размера для проведения химического анализа, он должен быть отбракован.

## 1.9. Пробоподготовка/разделение на алиquotы

Разделение образцов на алиquotы можно проводить в больнице или в лаборатории после транспортировки проб из больницы. Образцы мочи следует разделять на алиquotы в соответствии с надлежащей лабораторной практикой и с соблюдением лабораторных правил техники безопасности. При этом работа должна проводиться в средствах личной защиты. Следует приблизительно оценить число и объем необходимых алиquot, чтобы избежать лишних циклов замораживания и оттаивания. Следует проконсультироваться с лабораторией, проводящей анализ, чтобы установить требуемый объем алиquot и минимальный объем мочи, необходимый для анализа.

Полный список пробирок для алиquot приводится ниже.

### 1. Пробирка U1 (ртуть).

a. 5 мл мочи: влейте (без пипетирования!) в предварительно обработанный пластиковый неметаллический контейнер, содержащий сульфаминовую кислоту, добавленную перед забором проб. Хорошо размешайте мочу после добавления в виалу.

b. Замораживание и хранение при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Пробирка U2 (креатинин).

a. 5 мл мочи: влейте в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 мл.

b. Замораживание и хранение при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

3. Дополнительные пробирки: остаток мочи можно перелить в отдельные пробирки для дополнительных анализов. Рекомендуется также хранить полипропиленовые пробирки объемом 10 мл или 40 мл в биобанке при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Примечание: обеспечьте однородность алиquot, встряхивая исходный образец после отделения каждой алиquotы.

## 1.10. Хранение и консервирование

Пробы, подлежащие хранению в течение более одного месяца, должны быть заморожены. Поскольку моча содержит много неорганических солей, даже в свежей моче может образовываться осадок. Поэтому для обеспечения однородности образца, его необходимо встряхнуть перед анализом. Существует также метод, при котором растворимость солей повышается за счет снижения уровня pH образца мочи путем добавления небольшого количества соляной кислоты. Примите меры для предотвращения размножения микроорганизмов, так как они могут переработать неорганическую ртуть в пары ртути, что приведет к испарению и потере ртути. Считается, что средний уровень содержания ртути в моче общей популяции в регионе, неподверженном какому-либо конкретному воздействию ртути, составляет менее 10 нг/мл. Было продемонстрировано, что ртуть остается стабильной на протяжении одного года при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Как правило, образцы мочи транспортируются и хранятся при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Процедуры хранения образцов должны быть установлены для контроля местоположения образца, числа оставшихся алиquot и т.д. После получения образцов заморозьте их при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до момента проведения анализа. После отбора алиquot для анализа аналитик должен поместить оставшиеся образцы в морозильную камеру и заморозить их при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Качество проб, которые размораживаются и повторно замораживаются несколько раз, не уменьшается даже при добавлении консервантов для хранения.

## 1.11. Контроль качества

### 1.1.1. Отслеживаемость

Возможность отслеживания выборки на протяжении всего обследования имеет решающее значение, поэтому этот аспект должен быть гарантирован. Как отмечалось выше, правильная

маркировка образцов и связанных с ними документов имеет важное значение, но при этом необходимо также иметь возможность связать образец с информацией, предоставленной волонтером. Настоятельно рекомендуется вести журнал записи образцов (примечание 3). Для этого необходимо определить базу данных, в которой может храниться эта информация. Доступ к этому файлу или документу должен быть ограничен, если в нем содержится конфиденциальная информация.

Если к одному образцу относятся несколько ИД кодов, например, аликвоты одного образца могут иметь разные коды, или если при поступлении образцов в лабораторию необходимо присвоить внутренний код, то все они должны быть занесены в базу данных.

## 2. Анализ содержания общей ртути в моче

Метод, описанный в настоящих СОП, подходит для определения содержания общей ртути в моче членов популяции с низким уровнем воздействия ртути и людей, подвергающихся воздействию на рабочем месте. Метод основан на кислотном разложении, восстановлении и измерении при помощи атомно-абсорбционной спектрометрии холодного пара (CVAAS). Это простой и чувствительный метод. Он разработан для прибора, не требующего сложного обслуживания, и пропагандируется Японским национальным институтом по болезни Минамата (12).

В тех случаях, когда лаборатории располагают другим оборудованием для обнаружения ртути в разложенных в кислоте образцах, рекомендуется следовать инструкциям производителей прибора. Инструкции по забору проб и обращению с ними, приведенные в настоящих СОП, могут применяться независимо от того, какие приборы используются для обнаружения ртути. Необходимо проверить пределы обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО), чтобы убедиться, что они подходят для анализа мочи человека.

### 2.1. Сфера применения метода

Описанная процедура относится к обработке и подготовке пробы после отбора аликвот для анализа на содержание ртути. Концентрации общей ртути в моче членов неэкспонированной популяции обычно находятся в диапазоне 0,1-5 нг/мл. В случаях воздействия неорганической и элементарной ртути сообщалось о значениях до 10 нг/мл; однако на рабочих местах часто встречаются уровни выше 50 нг/мл. Описанный метод может охватывать все диапазоны, о которых обычно сообщается в популяции в целом, а также в условиях воздействия на рабочем месте.

### 2.2. Технический принцип

Пробы мочи разлагаются в кислоте, а ртуть обнаруживается при помощи CVAAS. Этот процесс основан на восстановлении ионной ртути в растворе до ее элементного состояния с последующим переносом в абсорбционную ячейку ртутного анализатора для измерения при длине волны 253,7 нм. Процесс измерения основан на системе потока свежего воздуха, которая требует наличия чистого окружающего воздуха в качестве газа-носителя, что делает прибор простым в эксплуатации.

В настоящее время существует множество детекторов для измерения ртути. Они основаны на атомно-абсорбционной или на атомно-флуоресцентной спектрометрии. При выполнении

процедур в лабораториях необходимо соблюдать инструкции производителей приборов (13, 14). См. также Стандартные рабочие процедуры для определения содержания общей ртути в волосах, крови и моче альтернативным методом.

## 2.3. Меры предосторожности

Для работы с физиологическими жидкостями или тканями соблюдайте универсальные меры безопасности: надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Утилизируйте одноразовые пластиковые, стеклянные и бумажные материалы (напр., наконечники пипеток, автодозаторные пробирки и перчатки), которые соприкасаются с биологическими жидкостями человека, такими как моча, в специальные пакеты для удаления опасных биологических отходов в автоклаве. Храните эти пакеты в соответствующих контейнерах до тех пор, пока их не запечатают и не поместят в автоклав.

По окончании работы протрите все рабочие поверхности, на которых обрабатывалась биологическая жидкость, 10% (об./об.) раствором гипохлорита натрия или его эквивалентом. Рекомендуется использовать ножную педаль на приборе Micromedic Digiflex, так как при этом уменьшается контакт аналитика с рабочими поверхностями, а также освобождаются руки для того, чтобы держать ванночки с образцами и пробирки автодозатора. Утилизируйте все биологические образцы и разбавленные материалы в автоклавном пакете для биологически опасных отходов в конце анализа в соответствии с указаниями по утилизации опасных отходов.

## 2.4. Оборудование, материалы и растворы

### 2.4.1. Оборудование

Метод, описанный в данных СОП, включает в себя следующее: восстановление неорганических ионов ртути в растворе испытуемого образца с хлористым оловом для выделения элементарных паров ртути; и введение паров ртути в абсорбционную ячейку анализатора ртути для измерения поглощения при длине волны 253,7 нм. В этом методе используется система циркуляции свежего воздуха, как показано на рис. 2. Аппарат представляет собой закрытую систему и состоит из диафрагменного насоса, реакционного сосуда, ловушки кислотных газов, влагоуловителя (ледяной ванны) и 4-ходового крана.

В процессе работы аппарата пары элементарной ртути, образующиеся при добавлении хлористого олова, циркулируют через 4-ходовой кран со скоростью потока 1-1,5 л/мин на протяжении 30 секунд для того, чтобы сбалансироваться между газообразной и водной фазами. Затем 4-ходовой кран поворачивается на 90° для одновременного ввода ртути в газовой фазе в абсорбционную ячейку. Измерение одного образца в этом приборе осуществляется в течении одной минуты. С его помощью можно обнаружить даже 0,1 нг ртути с высокой достоверностью и точностью.

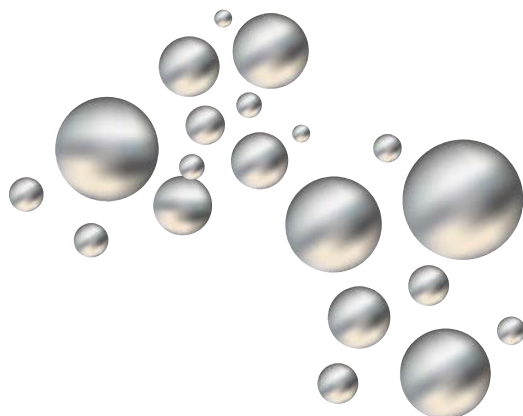
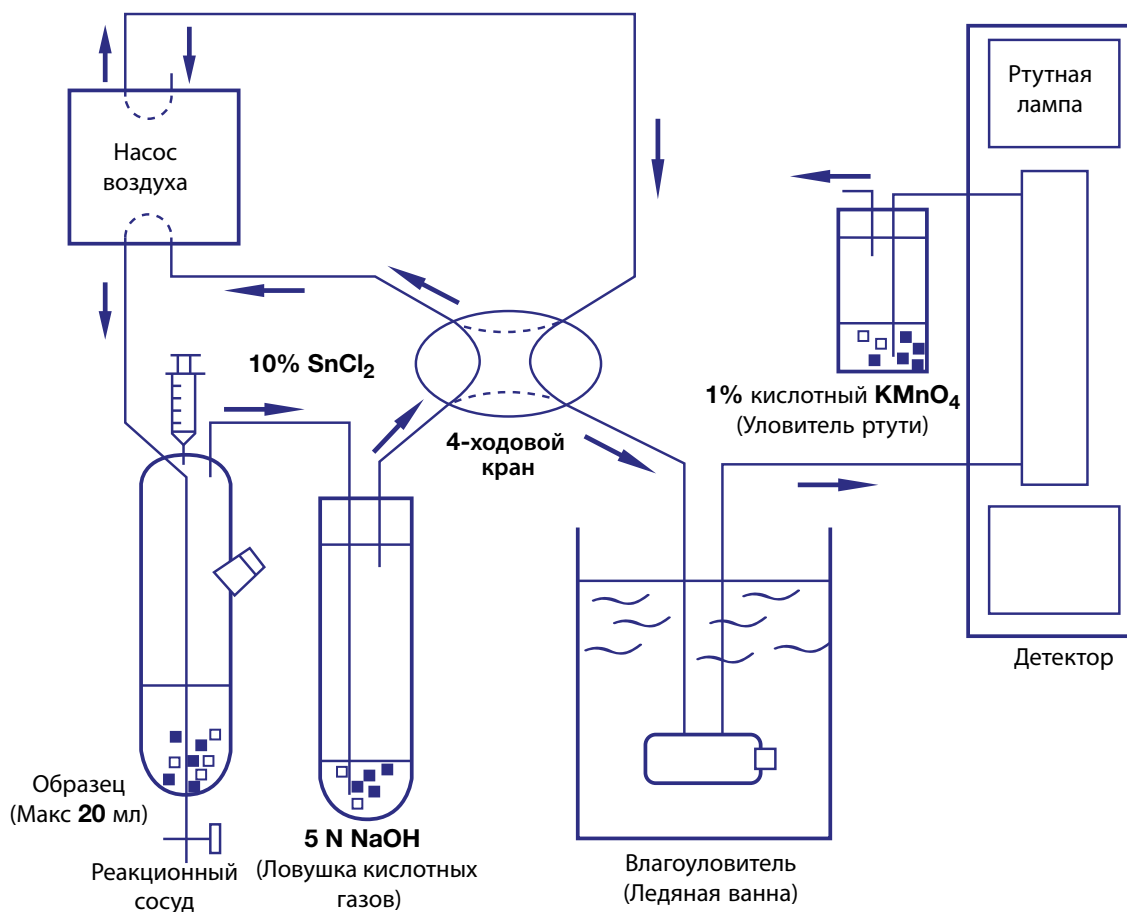


Рис. 2. Схематическая диаграмма восстановления/атомно-абсорбционной спектроскопии холодного пара (система циркуляции потока свежего воздуха)



Источник : Akagi 1997 (12).

### 2.4.2. Материалы

Для анализа содержания общей ртути в моче необходимы следующие материалы:

- анализатор ртути: полуавтоматический анализатор ртути, модель Hg-201;
- электрическая плитка, способная достигать температуру поверхности 250 °С;
- колба для разложения образца: мерная колба с утолщенными стенками вместимостью 50 мл из пирекса (высотой 150 мм и диаметром входа 13 мм);
- мерные колбы: 10, 100 и 1000 мл;
- мерные пипетки: 0,2; 0,5; 1,5 и 10 мл; также можно использовать автоматические пипетки (диапазон 0,1 –10 мл);
- центрифуга;
- многофазный расходомер: комплект принадлежностей для многофазного расходомера типа V4.

### 2.4.3. Реагенты и химикаты

Для анализа содержания общей ртути в моче необходимы следующие реагенты и химикаты.

- Азотная кислота-хлорная кислота (1+1): подмешайте 100мл хлорной кислоты (для измерения токсичных металлов) в 100мл азотной кислоты (для измерения токсичных металлов). Храните в холодном темном месте.

- Серная кислота (для измерения токсичных металлов).
- Дистиллированная вода: дистиллируйте деионизированную воду и храните в чистой стеклянной емкости.
- Соляная кислота (чистая для анализа).
- Сульфаминовая кислота 2М: частично заполните бидистиллированной водой полипропиленовую пробирку центрифуги вместимостью 50 мл, предварительно проверенную или промытую кислотой. Добавьте 10 г сульфаминовой кислоты. Заполните до отметки 50 мл бидистиллированной водой. Растворите сульфаминовую кислоту, хорошо перемешав жидкость (для этого можно использовать вихревой смеситель или теплую водяную баню). Храните при комнатной температуре. Срок годности – один год с момента приготовления.
- 10% раствор хлористого олова (II): растворите 10 г дигидрата хлористого олова (II) (чистого для анализа) в 9 мл соляной кислоты и разбавьте до 100 мл дистиллированной водой. Насытите газообразным азотом (100 мл/мин, 20-30 минут), чтобы вывести ртуть из раствора.
- Гидроксид натрия 5М: растворите 20 г гидроксида натрия (чистого для анализа) в дистиллированной воде для получения конечного объема 100 мл.
- Гидроксид натрия 0,1М: разбавьте 5 н гидроксид натрия в 50 раз дистиллированной водой.
- 2М серной кислоты: постепенно добавьте 30 мл серной кислоты (для измерения токсичных металлов) в дистиллированную воду для получения конечного объема 1000 мл.
- 0,5% раствор перманганата калия: растворите 0,5 г перманганата калия (чистого для анализа) в дистиллированной воде для получения конечного объема 100 мл. Это используется для очистки стеклянной посуды.

#### 2.4.5. Калибровочные стандарты

##### Стандартные растворы неорганической ртути

Взвесьте 13,5 мг хлорида ртути (II) (стандарт) в мерной колбе вместимостью 100 мл, разведите в 4 мл раствора азотной и хлорной кислоты (1+1) и 10 мл серной кислоты, добавленных поочередно, а затем налейте дистиллированной воды до отметки для получения основного ртутного раствора (1 мл основного ртутного раствора = 100 мкг ртути). Полученный таким образом основной раствор ртути останется стабильным в течение нескольких лет, если будет храниться в запечатанном виде в холодном темном месте. При каждом использовании основной раствор разбавляется в 10 000 раз вышеуказанным холостым раствором для приготовления стандартного ртутного раствора (1 мл такого раствора = 0,010 мкг ртути). Это должно быть сделано в два последовательных шага. Разбавления следует производить при температуре окружающей среды 20-23 °С.

##### Стандартный раствор ртути

Стандартный раствор ртути (SRM 3177), приготовленный из высокоочищенного хлорида ртути (II), можно получить в Национальном институте стандартов и технологии (NIST) для проведения калибровки. Единица этого материала состоит из пяти ампул боросиликатного стекла, каждая ампула содержит около 10 мл раствора. Сертифицированное значение присваивается ртути с номинальной массовой долей 1 мг/г. Рабочие стандартные растворы готовятся путем соответствующего разбавления в 10 000 раз. Рабочий калибровочный раствор готовится в два этапа для получения концентрации 0,010 мкг/мл.

## 2.5. Калибровка

Метод калибровки при помощи многоточечного градуировочного графика не всегда требуется, т.к. этот график является линейным в широком диапазоне концентраций. Поэтому используется градуировочный график с тремя точками. В дополнение к холостому раствору следует выбрать наиболее подходящую концентрацию раствора стандартного образца (например, 0,01; 0,03 или 0,05 мкг ртути/50 мл) для измерения общего количества ртути с высотой пика близкой к высоте пика для раствора испытуемых образцов. В этом случае при измерениях следует использовать один и тот же объем как раствора

стандартных образцов, так и раствора испытуемых образцов. Это облегчит количественное определение.

## 2.6. Процедура

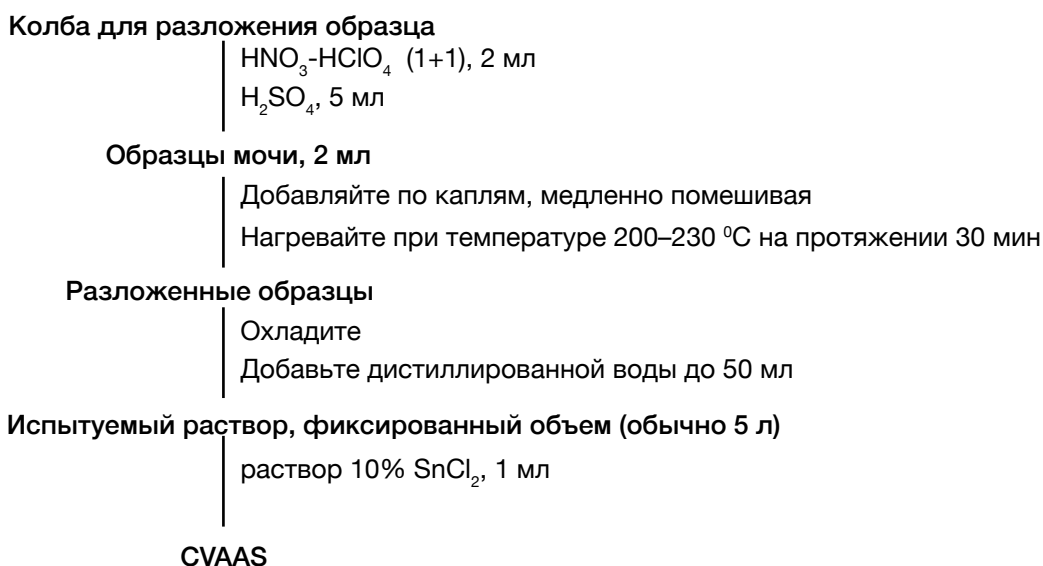
### 2.6.1. Кислотное разложение

На рис. 3 показана процедура определения общей концентрации ртути в моче. Заранее поместите 2 мл азотной кислоты - хлорной кислоты (1+1) и 5 мл серной кислоты в колбу для разложения образцов. Постепенно добавляйте образец мочи известного объема (обычно 2 мл), медленно помешивая. Выполните те же шаги, что и для приготовления холостого раствора и раствора стандартного образца.

Каждый образец должен быть приготовлен в двух экземплярах. Холостой раствор готовится аналогичным образом, что и растворы испытуемого образца, за исключением того, что в холостые колбы не добавляются образцы. Растворы стандартных образцов готовятся аналогичным образом, что и растворы испытуемого образца, за исключением того, что вместо образцов мочи в колбы добавляется стандартный раствор. Требуется не менее трех калибровочных точек, обычно покрывающих диапазон 0,5-5 нг/мл.

Колбы с образцами нагреваются в течение 30 минут на электроплитке при температуре 200-230 °С. После охлаждения колб добавьте туда дистиллированную воду для получения фиксированного объема 50 мл, хорошо перемешайте и используйте полученные растворы в качестве растворов испытуемых образцов.

Рис. 3. Определение общей ртути в моче



CVAAS атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара;

$\text{H}_2\text{SO}_4$  = серная кислота;

$\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$  = азотная кислота - хлорная кислота;

$\text{SnCl}_2$  = хлорид олова (II)

### 2.6.2. Измерение

Используемая для этого процесса автоматическая аппаратура имеется в продаже в виде полуавтоматического анализатора ртути модели Hg-201.

Аккуратно перенесите известные объемы раствора испытуемого образца (обычно 5 мл, максимум 10 мл) в реакционный сосуд ртутного анализатора, добавьте безртутную воду до

отметки 20 мл и закройте пробкой. Добавьте 1 мл 10% хлорида олова (II) в раствор 1 н соляной кислоты с помощью дозатора и нажмите кнопку пуска. Зарботает диафрагменный насос, и образовавшийся пар элементарной ртути будет циркулировать через 4-ходовой кран между реакционным сосудом и ловушкой для кислых газов в течение 30 секунд до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие между газовой и водной фазами. Кислотный газ, образующийся из раствора испытуемых образцов, собирается в щелочном растворе. Через 30 секунд 4-ходовой кран автоматически поворачивается на 90° для введения паров ртути в абсорбционную ячейку через ледяную ванну для измерения абсорбции. Показания регистратора резко возрастут и уменьшатся с резким пиком. Когда показания регистратора начнут уменьшаться, откройте спускной кран в нижней части реакционного сосуда, чтобы удалить раствор, затем закройте его и дайте сосуду проветриться до тех пор, пока он не вернется в исходное состояние. Нажмите кнопку сброса, чтобы начать следующее измерение. Сначала необходимо измерить каждый из холостых растворов. После этого должны следовать растворы стандартных образцов. Если градуировочный график приемлем, то можно измерять растворы испытуемых образцов.

Примечание: равновесная концентрация водной и газовой фаз восстановленных и испаренных паров ртути может различаться в зависимости от концентрации кислоты и объема раствора испытуемых образцов при измерении. Поэтому для разбавления раствора испытуемых образцов используется холостой раствор, при этом и раствор испытуемых образцов, и раствор стандартных образцов измеряются при одинаковых условиях во всех отношениях (концентрация и объем кислоты).

## 2.7. Вычисление аналитических результатов

Высоты пика (мм), полученные после измерения известных объемов холостого раствора и растворов стандартных и испытуемых образцов (или их разбавленных растворов) маркируются как  $P_{blank}$  (холостой),  $P_{std}$  (стандартный) and  $P_{sample}$  (испытуемый) соответственно. Общая концентрация ртути в образце рассчитывается по следующей формуле.

$$C_{sample} = \left( \frac{P_{sample} - P_{blank}}{P_{std} - P_{blank}} \right) \cdot F \cdot \frac{C_{std}}{m_{sample}}$$

$C_{sample}$  – концентрация ртути в образце (нг/мл или нг/г)

$C_{std}$  – концентрация ртути в стандарте (нг/мл); например, 10 нг/мл

$P_{sample}$  – высота пика в мм для разложенного образца (для 5 мл, взятых из 50 мл разложенного образца)

$P_{std}$  – высота пика в мм для стандартного раствора (1 мл стандартного раствора 10 нг/мл был приготовлен так же, как и образец, и 5 мл из 50 мл этого образца были взяты для измерения)

$P_{blank}$  – высота пика холостого образца в мм

F – коэффициент разбавления стандарта (в описанном выше примере из практики коэффициент разбавления составил 0,1; 1 мл стандартного раствора 10 нг/мл был разведен до 50 мл, и 5 мл было взято для измерения)

$m_{sample}$  – масса образца в г или мл

## 2.8. Контроль качества

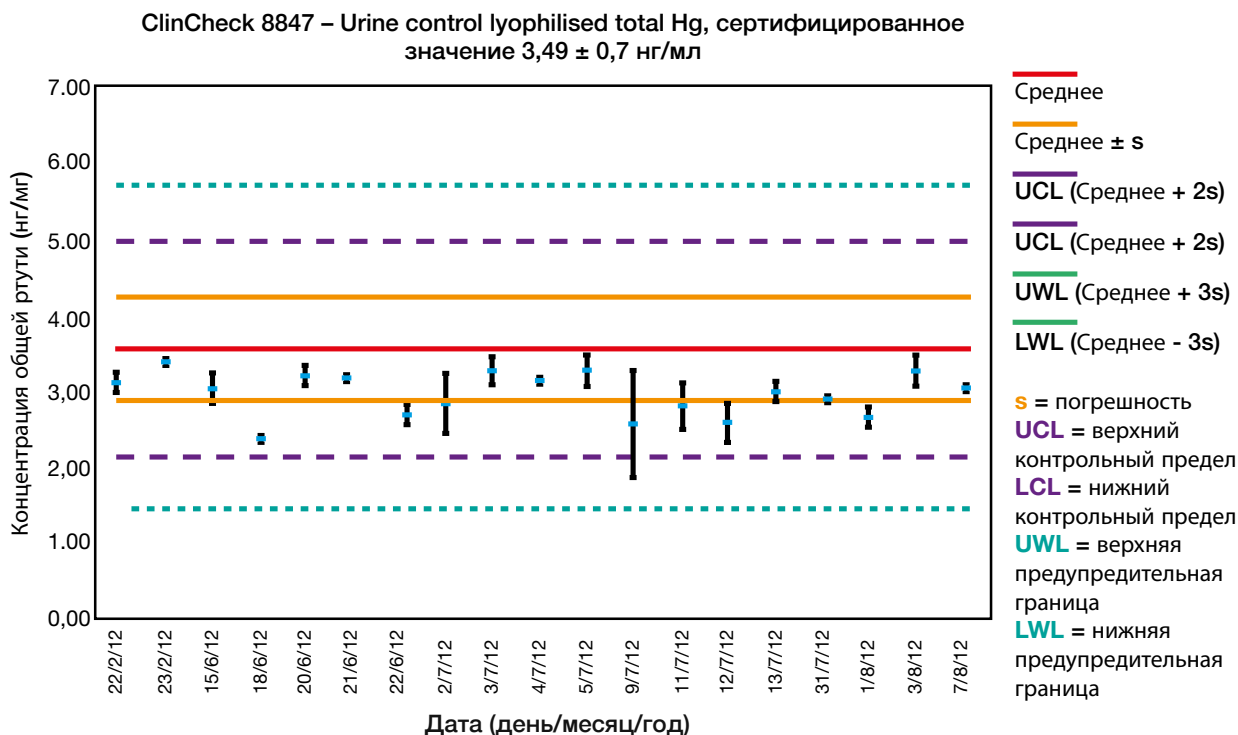
При разработке данных СОП использовались два референтных материала: Clin Chek 8847 (Recipe, Germany) и Seronorm trace elements urine – blank (Sero As, Norway). Аналитики должны получить сертифицированные референтные материалы для измерения содержания ртути в моче в концентрациях, типичных для диапазона концентраций, измеренных в пробе.



Каждая проба должна быть проанализирована в двух экземплярах. Если результаты параллельных анализов отличаются более чем на 10%, пробу необходимо проанализировать повторно.

В каждом наборе анализов должны быть проанализированы три холостые пробы и дубликаты контрольного материала (предпочтительно референтного), а также подготовлены контрольные диаграммы качества (рис. 4).

Рис. 4. Диаграмма контроля качества (ClinCheck 8847)



## 2.9. Оценка метода

Каждая лаборатория должна отвечать требованиям стандарта «ИСО/МЭК 17025-2009. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (15). Метод должен быть проверен на соответствие критериям эффективности (чувствительность, линейность, восстановление, устойчивость к внешним воздействиям, точность, достоверность, ПО и т.д.) и должен сопровождаться оценкой погрешности измерений, так как последняя является фундаментальным свойством результата и требованием стандарта ИСО/МЭК 17025:2005. Уровни концентрации ртути в моче низкие и ПО метода должен быть как минимум 0,05 нг/мл, а ПКО – как минимум 0,1 нг/мл, чтобы можно было измерить концентрации в популяции в целом.

Для метода, описанного в данных СОП, критерии эффективности и оценка погрешности измерений приведены ниже.

### 2.9.1. Предел обнаружения и предел количественного определения

ПО был определен посредством оценки содержания ртути в 10 холостых растворах. Концентрация ртути в 50 мл холостого раствора была в диапазоне  $0,10 \pm 0,010$  нг. ПО рассчитывали с использованием следующего уравнения.

$$LOD = 3 \cdot SD_{blank}$$

LOD – ПО

LOQ – ПКО

SD – стандартное отклонение

Затем ПО для образца рассчитывали следующим образом.

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_{blank}}{V_{sample}(m_{sample})}$$

$V_{sample}$  – объем (мл) или масса (г) образца

$m_{sample}$  – масса образца в г или мл

В вышеприведенном случае ПО составил 0,03 нг/50 мл, а ПКО для 2 мл образца составил 0,015 нг/мл.

ПКО был рассчитан как пятикратный ПО.

$$LOQ = 5 \cdot LOD$$

ПКО для вышеприведенного примера составил 0,075 нг/мл.

## 2.9.2. Точность

В качестве показателя степени воспроизводимости описанного аналитического метода используется рутинный анализ образцов мочи на протяжении более длительного периода времени (напр., одного года). В качестве примера результаты одной серии измерений (n=15) общего содержания ртути в моче приводятся в таблице 2. Каждый образец был проанализирован в двух параллельных измерениях.

Таблица 2. Результаты дубликатных измерений содержания общей ртути в образцах мочи и их относительные различия

Образец	Результат D1 (нг/мл)	Результат D2 (нг/мл)	Среднее значение ((D1+D2)/2)	Разница (D1-D2)	Относительная разница ((D1-D2)/среднее)
Моча 1	2,02	1,62	1,82	0,40	0,22
Моча 2	0,71	0,63	0,67	0,08	0,12
Моча 3	0,51	0,51	0,51	0,00	0,00
Моча 4	0,54	0,51	0,53	0,03	0,06
Моча 5	1,19	1,27	1,23	-0,08	-0,07
Моча 6	0,67	0,67	0,67	0,00	0,00
Моча 7	1,66	1,62	1,64	0,04	0,02
Моча 8	3,80	3,76	3,78	0,04	0,01
Моча 9	0,59	0,55	0,57	0,04	0,07
Моча 10	0,61	0,69	0,65	-0,08	-0,12
Моча 11	0,69	0,69	0,69	0,00	0,00
Моча 12	0,61	0,55	0,58	0,06	0,10
Моча 13	0,92	0,98	0,95	-0,06	-0,06
Моча 14	0,72	0,70	0,71	0,02	0,03
Моча 15	0,79	0,74	0,77	0,05	0,07

D1 = измерение 1; D2 = измерение 2.

Для оценки воспроизводимости или повторяемости стандартное отклонение параллельных измерений рассчитывается по следующему уравнению.

$$RSD_d = \frac{s_d}{\sqrt{n}}$$

$RSD_d$  – относительное стандартное отклонение дубликатных измерений

$s_d$  – стандартное отклонение относительных различий  $((D1-D2)/\text{среднее})$

$n$  – число параллельных измерений ( $n=2$ )

Повторяемость, рассчитанная для данного набора измерений, составила 5,9%.

### 2.9.3. Правильность

Правильность наших результатов была оценена с использованием референтного материала ClinChek Urine Controls (Level I). В качестве меры правильности наших результатов, восстановление (R) рассчитывалось на основе измерений референтного материала на протяжении шести месяцев. Наблюдаемые уровни сравнивали с референтным значением по следующему уравнению.

$$R = \frac{\text{наблюдаемое значение}}{\text{референтное значение}}$$

R – восстановление

Пример измерений общего содержания ртути в референтном материале приведен в таблице 3.

Таблица 3. Измерение концентрации общей ртути в ClinChek Urine Controls (Level I)

Дата	Среднее значение (нг/мл)	Референтное значение (нг/мл)	Восстановление (%)
Дата 1	2,99	3,49	86
Дата 2	3,27	3,49	94
Дата 3	2,94	3,49	84
Дата 4	2,28	3,49	65
Дата 5	3,10	3,49	89
Дата 6	3,05	3,49	87
Дата 7	2,69	3,49	77
Дата 8	2,73	3,49	78
Дата 9	3,22	3,49	92
Дата 10	2,99	3,49	86
Дата 11	3,18	3,49	91
Дата 12	2,72	3,49	78
Дата 13	2,57	3,49	74
Дата 14	2,86	3,49	82
Дата 15	2,80	3,49	80
Дата 16	2,62	3,49	75
Дата 17	3,26	3,49	93
Дата 18	2,97	3,49	85

На основе измерений, приведенных в таблице 3, восстановление составило 83%.

## 2.9.4. Погрешность измерений

Погрешность измерений концентрации общей ртути в моче методом кислотного разложения и CVAAS оценивалась на основе подхода и данных о валидации, представленных в документе *ISO Guide to the expression of uncertainty in measurement* [Руководство ИСО по выражению неопределенности измерений]. Эта процедура описана в руководстве ЕВРАХИМ/СИТАК «Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях» (16).

Этап 1. Измеряемая величина определялась с использованием количественного выражения, относящего значение измеряемой величины к параметрам, от которых оно зависит (описано в разделе 2.7.).

$$C_{sample} = \left( \frac{P_{sample} - P_{blank}}{P_{std} - P_{blank}} \right) \cdot F \cdot \frac{C_{std}}{m_{sample}}$$

Этап 2. На основе количественного выражения были определены источники погрешности. Сюда входят параметры, перечисленные в таблице 4.

Таблица 4. Компоненты погрешности измерений содержания общей ртути в моче

Параметр ввода	Значение	Стандартная погрешность	Относительная стандартная погрешность (%)
Сигнал образца ( $P_{sample}$ )	30,0 мм	0,5 мм	1,6
Масса образца ( $m_{sample}$ )	20 мг	0,06 мг	0,29
Объем образца в мерной колбе ( $V_{tot}$ )	50 мл	0,12 мл	0,24
Объем проанализированной аликвоты образца ( $V_{analysed}$ )	5 мл	0,0095 мл	0,2
Концентрация раствора стандартного образца ( $C_{std}$ )	10 нг/мл	0,014 нг/мл	0,14
Объем раствора стандартного образца ( $V_{std}$ )	0,1000 мл	0,00094 мл	0,94

Этап 3. На этом этапе были количественно определены компоненты погрешности. Все составляющие погрешности должны быть выражены в виде стандартных погрешностей, т.е. в виде стандартных отклонений.

Стандартные погрешности для компонентов, определенных по количественному выражению, были получены из экспериментальных данных (например, объемы пипетки) или из сертификата производителя (например, массовый баланс, мерная колба).

Рассчитанные стандартные погрешности приведены в таблице 4. Относительные стандартные погрешности, не превышающие 10% наибольшей составляющей погрешности, не учитываются при оценке погрешности измерений. Среди перечисленных погрешностей, погрешности, связанные с высотой пика ( $U_P$ ) и объемом раствора стандартного образца ( $U_{Vstd}$ ), были определены как значимые.

Дополнительные компоненты погрешности оценивались с использованием данных о валидации. Для этой цели использовались данные воспроизводимости (повторяемости) и восстановления.

Погрешность воспроизводимости ( $u_{rep}$ ) составляла 5,9% (раздел 2.9.2), а погрешность восстановления ( $u(R_m)$ ) – 8,5% и рассчитывалась по следующему уравнению.

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n \cdot \bar{C}_{obs}^2} + \frac{u(C_{ref})}{C_{ref}}^2}$$

$R_m$  – восстановление

$s_{obs}$  – стандартное отклонение наблюдаемых данных

$C_{obs}$  – среднее значение наблюдаемых данных

$C_{ref}$  – референтное значение

$u(C_{ref})$  – погрешность референтного значения

На заключительном этапе (этап 4), была рассчитана суммарная погрешность. Перед сложением все составляющие погрешности должны быть выражены как стандартные погрешности (стандартные отклонения). Суммарная погрешность ( $u_c$ ) рассчитывалась по следующему уравнению.

$$u_c = \sqrt{u_p^2 + u_{Vstd}^2 + u_{rep}^2 + u_{rec}^2}$$

$u_c$  – суммарная погрешность

$u_p$  – ошибка из-за повторения измерений

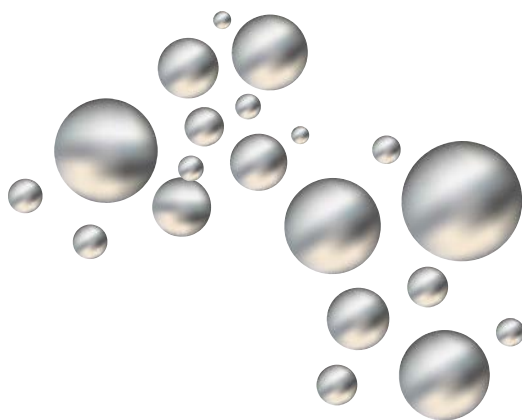
$u_{Vstd}$  – ошибка из-за стандартов

$u_{rep}$  – ошибка из-за воспроизводимости

$u_{rec}$  – ошибка из-за восстановления

Расширенная погрешность ( $U$ ) выражалась путем умножения  $u_c$  на коэффициент  $k$ . Выбор коэффициента  $k$  основан на желаемом уровне уверенности. При приблизительном уровне уверенности 95% коэффициент  $k$  равен 2.

Предположительная погрешность измерения общей концентрации ртути в моче путем кислотного разложения и CVAAS составляет 11%, расширенная погрешность ( $k=2$ ) – 22%. Оценка действительна для «нормального» диапазона воздействия ниже 5,8 нг/г.



## 3. Анализ креатинина в моче

Концентрация ртути и других химических веществ в моче может значительно варьироваться в зависимости от уровня разбавления водой, а результаты тестов на содержание загрязняющих веществ в моче часто выражаются в микрограммах загрязняющего вещества на грамм креатинина (3). Креатинин является побочным продуктом метаболизма белков в мышцах, который образуется из фосфата креатинина. Креатинин в основном подвергается гломерулярной фильтрации в почках и почти полностью выводится из организма. В среднем взрослые люди нормальной массы тела в возрасте 30-60 лет выделяют 1,0-1,6 г креатинина в сутки.

Физиологическое образование креатинина у здоровых людей в большинстве случаев пропорционально их мышечной массе, что объясняет, почему выделение креатинина у женщин обычно ниже, чем у мужчин. У детей ежедневное выделение креатинина в значительной степени зависит от возраста. Помимо возраста и пола, на выведение креатинина также существенно влияет потребление мяса и прием некоторых лекарств, таких как опиаты и мочегонные средства. Образование мочи может сильно варьироваться в зависимости от потребления или потери жидкости, а также от потребления кофе, алкоголя или медикаментов. Напротив, выделение креатинина, как правило, остается относительно постоянным в течение дня, с небольшими суточными колебаниями. По этой причине концентрация креатинина в моче часто служит референтным значением для анализа материалов и их метаболитов в моче. Так, суточные колебания разбавления мочи могут быть компенсированы при оценке воздействия ксенобиотиков. Однако увязывать концентрацию опасных веществ в моче с концентрацией креатинина в каждом случае не имеет смысла, также необходимо учитывать вышеупомянутые факторы, влияющие на выведение креатинина.

Если ксенобиотики в значительной степени повторно абсорбируются в трубчатой области почек, то их концентрацию нельзя считать прямо пропорциональной концентрации креатинина (17,18). Аналогичным образом, использование содержания креатинина в качестве референтного значения для высоко разбавленных или высоко концентрированных проб мочи также приводит к недействительным значениям концентрации вещества.

Поэтому Комиссия по расследованию опасности для здоровья химических соединений на рабочем месте не рекомендует рассчитывать концентрацию опасных веществ или метаболитов в моче относительно концентрации креатинина.

Несмотря на это, концентрацию креатинина следует измерять в каждом образце мочи, который должен быть протестирован на наличие опасных веществ для облегчения оценки полученных результатов. В случае концентрации креатинина менее 0,5 г/л или более 2,5 г/л результаты, полученные по опасным веществам или их метаболитам, не должны приниматься во внимание в сообщаемых результатах обследования (17).

### 3.1. Сфера применения метода

Приведенный здесь метод основан на реакции, описанной Яффе (19). Этот метод позволяет определять уровень креатинина в моче по миниатюрной шкале с помощью фотометрического микропланшетного анализатора. Он используется для быстрого и точного количественного определения содержания креатинина в моче. Диапазон тестирования метода составляет > 0,004 мг креатинина на 1 мл мочи.

Основное преимущество описанного метода заключается в том, что за очень короткое время можно протестировать большое число образцов. Кроме того, условия реакции легче поддерживать стабильными, так как все образцы анализируются в конечной точке реакции, тем самым сводя к минимуму риск временных колебаний измерений.

## 3.2. Технический принцип

Разбавленные в соотношении 1:50 образцы мочи наносятся на микротитрационный планшет, и добавляются пикриновая кислота и гидроксид натрия. По истечении времени реакции 30 минут с помощью фотометрического микропланшетного анализатора измеряется абсорбция продукта реакции при максимальной абсорбции 500 нм.

Калибровка проводится с использованием водных растворов стандартов креатинина, которые обрабатываются таким же образом, что и испытуемые образцы, путем добавления раствора пикриновой кислоты и гидроксида натрия и измеряются методом фотометрии.

## 3.3. Меры предосторожности

Необходимо принимать следующие меры предосторожности при анализе содержания креатинина в моче.

- Следует принимать меры предосторожности, установленные для работы с биологически опасными веществами.
- Следует использовать бокс биологической защиты при разбавлении образцов мочи.
- Работа со всеми растворами должна проводиться в перчатках, лабораторном халате и защитных очках.
- Для отходов и биологических остатков необходимо использовать соответствующие контейнеры. Наконечники пипеток, автодозаторы, перчатки и другие предметы, которые соприкасаются с мочой, должны быть помещены в пакет или контейнер для биологически опасных отходов, которые удаляются в автоклаве.

## 3.4. Оборудование, материалы и растворы

### 3.4.1. Оборудование

Для анализа содержания креатинина в моче необходимо следующее оборудование:

- вихревой смеситель, используемый для перемешивания образцов мочи до извлечения аликвоты для анализа;
- микропипетка вместимостью 10-100 мкл;
- микропипетка вместимостью 100-1000 мкл;
- микропипетка вместимостью 1-10 мл;
- многоканальная пипетка вместимостью 50-300 мкл;
- аналитические весы (с разрешением 0,01 мг);
- центрифуга;
- микропланшетный встряхиватель;
- спектрофотометр;
- морозильник (для длительного хранения стандартных образцов и реагентов);
- холодильник (для промежуточного хранения основных стандартных образцов и реагентов);
- система очистки воды (для сверхчистой бидистиллированной воды, используемой при приготовлении реагентов и разбавленных растворов) – это оборудование производит деионизированную воду до  $> 18 \text{ МОм} \cdot \text{см}$ .

### 3.4.2. Материалы

Для анализа содержания креатинина в моче необходимы следующие материалы:

- перчатки (без присыпки, с низким содержанием нитрил-частиц или латексные перчатки);
- наконечники на пипетки (1000 мкл, 100 мкл и 10 мл);

- 96-луночные микропланшеты;
- полипропиленовые пробирки (1, 5, 10 и 50 мл).

### 3.4.3. Реагенты и химикаты

Для анализа содержания креатинина в моче необходимы следующие реагенты и химикаты:

- сверхчистая вода;
- 1,2% раствор пикриновой кислоты;
- гидроксид натрия (чистый для анализа);
- 37% соляная кислота.

### 3.4.4. Референтные материалы

Для анализа содержания креатинина в моче необходимы следующие референтные материалы:

- Creatinine SRM 914a (National Institute of Standards and Technology);
- растворы для контроля качества URN ASY CONTROL Level 2 и 3 (Randox Laboratories).

### 3.4.5. Растворы

Для анализа содержания креатинина в моче необходимы следующие растворы.

- Соляная кислота 0,1М: 871 мкл 37% соляной кислоты переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Затем колбу заполняют сверхчистой водой до номинального объема.
- Гидроксид натрия 0,3 М: 3 г гидроксида натрия взвешивают и растворяют примерно в 100 мл сверхчистой воды. Раствор переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, которую затем заполняют до номинального объема сверхчистой водой.
- Рабочий раствор пикриновой кислоты: 10 мл 1,2% раствора пикриновой кислоты и 10 мл гидроксида натрия 0,3 М переносят в полипропиленовую пробирку объемом 50 мл. Рабочий раствор должен быть свежеприготовленным и защищенным от света.

### 3.4.6. Калибровочные стандарты

Для настоящих СОП следует использовать следующие калибровочные стандарты:

- основной раствор креатинина (1г/л): 10 мг креатинина SRM 914a взвешивается в мерной колбе вместимостью 10 мл. Затем колба заполняется до номинального объема соляной кислотой 0,1 М. Основной раствор хранится при температуре 4 °С, срок его хранения – два месяца.
- Калибровочные стандарты: основной раствор креатинина разбавляют сверхчистой водой в мерных колбах объемом 10 мл по схеме, приведенной в таблице 5. Калибровочные стандарты хранят при температуре 4 °С, срок их хранения – одна неделя.

Таблица 5. Объем и концентрации растворов для приготовления калибровочных стандартов

Объем основного раствора креатинина (мкл)	Окончательный объем калибровочного стандарта (мл)	Концентрация калибровочного стандарта (г/л)	Эквивалентная концентрация в пробах мочи (г/л)
40	10	0,004	0,2
80	10	0,008	0,4
200	10	0,020	1,0
400	10	0,040	2,0
800	10	0,080	4,0



### 3.5. Пробоподготовка и разделение на аликвоты

Работа с пробами осуществляется в перчатках без присыпки.

Пробы, подлежащие анализу, достаются из морозильной камеры и нагреваются до комнатной температуры. Затем они перемешиваются вихревым смесителем и центрифугируются при 3000 об/мин в течение двух минут. В каждую аналитическую серию включаются два образца мочи товарного качества с разными концентрациями (Assayed Urine Chemistry Control Level 2 и 3). В каждую виалу добавляется 10 мл бидистиллированной воды и настаивается в течение 30 минут при комнатной температуре перед использованием. Пробы можно алиquotировать и хранить при температуре -20 °C в течение двух недель.

Испытуемые образцы и образцы контроля качества, разбавленные в пропорции 1:50, готовятся в трех экземплярах. Затем 20 мкл испытуемого образца или образца контроля качества пипетируются в пробирки объемом 1,5 мл. Затем добавляется 980 мкл сверхчистой воды. Пробирки закрываются колпачком и встряхиваются для гомогенизации разбавления.

Затем в каждую лунку 96-луночного микропланшета добавляется 25 мкл стандартов, разбавленных испытуемых образцов и образцов контроля качества в соответствии с распределением, указанным в таблице 6.

Планшет закрывают крышкой и встряхивают на орбитальном шейкере при комнатной температуре в защищенном от света месте. Через 30 минут показания планшета считываются при 492 нм.

**Таблица 6. Распределение стандартов, испытуемых образцов и образцов контроля качества на микропланшете**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	вода	вода	вода	P1	P1	P1	P2	P2	P2	P3	P3	P3
<b>B</b>	P4	P4	P4	P5	P5	P5	S1	S1	S1	S2	S2	S2
<b>C</b>	S3	S3	S3	S4	S4	S4	S5	S5	S5	S6	S6	S6
<b>D</b>	S7	S7	S7	S8	S8	S8	S9	S9	S9	S10	S10	S10
<b>E</b>	S11	S11	S11	S12	S12	S12	S13	S13	S13	S14	S14	S14
<b>F</b>	S15	S15	S15	S16	S16	S16	S17	S17	S17	S18	S18	S18
<b>G</b>	S19	S19	S19	S20	S20	S20	S21	S21	S21	S22	S22	S22
<b>H</b>	S23	S23	S23	S24	S24	S24	C1	C1	C1	C2	C2	C2

P1: водный стандарт креатинина 0,004 мг/мл

P2: водный стандарт креатинина 0,008 мг/мл

P3: водный стандарт креатинина 0,2 мг/мл

P4: водный стандарт креатинина 0,4 мг/мл

P5: водный стандарт креатинина 0,8 мг/мл

C1: 1:50 образец контроля качества разбавления URN ASY CONTROL 2

C2: 1:50 образец контроля качества разбавления URN ASY CONTROL 3

S1–S24: 1:50 разбавленные образцы.

## 3.6. Процедура

### 3.6.1. Подготовка аналитического оборудования

Включите спектрофотометр.

Системе необходимо примерно 15 минут для нагрева до начала измерений.

### 3.6.2. Измерение образцов

Отмерьте образцы, подготовленные согласно пункту 7.1 при 500 нм.

### 3.6.3. Вычисление аналитических результатов

Данные регистрируются непосредственно оборудованием в мг креатинина/мл и вычисляются посредством интерполяции показаний на градуировочный график с учетом разбавления пробы.

Окончательное регистрируемое значение соответствует среднему значению трех параллельных измерений одного образца. Стандартное отклонение этих измерений может быть рассчитано по следующей формуле.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \bar{c})^2}{n - 1}}$$

SD – стандартное отклонение

$c_i$  – индивидуальное значение

$\bar{c}$  – среднее

n – число определений

### 3.6.4. Диапазон регистрируемых результатов

Необходимо проверить, соответствуют ли значения, полученные для образцов контроля качества, критериям приемлемости, установленным в их сертификатах испытаний. Если значения не соответствуют этим критериям, необходимо повторить анализ.

Относительное стандартное отклонение трех измерений одного образца не должно превышать 5%. В противном случае следует применить тест Граббса, чтобы определить, является ли одно из этих значений выбросом.

$$Z = \frac{\text{среднее} - \text{подозреваемое значение}}{SD}$$

Z – Z-значение (для оценки согласно тесту Граббса)

SD – стандартное отклонение

Если Z больше 1,15, то это значение может быть отброшено, а уровень концентрации рассчитан как среднее двух оставшихся значений. В противном случае образец необходимо повторно протестировать.

Значения креатинина регистрируются в диапазонах 0,3-3 мг/мл.

## 3.7. Контроль качества

Точность и достоверность анализов биомаркеров, проводимых токсикологическими лабораториями, необходимо постоянно проверять, выполняя процедуры обеспечения качества.

В целом, обеспечение качества в медицинских лабораториях включает внутренний и внешний

контроль качества, как это подробно описано в Программе контроля качества биомониторинга человека на предмет содержания ртути.

### 3.7.1. Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества служит для систематического контроля повторяемости с целью выявления случайных ошибок и оценки точности количественных лабораторных исследований.

На практике повторяемость контролируется с помощью контрольного материала (референтного материала), который измеряется в рамках каждой аналитической серии. Результаты внутреннего контроля качества, проводимого ежедневно или для каждой партии, заносятся в контрольные диаграммы.

Если контрольного (референтного) материала нет в продаже, то его можно приготовить путем добавления в имеющийся биологический материал (кровь, моча и т.д.) определенного количества аналита (биомаркера). Аликвоты такого материала могут быть использованы как для внутреннего контроля качества, так и для межлабораторных сличительных испытаний. Доказано, что эти аликвоты остаются однородными при определенных условиях хранения и транспортировки, при этом концентрация аналита остается неизменной. Контрольный материал должен охватывать весь диапазон концентраций (напр., низкое, среднее и высокое значение Q), а также включать в себя холостые пробы.

Достоверность предпочтительно тестировать при помощи сертифицированного референтного материала, т.е. (биологического) материала, содержащего сертифицированную концентрацию одного или более аналитов. Сертификация проводится при помощи программы, в рамках которой лаборатории, обладающие высокой квалификацией в области анализа исследуемых биомаркеров, анализируют контрольный материал.

Сертифицированное значение устанавливается для каждого аналита после процедуры проверки, которая включает в себя экспертное заключение, а также статистические процедуры. Поэтому сертифицированные референтные материалы дорого стоят и должны использоваться только при проверке или повторной валидации аналитического метода.

### 3.7.2. Внешний контроль качества

Внешний контроль качества является средством улучшения сопоставимости и достоверности аналитических результатов. Сопоставимость — это предпосылка достоверности, благодаря которой обеспечивается возможность сравнения аналитических результатов разных лабораторий между собой и с соответствующими предельными значениями.

Сопоставимые и достоверные результаты БМЧ необходимы для достижения равных условий для профилактики заболеваний независимо от лаборатории, в которой анализируется биологический образец.

Межлабораторные сличительные испытания (МСИ) выступают в качестве средства гармонизации методов анализа и их применения, тем самым улучшая сопоставимость результатов анализа.

Для этой цели могут использоваться контрольные материалы (эталонные материалы). МСИ необходимы даже в тех случаях, когда лаборатории используют одни и те же аналитические СОП.

Схема внешней оценки качества (EQUAS) — одно из средств повышения достоверности аналитических результатов. Для этой цели контрольный материал обычно анализируется в референтных лабораториях, продемонстрировавших высокий уровень подготовки для проведения анализа конкретного биомаркера. Результаты, полученные в референтных лабораториях, берутся за основу определения заданных значений и диапазонов допусков для каждого из исследуемых биомаркеров. Лаборатории, участвующие в EQUAS, имеют сертификаты для результатов, которые попадают в диапазоны допусков.

При выполнении данных СОП материалы контроля качества используются для того, чтобы оценить точность и достоверность процесса анализа и определить, дает ли аналитическая система приемлемые результаты, которые являются точными и достоверными.

Контроль качества аналитических результатов проводится с использованием референтных материалов URN ASY CONTROL 2 и 3 (Randox).

Необходимо проверить, чтобы полученные для образцов контроля качества значения соответствовали критериям приемлемости, установленным в их сертификатах испытаний. Если значения не соответствуют этим критериям, необходимо повторить анализ.

Действительными считаются только те измерения, которые были получены между двумя референтными образцами, значения которых лежат в пределах установленного диапазона (заданное значение для референтного материала  $\pm$  погрешность на этом уровне).

Внешний контроль качества осуществляется посредством участия в круговом обследовании. В качестве примера можно привести регулярное участие в тесте G-EQUAS, который организывает Институт и амбулатория в области производственной, социальной и экологической медицины Университета им. Фридриха-Александра в Эрлангене и Нюрнберге (Германия).

## 3.8. Оценка метода

### 3.8.1. Линейность

Линейность аналитической процедуры — это способность (в заданном диапазоне) получать результаты, прямо пропорциональные концентрации аналита в пробе. Этот параметр оценивается путем изучения увеличения концентрации аналита. В данных СОП линейность метода была протестирована в диапазоне 0,004-0,08 мг/мл креатинина.

Данные анализируются статистически для получения регрессионной кривой, коэффициента корреляции, коэффициента детерминации и коэффициента линейности. Необходимо получить линейную кривую с коэффициентом детерминации выше 0,999.

### 3.8.2. Точность

Это измерение расхождения аналитических результатов из-за случайных ошибок. Точность описывается статистически с помощью стандартного отклонения или доверительного интервала. Можно различать следующее:

- точность при повторяющихся условиях (повторяемость);
- точность при сопоставимых условиях (воспроизводимость).

Для определения точности использовались образцы в диапазоне 0,2-3 мг/мл. В таблице 7 показаны результаты, полученные для повторяемости и воспроизводимости.

Таблица 7. Максимально допустимое стандартное отклонение

Концентрация (мг/мл)	RSD <sub>repet</sub>	RSD <sub>reprod</sub>
0,2	11,5	7,3
0,4	4,8	5,4
0,7	2,2	4,7
2,1	1,8	2,5
2,5	4,8	5,0

RSD<sub>repet</sub> – относительное стандартное отклонение для повторяемости;

RSD<sub>reprod</sub> – относительное стандартное отклонение для воспроизводимости.

### 3.8.3. Достоверность

Это мера отклонения измеренного значения от правильного («истинного») значения вследствие систематической ошибки. Для проверки достоверности метода могут быть использованы следующие подходы:

- проведение тестов методом «введено-найдено» (процедуры добавки);
- участие в межлабораторных сличительных испытаниях, при которых теоретическое значение определяется уполномоченными референтными лабораториями;
- сравнение проверяемой аналитической процедуры с референтной процедурой, сертифицированной для определения параметра в соответствующей матрице пробы;
- сравнение результатов анализа сертифицированного референтного материала с сертифицированным референтным значением.

Достоверность определялась путем добавления известного количества креатинина в образцы, используемые для определения точности. Полученные средние коэффициенты воспроизведения были в диапазоне 98,2–104,4%.

Нижний ПКО указывает на наименьшую возможную концентрацию аналита, которая может быть определена с заранее заданной погрешностью (обычно 33%). Верхний ПКО указывает на максимально возможную концентрацию аналита, которую можно определить.

ПКО должен быть включен в градуировочный график и может быть рассчитан различными методами.

### Определение соотношения сигнала и фонового шума

Фоновый шум определяется следующим образом.

- Интенсивность фонового шума ( $s_0$ ) определяется по отношению к аналиту.
- ПО рассчитывается как среднее значение интенсивности фонового шума, умноженное на 3 ( $ПО = 3 \times s_0$ ).
- ПКО вычисляется как среднее значение интенсивности фонового шума, умноженное на 9 ( $ПКО = 9 \times s_0$ ).

### Другие процедуры

Следует отметить, что на выбор метода и используемого подхода влияют холостые значения в нативных образцах:

- процедура получения стандартного отклонения (согласно EURACHEM);
- процедура получения холостого значения (в соответствии с DIN 32 645);
- процедура построения градуировочного графика (в соответствии с DIN 32 645).

В данных СОП ПКО рассчитывается с использованием процедуры построения градуировочного графика, и полученный результат соответствует наименьшему значению графика, а именно 0,004 мг/мл креатинина.

## 3.9. Источники ошибки

Этот аналитический метод основан на цветовой реакции Яффе (19), при которой активная метиленовая группа креатинина вступает в реакцию с атомом С3 пикриновой кислоты (20,21), образуя цветной продукт реакции (19,21). Однако эта цветовая реакция между пикриновой кислотой и креатинином присуща не только данному веществу. Как правило, восстановительные соединения или соединения с метиленовой группой, активированные  $-NO_2$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CH_2=CH_2$ -,  $-COOR$  или  $-N=N-$ , также могут образовывать цветные продукты. Таким образом, глюкоза, фруктоза, мальтоза, гидроксилламин или аскорбиновая кислота не вызывают

мешающие определению реакции, в то время как аминокетон, аминолевулиновая кислота и аминоксуксусная кислота вступают в цветовую реакцию с пикриновой кислотой (22).

Поскольку вышеописанные хромогены присутствуют в моче в довольно низкой концентрации (20), их мешающее воздействие можно считать незначительным. Например, концентрация аминолевулиновой кислоты в моче в 100-1000 раз меньше концентрации креатинина.

Раствор пикриновой кислоты чувствителен к свету, поэтому его следует держать в темном месте. Это также относится к подготовленному микротитрационному планшету во время инкубации.

При работе с микротитрационным планшетом необходимо следить за тем, чтобы при пипетировании из лунок не разбрызгивалась жидкость, в результате чего могут загрязниться другие образцы. Для предотвращения этого при пипетировании рабочего раствора пикриновой кислоты рекомендуется использовать свободно перемещающийся ручной дозатор.

Загрязнение (например, отпечатки пальцев) на обратной стороне микротитрационного планшета может привести к значительным помехам во время измерения. В крайних случаях оно может помешать измерительному прибору считать планшет. Поэтому обратную сторону планшета необходимо содержать в чистоте и перед измерением протирать смоченной в этаноле тканью.

### 3.10. Альтернативный метод: определение относительной плотности образцов мочи

В качестве альтернативы анализу креатинина в образцах мочи можно определить относительную плотность (ОП) для нормализации уровня ртути в моче с учетом отдельных различий в разбавлении мочи (23). Этот метод широко использовался во многих обследованиях на основе БМЧ. ОП определяется в капле мочи с помощью рефрактометра. Это простой и легкий в применении ручной инструмент. Нижеописанная процедура применяется при использовании рефрактометра PAL-10S (Атаго, Япония) и любого подобного инструмента.

Требуется следующее оборудование:

- рефрактометр (например, модель PAL-10S, Атаго, Япония);
- контейнеры для сбора мочи (могут быть такими же, как и для анализа ртути);
- пипетки (0,1–1 мл);
- дистиллированная вода;
- протирочная ткань или одноразовые салфетки;
- перчатки.

Процедура определения относительной плотности образцов мочи следующая.

1. Температура дистиллированной воды, используемой для калибровки (нулевая установка) и образца должна быть такой же, что и температура окружающей среды.
2. Калибруйте рефрактометр, поместив дистиллированную воду (около 0,3 мл) на поверхность призмы и нажав клавишу START. Если на дисплее появится надпись «1,000», на ноль прибор выставлять не нужно. Если указанное значение не «1,000», нажмите клавишу ZERO, оставив воду на призме. После того, как на дисплее появится «000», установка на ноль успешно завершена. Удалите воду с поверхности призмы мягкой неабразивной тканью. Это следует сделать перед началом тестирования и приблизительно после каждого 10-го образца, чтобы калибровка оставалась точной.
3. Измерение. Очистите поверхность дистиллированной водой и высушите при помощи мягкой неабразивной ткани. Поместите каплю мочи (около 0,3 мл) на поверхность призмы. Нажмите клавишу START. На экране отобразится измеренное значение. Удалите образец, протерев поверхность мягкой тканью. Используйте дистиллированную воду для удаления любых остатков образца. Высушите избыточную влагу при помощи чистой сухой ткани. Чтобы выключить дисплей, нажмите и удерживайте нажатой клавишу START примерно две секунды.

4. Расчет. В качестве стандарта в расчетах нормализации ОП, обычно используется средняя ОП 1,013 для женщин и 1,019 для мужчин; расчет описан в литературе (24).

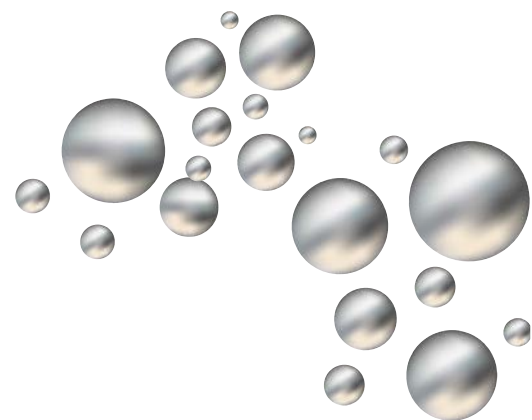
$$U_{\text{biomarker}}/SG = U_{\text{biomarker}} * \frac{(SG_{\text{std}} - 1)}{(SG_{\text{ob}} - 1)}$$

$U_{\text{biomarker}}$  – уровень вещества (например, ртути), измеренный в моче

$SG_{\text{ob}}$  – наблюдаемая относительная плотность

$SG_{\text{std}}$  – средняя относительная плотность в исследуемой популяции

Результаты измерения ОП обычно варьируются в диапазоне от 1,000 (что эквивалентно воде) до 1,035 (очень обезвоженная), но могут также достигать более высоких уровней.



## 4. Интерпретация результатов

Уровни ртути в моче обычно считаются наилучшим показателем недавнего воздействия неорганической ртути или паров элементарной ртути, поскольку считается, что содержащаяся в моче ртуть наиболее точно отражает уровни ртути, присутствующие в почках (25). Однако неорганическая ртуть накапливается в почках и медленно выводится через мочу. Поэтому уровни содержания ртути в моче могут также указывать на недавнее воздействие элементарной и/или неорганической ртути (3).

Сообщалось о тесной взаимосвязи между уровнями элементарной ртути во вдыхаемом воздухе и уровнями в моче при средних и высоких концентрациях. Максимальная концентрация ртути в моче, установленная ВОЗ (26), составляет 50 мкг/г креатинина. Уровни содержания ртути в моче редко превышают 5 мкг/г креатинина у лиц, не подвергающихся воздействию ртути на рабочем месте (3).

Уровень ртути, превышающий 20 мкг/л мочи, был обнаружен в пробах мочи, взятых у шахтеров, которые часто сжигают амальгамы золота и ртути в открытой посуде. Очень высокие концентрации ртути в моче (до 1168 мкг/л) были обнаружены у работников золотодобывающих мастерских в амазонских деревнях. У работников таких мастерских (работающих в замкнутом пространстве) концентрация ртути в моче была выше, чем у шахтеров, сжигающих амальгамы на открытом воздухе. В муниципалитете Альта-Флореста (Мату-Гросу, Бразилия) был сделан анализ мочи работников золотодобывающих мастерских (где золото плавилось в вытяжных шкафах без фильтров); результаты показали, что уровень содержания ртути в моче превышает 20 мкг/л как минимум у 13 из 17 работников, у которых взяли пробы для анализа (27).

Референтное значение Комиссии по биомониторингу человека Германии для взрослых, не имеющих зубных амальгамных пломб, составляет 1 мкг/л в моче (28). Соответствующее референтное значение для детей без зубных амальгамных пломб составляет 0,4 мкг/л (28). Ориентировочное значение БМЧ I, разработанное на основе оценки влияния на здоровье людей, для ртути в моче составляет 7 мкг/л или 5 мкг/г креатинина. Средние геометрические уровни у взрослых в большинстве стран ниже референтного значения (8).

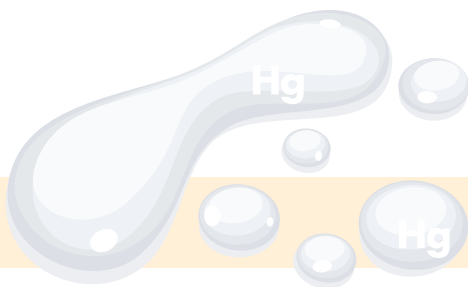
# Библиография

1. Ртуть и здоровье [информационный веб-бюллетень]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2017 г. (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>, по состоянию на 17 октября 2020 г.).
2. Health effects of exposure to mercury [web page]. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2017 ([www.epa.gov/mercury/health-effects-exposures-mercury](http://www.epa.gov/mercury/health-effects-exposures-mercury), accessed 11 December 2017).
3. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2008 ([www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf), accessed 11 December 2017).
4. Promoting the phase down of dental amalgam in developing countries. Geneva: United Nations Environment Programme and World Health Organization; 2014 ([https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/13865/dental\\_mercury\\_phase\\_down\\_project\\_brochure\\_FINAL\\_lr.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/13865/dental_mercury_phase_down_project_brochure_FINAL_lr.pdf?sequence=1&isAllowed=y), 11 December 2017).
5. Ртуть в продукции для осветления кожи. Информационный бюллетень ВОЗ. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2011 г. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330015/WHO-CED-PHE-EPE-19.13-rus.pdf>, по состоянию на 17 октября 2020 г.).
6. Показатели на основе биомониторинга экспозиции к химическим загрязнителям. Отчет о совещании, Катанья, Италия, 19-20 апреля 2012 г. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2012 г. ([https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0014/171221/e96640r.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0014/171221/e96640r.pdf), по состоянию на 17 октября 2020 г.).
7. Внеочередное второе совещание Европейской целевой группы по окружающей среде и здоровью (ЦГОСЗ). Отчет. Гаага, Нидерланды, 31 мая –1 июня 2012 г. Копенгаген: Всемирная организация здравоохранения; 2012 г. ([https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/186992/e96820R.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/186992/e96820R.pdf), по состоянию на 17 октября 2020 г.).
8. Биомониторинг человека: факты и цифры. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2015 г. ([https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0007/276388/Human-biomonitoring-facts-figures-ru.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/276388/Human-biomonitoring-facts-figures-ru.pdf), по состоянию на 17 октября 2020 г.).
9. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect.* 2005;113(2):192–200 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1277864/>, accessed 31 January 2018).
10. Nuttall KL. Interpreting mercury in blood and urine of individual patients. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(3):235–50 (<http://www.annclinlabsci.org/content/36/3/248.full.pdf+html>, accessed 31 January 2018).
11. Aitio A, Järvisalo J, Kiilunen M, Tossavainen A, Vaittinen P. Urinary excretion of chromium as an indicator of exposure to trivalent chromium sulphate in leather tanning. *Int Arch Occup Environ Health.* 1984;54(3):241–9 (<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00379053>, accessed 31 January 2018).
12. Akagi H. Analytical methods for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. In: *Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury due to Mining Operations, Manila, 26–27 November 1997.* Minamata: National Institute for Minamata Disease; 1998:113–41.



13. Horvat M, Gibičar D. Speciation of mercury: environment, food, clinical, and occupational health. In: Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann K, editors. Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health. Chichester: John Wiley & Sons; 2005:281–304.
14. Horvat M, Snoj Tratnik J, Miklavčič A. Mercury: biomarkers of exposure and human biomonitoring. In: Knudsen L, Merlo DF, editors. Biomarkers and human biomonitoring. Volume 1. Ongoing programs and exposures. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2011:381–417.
15. ISO/IEC 17025:2005 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. Женева: Международная организация по стандартизации; 2005 г. (<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-2:v1:ru>, по состоянию на 17 октября 2020 г.).
16. Ellison SLR, Williams A, editors. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК: Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Третье издание. 2012 г. ([https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1\\_RU.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_RU.pdf), по состоянию на 16 октября 2020 г.).
17. Weihsrauch M, Schulze B, Schaller KH, Lehnert G. Kreatinin als Bezugsgröße für Stoffkonzentrationen in Harn. In: Drexler H, Greim H, editors. Biologische Arbeitsstoff-toleranzwerte (BAT-Werte). Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) und biologische Leitwerte (BLW). Deutsche Forschungsgemeinschaft-Arbeitsmedizinisch-toxikologische Begründungen, Spezielle Vorbemerkungen vol 1. 9th issue. Wiley-VCH; 2000:21–31
18. Kommission Humanbiomonitoring des Umweltbundesamtes: Normierung von Stoffgehalten in Urinkreatinin. Bundesgesundhbl; 2005:616–18.
19. Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue reaction des Kreatinins. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem. 1886;10:391–400.
20. Butler AR. The Jaffé reaction. Identification of the coloured species. Clinica Chimica Acta. 1975;59:227–32 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009898175900339?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
21. Kakac B, Vejdelek ZJ. Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen. 2nd supplementary volume. Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure) und alkaline (basen). Weinheim: Verlag-Chemie; 1983:113–14.
22. Kakac B, Vejdelek ZJ. Handbuch der photometrischen analyse organischer Verbindungen. Reaction mit 2,4,6-trinitrophenol (Pikrinsäure). Weinheim: Verlag-Chemie; 1974:275–6.
23. Stajniko A, Falnoga I, Snoj Tratnik J, Mazej D, Jagodic M, Krsnik M et al. Low cadmium exposure in males and lactating females—estimation of biomarkers. Environ Res. 2017;152:109–19 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935116307009?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).
24. Suwazono Y, Åkesson A, Alfvén T, Järup L, Vahter M. Creatinine versus specific gravity adjusted urinary cadmium concentration. Biomarkers. 2005;10:117–26 (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13547500500159001?journalCode=ibmk20>, accessed 31 January 2018).
25. Clarkson TW, Hursh JB, Sager PR, Syversen TLM. Mercury. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR, editors. Biological monitoring of toxic metals. New York: Plenum Press; 1988:199–246.
26. Guidelines for methylmercury in fish. Report of a Joint FAO/NACA/WHO study group on food safety issues associated with products from aquaculture. WHO Technical Report Series 883. Geneva: World Health Organization; 1999.
27. Veiga MM, Baker R. Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners. Vienna: United Nations Industrial Development Organization; 2004.

28. Schulz C, Wilhelm M, Heudorf U, Kolossa-Gehring M. Update of the reference and HBM values derived by the German Human Biomonitoring Commission. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;215(1):26–35 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911000794?via%3Dihub>, accessed 31 January 2018).



## Приложение 1. Инструкции по забору проб мочи для участников обследования

Пожалуйста, внимательно прочитайте инструкции до взятия образца первой утренней мочи.

**Примечание:** с момента последнего мочеиспускания должно пройти как минимум пять часов.

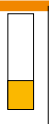

1. Зайдите в туалет.
2. Вымойте руки с мылом и водой и насухо вытрите их.
3. Достаньте контейнер для мочи из пластикового пакета с застежкой. (Пожалуйста, используйте только предоставленный контейнер. Он был предварительно обработан для обследования).
4. Откройте его, отвинтив крышку.
5. Заполните контейнер порцией первой утренней мочи до предварительно обозначенной линии.
6. Плотно закрутите крышку.
7. Поместите контейнер обратно в пластиковый пакет с застежкой.
8. Храните образец при температуре 4–8 °С пока не отдадите его медицинскому персоналу (не более суток).

Большое спасибо за сотрудничество.

## Приложение 2. Вопросник для забора проб мочи

Имя матери	
Номер медицинской карты	
ИД номер матери при обследовании	
Медицинский работник	Подпись:  Имя печатными буквами:
1. Берется ли этот образец мочи утром?	<input type="checkbox"/> Да  <input type="checkbox"/> Нет
2. Дата и время забора проб	-----/-----/-----/ (день/месяц/год) Начало: -----/----- (часы/минуты)
3. Сколько часов назад вы в последний раз мочились до этого забора проб?	_ _ часы
4. За сколько часов до этого забора проб вы в последний раз ели?	_ _ часы
5. Когда в последний раз вы ели рыбу или какие-либо морепродукты до этого забора проб?	<input type="checkbox"/> Сегодня <input type="checkbox"/> Вчера <input type="checkbox"/> Позавчера

## Приложение 3. Список приема образцов

Объем	Моча			Разделение образцов мочи на аликвоты	
	U1	U2	X U		
	Ртуть	Креатинин	Биобанк		
	 5 мл	5 мл 	x 40 мл или x 10 мл		
Температура хранения при обследовании на местах и транспортировке	Холодильный контейнер	Холодильный контейнер	Холодильный контейнер		
Температура хранения в лаборатории	-20 °C	-20 °C	-80 °C		
<b>Идентификационный номер</b>				Дата	час
ИД					
ИД					
ИД					
....					

# Стандартные операционные процедуры для определения общей ртути в волосах, крови и моче альтернативным методом

## Резюме

Эти альтернативные стандартные операционные процедуры предназначены для лабораторий, имеющих доступ к приборам, позволяющим проводить анализ методом впрыскивания в поток и амальгамации золота с последующей атомно-абсорбционной спектрофотометрией холодного пара (CVAAS) или атомно-флуоресцентным определением холодного пара (CVAFS). В настоящих стандартных операционных процедурах описывается процедура разложения образцов. Ртуть, находящуюся в разложенных образцах, можно определить методом впрыскивания в поток или при помощи амальгамации золота с последующими CVAAS (или CVAFS).

## Ключевые слова

Mercury – analysis  
Methylmercury compounds – analysis  
Fetal blood – chemistry  
Umbilical cord – chemistry  
Hair – chemistry  
Urine – chemistry  
Biomarkers – analysis  
Flow injection analysis  
Spectrophotometry, atomic  
Environmental exposure

## Авторы

Milena Horvat  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения  
Janja Snoj Tratnik  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения  
Vesna Fajon  
Институт им. Йозефа Стефана, Любляна, Словения

# Содержание

<b>Условные сокращения</b> .....	<b>140</b>
<b>1. Кислотное разложение биологических образцов</b> .....	<b>141</b>
1.1. Сфера применения метода .....	141
1.2. Технический принцип .....	141
1.3. Меры предосторожности .....	141
1.4. Разложение биологического материала .....	141
<b>2. Определение общей ртути при помощи метода впрыскивания в поток и CVAAS</b> ....	<b>144</b>
2.1. Принцип и применение .....	144
2.2. Оборудование, материалы и растворы.....	144
2.3. Анализ методом CVAAS .....	147
<b>3. Определение общей ртути с использованием метода двойной амальгамации золота и CVAFS</b> .....	<b>150</b>
3.1. Принцип метода .....	150
3.2. Оборудование, материалы и растворы.....	150
3.3. Аналитическая процедура .....	153
3.4. Расчет .....	156

# Условные сокращения

BrCl	хлорид брома
CVAAS	атомно-абсорбционная спектрофотометрия холодного пара
CVAFS	атомно-флуоресцентная спектрометрия холодного пара
HCl	соляная кислота
HgCl <sub>2</sub>	хлорид ртути
HNO <sub>3</sub>	азотная кислота
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	дихромат калия
KBr	бромид калия
KBrO <sub>3</sub>	бромат калия
KMnO <sub>4</sub>	перманганат калия
SnCl <sub>2</sub>	хлорид олова
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	пентоксид ванадия
м./об.	масса/объем
об./об.	объем/объем



# 1. Кислотное разложение биологических образцов

## 1.1. Сфера применения метода

Описанный метод предназначен для определения общей ртути (Hg) в биологических образцах.

## 1.2. Технический принцип

Данный метод применим ко всем биологическим образцам с суммарными концентрациями Hg выше 1 нг/г. Цель сильного кислотного разложения заключается в расщеплении образцов, окислении и преобразовании любых органических форм ртути в неорганическую ртуть.

## 1.3. Меры предосторожности

Следуйте всеобщим правилам соблюдения безопасности. Работа с образцами человеческой крови, плазмы, сыворотки, мочи и другими физиологическими жидкостями или тканями должна проводиться в перчатках, лабораторном халате и защитных очках. Утилизируйте одноразовые пластиковые, стеклянные и бумажные материалы (наконечники пипеток, автодозаторные пробирки и перчатки), которые соприкасаются с биологическими жидкостями человека (такими как моча), в специальные пакеты для удаления опасных биологических отходов в автоклаве. Храните эти пакеты в соответствующих контейнерах до тех пор, пока они не будут запечатаны и помещены в автоклав.

По окончании работы протрите все рабочие поверхности, на которых обрабатывалась биологическая жидкость, 10% об./об. раствором гипохлорита натрия или его эквивалентом. Рекомендуется использовать ножную педаль на приборе Micromedic Digiflex, так как при этом уменьшается контакт аналитика с рабочими поверхностями, контактировавшими с биологическими жидкостями человека, а также освобождаются руки для того, чтобы держать ванночки с образцами и автодозаторные пробирки. Утилизируйте все биологические образцы и разбавленные материалы для исследования в автоклавном мешке для биологически опасных отходов в конце анализа в соответствии с указаниями для утилизации опасных отходов.

## 1.4. Разложение биологического материала

### 1.4.1. Оборудование

- Стеклянная бутылка (1 л), промытая в соответствии с процедурой очистки стеклянной посуды.
- Мерная колба (500 мл, класс А), промытая в соответствии с процедурой очистки стеклянной посуды.
- Тefлоновые виалы с крышками (60 мл), промытые в соответствии с процедурой очистки тefлоновой посуды.
- Полипропиленовые лопатки.
- Электрическая плитка и алюминиевый брусок.
- Высокоточные весы.

### 1.4.2. Очистка стеклянной посуды

Перед использованием тщательно вымойте всю лабораторную стеклянную посуду следующим образом.

- Замочите тefлоновые и стеклянные сосуды на ночь в 2% моющем растворе Micro-90.
- Тщательно прополощите сосуды сначала водопроводной, затем бидистиллированной водой.

- Сполосните раствором 0,5% перманганата калия ( $\text{KMnO}_4$ ).
- Споласкивайте водой до тех пор, пока цвет раствора  $\text{KMnO}_4$  не перестанет быть заметен.
- Наполните сосуды 1% раствором соляной кислоты ( $\text{HCl}$ ) и храните в безртутных помещениях.
- Опорожните виалы непосредственно перед их использованием для пробоподготовки и дайте им высохнуть при температуре 60 °С в вытяжном шкафу.

### 1.4.3. Очистка тефлоновой посуды

- Замочите сосуды на ночь в мыльном растворе в пластиковом контейнере (2% раствор Micro в водопроводной воде).
- Тщательно сполосните сначала водопроводной, а затем бидистиллированной водой.
- Поместите сосуды в 50% (об./об.) концентрированный раствор азотной кислоты ( $\text{HNO}_3$ ) и нагревайте при температуре 60 °С в течение двух дней.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Переместите сосуды в 10% (об./об.) концентрированный раствор  $\text{HCl}$  и оставьте на один день (как минимум) при комнатной температуре.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Храните все сосуды в полиэтиленовых пакетах. По возможности наполните сосуды 1%  $\text{HCl}$  (главным образом, тефлоновые и стеклянные бутылки).

### 1.4.4. Реагенты и химикаты

- $\text{HNO}_3$  (65%, чистая для анализов, с низким содержанием Hg);
- $\text{HCl}$  (30%);
- пентоксид ванадия  $\text{V}_2\text{O}_5$  (сверхчистый);
- дихромат калия ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ );
- бромат калия ( $\text{KBrO}_3$ ) (чистый для анализа);
- бромид калия ( $\text{KBr}$ ) (чистый для анализа);
- бидистиллированная деионизированная вода (>18 МОм•см).

Существует два варианта окислительных растворов.

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  10% (масса/объем (м./об.)) в бидистиллированной воде

1. Взвесьте 50 г  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и поместите в чистую стеклянную колбу объемом 500 мл.
2. Добавьте около 250 мл бидистиллированной воды и встряхивайте до полного растворения  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .
3. Влейте до отметки бидистиллированную воду.

Окислительный раствор  $\text{BrCl}$

1. Взвесьте ровно 11 г  $\text{KBrO}_3$  и 15 г  $\text{KBr}$  и поместите в чистую стеклянную бутылку вместимостью 1 литр.
2. Добавьте 200 мл бидистиллированной воды.
3. Добавьте аккуратно 800 мл концентрированной  $\text{HCl}$ ; разбавление необходимо проводить в хорошо проветриваемом вытяжном шкафу, чтобы предотвратить воздействие токсичных паров, высвобождающихся при растворении  $\text{KBrO}_3$ .
4. Держите бутылку обернутой алюминиевой фольгой.

Срок хранения этих двух растворов неограничен при условии, что они хранятся в темноте при комнатной температуре в плотно закрытой тефлоновой или стеклянной бутылке в безртутном пространстве.

### 1.4.5. Процедуры

1. Встряхните виалы с образцами примерно в течении двух минут для гомогенизации.
2. Подождите несколько минут, прежде чем их открывать.
3. Взвесьте ровно 0,5-1 мл образца крови, 20-100 мг образца волос или 1-2 мл образца мочи и поместите в тефлоновые виалы (60 мл).
4. Взвесьте 45 мг  $V_2O_5$  и добавьте в эти виалы.
5. Добавьте 5 мл концентрированной  $HNO_3$  (или больше, если необходимо: смесь должна быть жидкой).
6. Закройте крышками и оставьте виалы стоять не менее часа при комнатной температуре. Если реакция очень сильная, возможно, безопаснее оставить образцы при комнатной температуре на ночь перед нагревом.
7. Положите пробирки на алюминиевый брусок на электроплитке, нагретой до  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , и оставьте на три часа.
8. Дайте образцам остыть до комнатной температуры перед открытием пробирок. Поместите пробирки для охлаждения в вытяжной шкаф, чтобы избежать испарений токсичных кислот.
9. Добавьте около 20 мл бидистиллированной воды.
10. Добавьте 1 мл раствора  $K_2Cr_2O_7$  (конечная концентрация = 2% об./об.) или 0,5 мл раствора  $BrCl$  (конечная концентрация = 1% об./об.).
11. Разбавьте до отметки бидистиллированной водой (объем разбавления = 57.5 мл).
12. Перед анализом встряхните виалы и дождитесь седиментации материала.

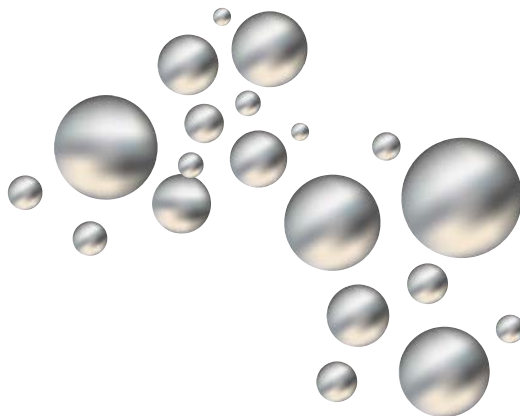
Эти пробы можно хранить в течение нескольких дней перед анализом в холодильнике ( $+4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Максимальное время хранения определяется для каждого вида образцов из практики.

### 1.4.6. Холостые реагенты

Для каждой партии анализа должно быть подготовлено как минимум три холостых образца. Их готовят аналогичным образом, что и испытуемые образцы, за исключением того, что в пробирки не добавляются образцы.

### 1.4.7. Референтные материалы

Для каждой партии анализа следует использовать по крайней мере один сертифицированный референтный материал в трех экземплярах. Пробоподготовка материала осуществляется аналогичным образом, что и пробоподготовка испытуемых образцов. Сертифицированный референтный материал должен иметь схожий состав и концентрацию ртути, что и образцы.



## 2. Определение общей ртути при помощи метода впрыскивания в поток и CVAAS

### 2.1. Принцип и применение

Биологические образцы минерализуются в присутствии сильных кислот. Неорганическая ртуть восстанавливается до своей элементарной формы под воздействием хлористого олова при использовании метода впрыскивания в поток. Холодные пары ртути отделяются от разложенных образцов в газожидкостном сепараторе, с последующим перемещением через кварцевую ячейку поглощения атомно-абсорбционного спектрометра (ААС), где измеряется их концентрация. Световой луч полой катодной ртутной лампы направляется через кварцевую ячейку в монохроматор и далее в детектор, который измеряет количество света, поглощенного атомизированным паром в ячейке. Количество энергии, поглощенной на длине волны в среде, пропорционально концентрации элемента в образце.

### 2.2. Оборудование, материалы и растворы

#### 2.2.1. Оборудование

Приборы ААС Varian-Spectra AA-10 и VGA-76 или любая аналогичная система, предназначенная для выполнения метода впрыскивания в поток.

#### 2.2.2. Материалы

- Микропипетки.
- Тефлоновые бутылки вместимостью 125 мл, промытые в соответствии с процедурой очистки тефлоновой посуды.
- Высокоточные весы.
- Стеклянные мерные колбы вместимостью от 50 до 1000 мл (класс А), промытые в соответствии с процедурой очистки стеклянной посуды.

#### 2.2.3. Очистка стеклянной посуды

Перед использованием тщательно вымойте всю лабораторную стеклянную посуду следующим образом.

- Замочите тефлоновые и стеклянные сосуды на ночь в 2% моющем растворе Micro-90.
- Тщательно прополощите сосуды сначала водопроводной, затем бидистиллированной водой.
- Сполосните 0,5% раствором  $\text{KMnO}_4$ .
- Промывайте водой до тех пор, пока цвет раствора  $\text{KMnO}_4$  не перестанет быть заметен.
- Наполните сосуды 1% раствором  $\text{HCl}$  и храните в безртутном помещении.
- Опорожните виалы непосредственно перед пробоподготовкой и дайте им высохнуть при температуре 60 °C в вытяжном шкафу.

#### 2.2.4. Очистка тефлоновой посуды

- Замочите сосуды на ночь в мыльном растворе в пластиковом контейнере (2% раствор Micro в водопроводной воде).
- Тщательно сполосните сначала водопроводной, а затем бидистиллированной водой.

- Поместите сосуды в 50% (об./об.) концентрированный раствор  $\text{HNO}_3$  и нагревайте при температуре 60 °С в течение двух дней.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Переместите сосуды в 10% (об./об.) концентрированный раствор  $\text{HCl}$  и оставьте (как минимум) на один день при комнатной температуре.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Храните все сосуды в полиэтиленовых пакетах. По возможности наполняйте сосуды 1%  $\text{HCl}$  (главным образом, тефлоновые и стеклянные бутылки).

### 2.2.5. Реагенты и химикаты

- $\text{HNO}_3$  (65%, чистая для анализов, с низким содержанием  $\text{Hg}$ )
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (чистый для анализов, с низким содержанием  $\text{Hg}$ )
- $\text{KBr}$
- $\text{KBrO}_3$
- Хлористое олово ( $\text{SnCl}_2$ ) (чистое для анализов, с нормальным или низким содержанием  $\text{Hg}$ )
- $\text{HCl}$  (30%)
- Хлорид ртути ( $\text{HgCl}_2$ ) (соль) или стандартный раствор  $\text{Hg}$  (1000 мг/л)
- бидистиллированная деионизированная вода (>18 МОм•см)
- Аргон (чистый)

### 2.2.6. Растворы реагентов

*20% м./об.  $\text{SnCl}_2$  в 20% об./об.  $\text{HCl}$  (200 мл)*

1. Взвесьте ровно 40 г  $\text{SnCl}_2$  и поместите в чистый стеклянный аналитический стакан при помощи пластиковой лопатки (стакан и лопатка должны использоваться исключительно для работы с  $\text{SnCl}_2$ ).
2. Добавьте 40 мл концентрированной  $\text{HCl}$  прямо к  $\text{SnCl}_2$  и переместите в мерную колбу вместимостью 200 мл. Смешайте и подождите до полного растворения  $\text{SnCl}_2$ .
3. Добавьте бидистиллированной воды до отметки (200 мл).
4. При старом запасе  $\text{SnCl}_2$  может потребоваться подогрев раствора на плитке для полного растворения  $\text{SnCl}_2$  (не доводите до кипения).
5. В случае образцов низких концентраций, если используемый  $\text{SnCl}_2$  не с «низкой концентрацией ртути», его необходимо прочистить при помощи азота в течение двух часов перед использованием.
6. Этот раствор необходимо готовить каждый день анализа и использовать в свежем виде.

Примечание: всю стеклянную посуду, используемую для приготовления раствора  $\text{SnCl}_2$ , необходимо хранить отдельно от остальной лабораторной посуды во избежание перекрестного загрязнения посуды для определения микроэлементов.

*$\text{HNO}_3$  10% об./об. (500 мл)*

1. Влейте около 400 мл бидистиллированной воды в мерную колбу объемом 500 мл.
2. Осторожно добавьте 50 мл концентрированной  $\text{HNO}_3$ .
3. Влейте до отметки бидистиллированную воду.
4. Хорошо встряхните.

Этот раствор можно хранить в плотно закрытой колбе.

Существует два варианта окислительных растворов.

*K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10% (м./об.) в бидистиллированной воде*

1. Взвесьте 50 г K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> и поместите в чистую стеклянную колбу объемом 500 мл.
2. Добавьте около 250 мл бидистиллированной воды и встряхивайте до полного растворения K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.
3. Влейте до отметки бидистиллированную воду.

*Окислительный раствор BrCl*

1. Взвесьте ровно 11 г KBrO<sub>3</sub> и 15 г KBr и поместите в чистую стеклянную бутылку объемом 1 литр.
2. Добавьте 200 мл бидистиллированной воды.
3. Добавьте аккуратно 800 мл концентрированной HCl; разбавление должно быть проведено в хорошо проветриваемом вытяжном шкафу, чтобы предотвратить воздействие токсичных паров, высвобождающихся при растворении KBrO<sub>3</sub>.
4. Держите бутылку обернутой алюминиевой фольгой.

Срок хранения этих двух растворов неограничен при условии, что они хранятся в темноте при комнатной температуре в плотно закрытой тефлоновой или стеклянной бутылке в безртутном пространстве.

### 2.2.7. Стандартный раствор ртути

*Основной стандартный раствор 1:1 мг/мл Hg в 10% азотной кислоте*

1. Взвесьте ровно 1,354 г HgCl<sub>2</sub> и поместите в стеклянную мерную колбу объемом 1 литр.
2. Добавьте около 500 мл бидистиллированной воды.
3. Добавьте 10 мл концентрированной HNO<sub>3</sub> (с низкой концентрацией ртути).
4. Заполните до отметки бидистиллированной водой.
5. Хорошо встряхните до полного растворения.
6. Переместите в тефлоновую бутылку объемом 1 литр.
7. Плотно завинтите крышку при помощи динамометрического ключа и держите в холодильнике (+4 °C).

*Основной стандартный раствор 2:1 мкг/мл Hg в 4% HNO<sub>3</sub>*

1. Налейте 95 г бидистиллированной воды в тефлоновую бутылку объемом 125 мл.
2. Добавьте 4 мл концентрированной HNO<sub>3</sub> (с низкой концентрацией ртути).
3. Добавьте 1 мл раствора BrCl (или 2 мл раствора K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).
4. Добавьте 100 мкл основного раствора 1 (1 мг/мл Hg).
5. Хорошо встряхните.
6. Плотно закройте крышку гаечным ключом и держите в холодильнике (+4 °C).

*Градуировочный график (не менее трех стандартов и калибровка нуля).*

1. Влейте около 10 мл бидистиллированной воды в чистую стеклянную колбу объемом 50 мл.
2. Добавьте реагенты, как в разложенных образцах (HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2:1 или HNO<sub>3</sub>).
3. Добавьте соответствующее количество основного стандартного раствора (1 или 2 в зависимости от концентрации образцов), используя микропипетку.

4. Добавьте 1 мл раствора BrCl (или 2 мл раствора  $K_2Cr_2O_7$ ).
5. Разведите до отметки (50 мл) бидистиллированной водой.
6. Хорошо встряхните.

Эти растворы следует готовить каждый день анализа и использовать в свежем виде.

## 2.3. Анализ методом CVAAS

### 2.3.1. Градуировочный график

Приготовьте стандартные растворы как минимум с тремя стандартными концентрациями и одной нулевой. Нулевая калибровка готовится как стандартные растворы, но без добавления ртутного стандарта.

Если образцы выходят за пределы диапазонов градуировочного графика, разведите их в той же матрице или подготовьте новый градуировочный график.

### 2.3.2. Условия прибора

- Длина волны: 253,7 нм;
- ток лампы: 4 мА;
- ширина щели: 0,5 нм;
- восстановительное вещество (20%  $SnCl_2$  в 20% HCl): 1 мл/мин;
- бидистиллированная вода: 1 мл/мин;
- промывочный раствор (10%  $HNO_3$ ) или образец: 6,5 мл/мин;
- инертный газ: аргон.

### 2.3.2. Оптимизация атомно-абсорбционного спектрометра

Следующие инструкции относятся к работе с атомно-абсорбционным спектрометром AAS Varian-Spectra AA-10 и VGA-76 или с любой аналогичной системой, предназначенной для анализа содержания ртути методом впрыскивания в поток. При использовании другого прибора необходимо следовать инструкциям производителя.

1. Убедитесь, что огневой диск вставлен в прибор.
2. Включите принтер, а затем спектрометр.
3. Нажмите кнопку с надписью INDEX [ИНДЕКС].
4. Выберите установку PROGRAM DIRECTORY [УКАЗАТЕЛЬ ПРОГРАММ].
5. Выберите номер программы анализа ртути и нажмите кнопку RECALL PROGRAM [ПОВТОР ПРОГРАММЫ].
6. Параметр METHOD [МЕТОД] должен быть: № элемента: 24  
режим прибора: ABS  
калибровка: должна быть CONCENTRATION [КОНЦЕНТРАЦИЯ]  
измерение: должно быть INTEGRATION [ИНТЕГРАЦИЯ].
7. INSTRUMENT PARAMETER [ПАРАМЕТР ИНСТРУМЕНТА] должен быть:  
положение лампы: кодированное положение лампы автоматически распознается.  
ток лампы: 4 мА  
введение образца: MANUAL [ВРУЧНУЮ]  
время задержки (секунды): 70  
время измерения (секунды): 5,0

параллельные измерения: 3

коррекция фона: ON [ВКЛ].

8. Установите ртутную лампу в правильное положение.
9. Перейдите к пункту NOTE [ПРИМЕЧАНИЕ]. На этой странице указывается концентрация, дающая реакцию 0,2 ABS.
10. Выберите правильную ширину щели (0,5) и установите монохроматор на нужную длину волны (253,7 нм).
11. Перейдите к пункту OPTIMIZATION [ОПТИМИЗАЦИЯ]. Этот шаг выполняется без абсорбционной ячейки в световом тракте AAC. На экране высвечиваются две полосы: одна показывает уровень мощности ртутной лампы, другая – дейтериевой лампы. Убедитесь, что горелка не заслоняет свет. Доведите мощность ламп до максимума путем последовательной оптимизации длины волны и положения ламп; выполните эти регулировки дважды. Если полоса сигнала слишком длинная, нажмите RESCALE [ПЕРЕМАСШТАБИРОВАТЬ]. После оптимизации мощности двух ламп должны быть одинаковыми. Если появится сообщение TOO LOW DEUTERIUM LAMP [слишком низкая мощность дейтериевой лампы] (или TOO HIGH [слишком высокая]), увеличьте (или уменьшите) интенсивность дейтериевой лампы.
12. Проверьте значение фотоумножителя (PMV около 294 мВ) и запишите его в журнал.
13. Установите абсорбционную ячейку на головку горелки и убедитесь, что световой луч пересекает ячейку близко к центру.
14. Перейдите в STANDARDS [СТАНДАРТЫ] и введите стандартные концентрации для градуировочного графика.

#### 2.4.4. Работа аксессуара для парообразования VGA

1. Включите аргон. Поток газа должен быть отрегулирован до минимума, при этом оранжевая лампочка VGA должна быть выключена.
2. Поместите каждую из трех тефлоновых капиллярных пробирок в соответствующие растворы:
  - (i) раствор  $\text{SnCl}_2$
  - (ii) бидистиллированная вода
  - (iii) раствор для полоскания (10%  $\text{HNO}_3$ ).
3. Включите VGA и медленно затяните винт регулировки давления на перистальтическом насосе до тех пор, пока не начнется перекачка жидкости (не затягивайте винт слишком сильно, так как это сократит срок службы трубок насоса).
4. Проверьте, чтобы не было утечек.
5. Оставьте систему работать около 10 минут, чтобы очистить ее. Отсоедините черную трубку от кварцевой абсорбционной ячейки, если система не работала некоторое время (чтобы предотвратить загрязнение ячейки).
6. Присоедините трубку к газожидкостному сепаратору и абсорбционной ячейке.

#### 2.4.5. Калибровка и измерение образцов

В верхней части экрана AAC указывается раствор, который будет измеряться (холостой; стандартный образец 1, 2 и т.д.; перекалибровочный; испытуемый образец 1, 2 и т.д.). Чтобы выбрать тип анализируемого раствора, нажмите SOLUTION TYPE [ТИП РАСТВОРА]. Всегда проверяйте соответствие этой установки типу анализируемого раствора.

Чтобы провести измерение раствора, нажмите кнопку READ [ЧИТАТЬ].

На этом этапе должны работать AAC и VGA.

1. Перейдите к пункту ANALYTICAL RESULTS [АНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ].



2. Нажмите INSTRUMENT ZERO [ОБНУЛЕНИЕ ИНСТРУМЕНТА] с промывочным раствором ( $\text{HNO}_3$  10%).
3. Измерьте промывочный раствор как образец: это должно дать 0,000 ABS.
4. Измерьте холостую пробу или градуировочный график как образец. Это также должно быть близко к 0,000 ABS. Если это не так, снова нажмите [ОБНУЛЕНИЕ ИНСТРУМЕНТА] при аспирации промывочного раствора.
5. Проверьте значение ABS для одного ртутного стандарта (измерьте его как образец). Это определяет чувствительность прибора и должно быть записано в журнал.
6. Перейдите к CALIBRATION [КАЛИБРОВКА].
7. Измерьте калибровочный холостой образец, а затем стандартные образцы.
8. Проводите аспирацию промывочного раствора в течение примерно одной минуты между каждым стандартным образцом.
9. Проверьте правильность градуировочного графика.
10. Измерьте сначала холостые реагенты, а затем референтные материалы. Рассчитайте концентрацию в мкг/г референтного материала и проверьте точность результата перед тем, как продолжить.
11. Прогоните образцы.
12. Прогоните промывочный раствор в течение примерно одной минуты между каждым образцом.
13. Измеряйте холостой образец и перекалибровочный образец после измерения четырех-пяти испытуемых образцов в зависимости от стабильности прибора.
14. Измеряйте один и тот же референтный материал через регулярные промежутки времени во время анализа.

### 2.3.6. Процедура выключения

1. Промойте все пробирки бидистиллированной водой около 20 минут (убедитесь, что пробирка для раствора  $\text{SnCl}_2$  находится отдельно от других).
2. Выключите VGA.
3. Снимите напряжение с трубок.
4. Выключите подачу аргона.
5. Выключите принтер и AAC.

### 2.3.7. Расчет

$$[C] (mg/kg) = \frac{(Cd - Cb) \times V}{W}$$

[C] – концентрация общей Hg в сухом образце (мкг/г сухой)

Cd – концентрация Hg в растворе образца (мкг/мл)

Cb – средняя концентрация Hg в холостых реагентах (мкг/мл)

V – объем разбавления разложенных образцов (мл) = 57.5 мл

W – вес образца в сухом состоянии (г).

## 3. Определение общей ртути с использованием метода двойной амальгамации золота и CVAFS

### 3.1. Принцип метода

После декомпозиции образцов в присутствии сильных кислот  $Hg^{2+}$  восстанавливается в виде летучей элементарной ртути  $Hg^0$  с избытком  $SnCl_2$ . Элементарная ртуть концентрируется в золотоловушке и обнаруживается после десорбции при температуре  $600\text{ }^{\circ}C$  холодным паром атомной флуоресценции при длине волны  $253.7\text{ нм}$ .

### 3.2. Оборудование, материалы и растворы

#### 3.2.1. Оборудование

- Детектор AFS (Brook Rand) или любое другое аналогичное оборудование.

#### 3.2.2. Материалы

- Мерные колбы (100, 500 и 1000 мл, класс А).
- Стеклянные бутылки (1 л), промытые в соответствии с процедурой очистки стеклянной посуды.
- Тефлоновые барботеры (60 мл, 500 мл для проб воды), промытые в соответствии с процедурой очистки тефлона.
- Тефлоновые трубки, промытые в соответствии с процедурой очистки тефлоновой посуды.
- Тефлоновые бутылки (125 мл и 1 л), промытые в соответствии с процедурой очистки тефлоновой посуды.
- Кварцевое волокно, очищенное при температуре  $500\text{ }^{\circ}C$ .
- Золотоносный песок.
- Кварцевые колонки для золотоловушек, промытые в соответствии с процедурой очистки стеклянной посуды.
- Сушильные колонки (тефлоновая или кварцевая пробирка, наполненная натронной известью), очищенные в соответствии с процедурой очистки стеклянной или тефлоновой посуды.
- Система подогрева золотоловушек (2 VARIAC, 6А и таймер; проволока Cr/Ni толщиной 0,5 мм).
- Расходомеры.
- Интегратор.
- Высокоточные весы.

#### 3.2.3. Очистка стеклянной посуды

Перед использованием тщательно вымойте всю лабораторную стеклянную посуду следующим образом.

- Замочите тефлоновые и стеклянные сосуды на ночь в 2% моющем растворе Micro-90.
- Тщательно прополощите сосуды сначала водопроводной, затем бидистиллированной водой.
- Сполосните 0,5% раствором  $KMnO_4$ .

- Промойте водой до тех пор, пока цвет раствора  $\text{KMnO}_4$  не перестанет быть заметен.
- Наполните сосуды 1% раствором  $\text{HCl}$  и храните в безртутном помещении.
- Опорожните виалы непосредственно перед их использованием для пробоподготовки и дайте им высохнуть при температуре  $60\text{ }^\circ\text{C}$  в вытяжном шкафу.

#### Очистка тефлоновой посуды

- Замочите сосуды на ночь в мыльном растворе в пластиковом контейнере (2% раствор Micro в водопроводной воде).
- Тщательно сполосните сначала водопроводной, а затем бидистиллированной водой.
- Поместите сосуды в 50% (об./об.) концентрированный раствор  $\text{HNO}_3$  и нагревайте при температуре  $60\text{ }^\circ\text{C}$  в течение двух дней.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Переместите сосуды в 10% (об./об.) концентрированный раствор  $\text{HCl}$  и оставьте (как минимум) на один день при комнатной температуре.
- Тщательно промойте бидистиллированной водой (не менее четырех раз).
- Храните все сосуды в полиэтиленовых пакетах. По возможности наполните сосуды 1%  $\text{HCl}$  (главным образом, тефлоновые и стеклянные бутылки).

#### Реагенты и химикаты

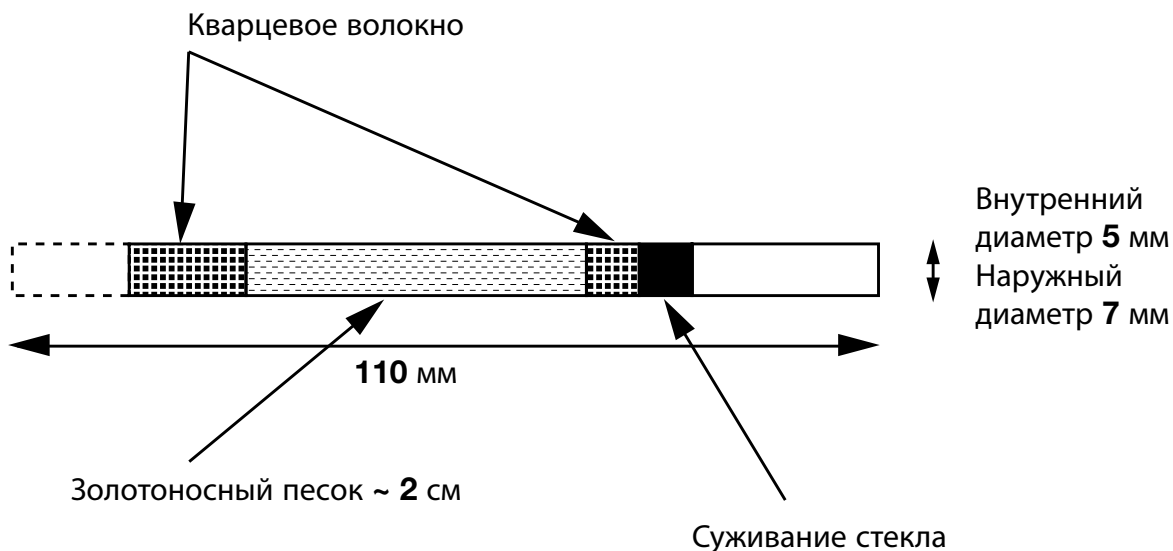
- $\text{SnCl}_2$  (чистый для анализа);
- $\text{KBrO}_3$ ;
- $\text{KBr}$ ;
- $\text{HgCl}_2$  (чистый для анализа, с нормальным или низким содержанием  $\text{Hg}$ );
- $\text{HCl}$  (30%);
- $\text{HNO}_3$  (65%);
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (чистый для анализа, с низкой концентрацией ртути);
- Гранулы натронной извести (чистые для анализа);
- бидистиллированная деионизированная вода ( $>18\text{ МОм}\cdot\text{см}$ );
- аргон (очищенный от ртути).

#### 3.2.4. Подготовка золотоловушки (рис. 1)

1. Вложите небольшой кусочек кварцевого волокна в конец более длинной части колонки. Разровняйте его с помощью пипетки Пастера.
2. Введите около 2 см золотоносного песка. Лучше взвесить песок, помещенный в ловушку, чтобы получить лучшую воспроизводимость между измерениями ловушек.
3. Вложите кусочек кварцевого волокна большего размера с помощью пипетки Пастера. Старайтесь установить все ловушки одинаковым образом.
4. Очистите новую ловушку не менее четырех раз перед использованием (см. аналитическую процедуру).

Примечание: при использовании новых ловушек перед началом анализа образца проверьте воспроизводимость стандартного ответа для всех ловушек.

Рис. 1. Золотоловушка



### 3.2.5. Растворы реагентов

20% м./об.  $\text{SnCl}_2$  в 20% об./об.  $\text{HCl}$  (100 мл)

1. Взвесьте ровно 20 г  $\text{SnCl}_2$  и поместите в чистый стеклянный аналитический стакан при помощи пластиковой лопатки (стакан и лопатка должны использоваться исключительно для работы с  $\text{SnCl}_2$ ).
2. Добавьте 20 мл концентрированной  $\text{HCl}$  прямо к  $\text{SnCl}_2$  и переместите в мерную колбу вместимостью 100 мл. Смешайте и подождите до полного растворения  $\text{SnCl}_2$ .
3. Добавьте бидистиллированной воды до отметки (100 мл).
4. При старом запасе  $\text{SnCl}_2$  может потребоваться подогрев раствора на плитке для полного растворения  $\text{SnCl}_2$  (не доводите до кипения).
5. Очистите раствор  $\text{SnCl}_2$  при помощи азота на протяжении двух часов для получения безртутного раствора. Существует два варианта окислительных растворов.

10% (м./об.)  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в бидистиллированной воде

1. Взвесьте 50 г  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и поместите в чистую стеклянную колбу объемом 500 мл.
2. Добавьте около 250 мл бидистиллированной воды и встряхивайте до полного растворения  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .
3. Влейте до отметки бидистиллированную воду.

Окислительный раствор  $\text{BrCl}$

1. Взвесьте ровно 11 г  $\text{KBrO}_3$  и 15 г  $\text{KBr}$  и поместите в чистую стеклянную бутылку объемом 1 литр.
2. Добавьте 200 мл бидистиллированной воды.
3. Добавьте осторожно 800 мл концентрированной  $\text{HCl}$ ; разбавление должно быть проведено в хорошо проветриваемом вытяжном шкафу, чтобы предотвратить воздействие токсичных паров, высвобождающихся при растворении  $\text{KBrO}_3$ .
4. Держите бутылку обернутой алюминиевой фольгой.

Срок хранения этих двух растворов неограничен при условии, что они хранятся в темноте при комнатной температуре в плотно закрытой тefлоновой или стеклянной бутылке в безртутном пространстве.

### 3.2.6. Стандартные растворы ртути

*Основной стандартный раствор: 1 мг/мл Hg в 10% HNO<sub>3</sub>*

1. Взвесьте ровно 1,354 г HgCl<sub>2</sub> и поместите в стеклянную мерную колбу объемом 1 литр.
2. Добавьте около 500 мл бидистиллированной воды.
3. Добавьте 10 мл концентрированной HNO<sub>3</sub> (с низкой концентрацией Hg).
4. Заполните до отметки бидистиллированной водой.
5. Хорошо перемешайте до полного растворения.
6. Переместите в тefлоновую бутылку объемом 1 литр.
7. Плотно завинтите крышку при помощи динамометрического ключа и держите в холодильнике (+4 °C).

*Промежуточный стандартный раствор: 1 мкг/мл Hg в 4% HNO<sub>3</sub>*

1. Налейте 95 г бидистиллированной воды в тefлоновую бутылку объемом 125 мл.
2. Добавьте 4 мл концентрированной HNO<sub>3</sub> (с низкой концентрацией Hg).
3. Добавьте 1 мл раствора BrCl (или 2 мл раствора K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).
4. Добавьте 100 мкл основного раствора (1 мг/мл Hg).
5. Хорошо встряхните.

Если требуется более разбавленный раствор, разведите промежуточный стандартный раствор, следуя вышеуказанной процедуре. Бутылки со стандартными растворами должны быть плотно закрыты при помощи гаечного ключа и должны храниться в холодильнике (+4 °C).

### 3.3. Аналитическая процедура

1. Подготовьте образцы, как описано выше.
2. Золотоловушки перед использованием необходимо очистить путем нагрева до 600 °C, не подключая к детектору AFS. Затем проверьте, не осталось ли в них ртути, измерив высвобождаемую ртуть после повторного нагревания.
3. Очистите барботер (один или несколько раз, если система не использовалась в течение какого-то времени), следуя нижеприведенной процедуре.
4. Измерьте холостую пробу барботера, следуя нижеприведенной процедуре, и проверьте отсутствие загрязнения системы. Если значения холостой пробы барботера слишком высоки, продолжайте очистку системы до тех пор, пока значения не станут правильными и стабильными.
5. Калибруйте систему, следуя нижеприведенной процедуре в пункте «Градуировочный график». Эта калибровка должна выполняться не менее двух раз в день.
6. Измерьте холостые реагенты и растворы референтных материалов (подвергающиеся разложению одновременно с испытуемыми образцами), следуя нижеприведенной процедуре («Анализ холостых реагентов» и «Анализ образцов»). Проверьте отсутствие ртутного загрязнения и точность измерений, прежде чем приступать к анализу образца.
7. Начните измерение образца, как описано ниже («Анализ образца»). Во время прогона для целей контроля качества, референтный материал и холостые реагенты должны быть измерены как минимум дважды для каждого градуировочного графика.

### 3.3.1. Очистка барботера

1. Сполосните барботер и наполните бидистиллированной водой (3/4).
2. Добавьте 500 мкл раствора  $\text{SnCl}_2$ .
3. Очистите аргоном в течение 15 минут.

### 3.3.2. Холостая проба барботера

1. Сполосните барботер и наполните бидистиллированной водой (3/4).
2. Добавьте 500 мкл раствора  $\text{SnCl}_2$ .
3. Присоедините золотоловушку и очистите аргоном в течение 15 минут.
4. Проанализируйте результат.

### 3.3.3. Градуировочный график

1. Сполосните барботер и наполните бидистиллированной водой (3/4).
2. Добавьте стандартный раствор (50-150 мкл из 1 нг/мл основного раствора, что эквивалентно 50-150 пг Hg).
3. Добавьте 500 мкл раствора  $\text{SnCl}_2$ .
4. Присоедините золотоловушку и очистите аргоном в течение 15 минут.
5. Отсоедините ловушку и проанализируйте.

Градуировочный график должен быть подготовлен на уровне концентраций образцов. При необходимости могут быть использованы более концентрированные стандартные образцы, чем указано.

### 3.3.4. Анализ холостых реагентов

1. Промойте и наполните барботер бидистиллированной водой (количество бидистиллированной воды зависит от объема добавляемого холостого реагента).
2. Добавьте холостой раствор (холостой реагент). Его объем должен быть как минимум равен объему испытуемого образца (т.е. если для анализа необходимо 10 мл образца, необходимо проанализировать как минимум 10 мл холостого реагента). Если уровень ртути в холостом реагенте очень низкий, для анализа можно использовать больший объем холостого раствора.
3. Добавьте 500 мкл раствора  $\text{SnCl}_2$ .
4. Присоедините золотоловушку и очистите ее аргоном 15 минут (рис. 2).
5. Отсоедините и проанализируйте золотоловушку (рис. 3).

Рис. 2. Система барботера для анализа общей ртути

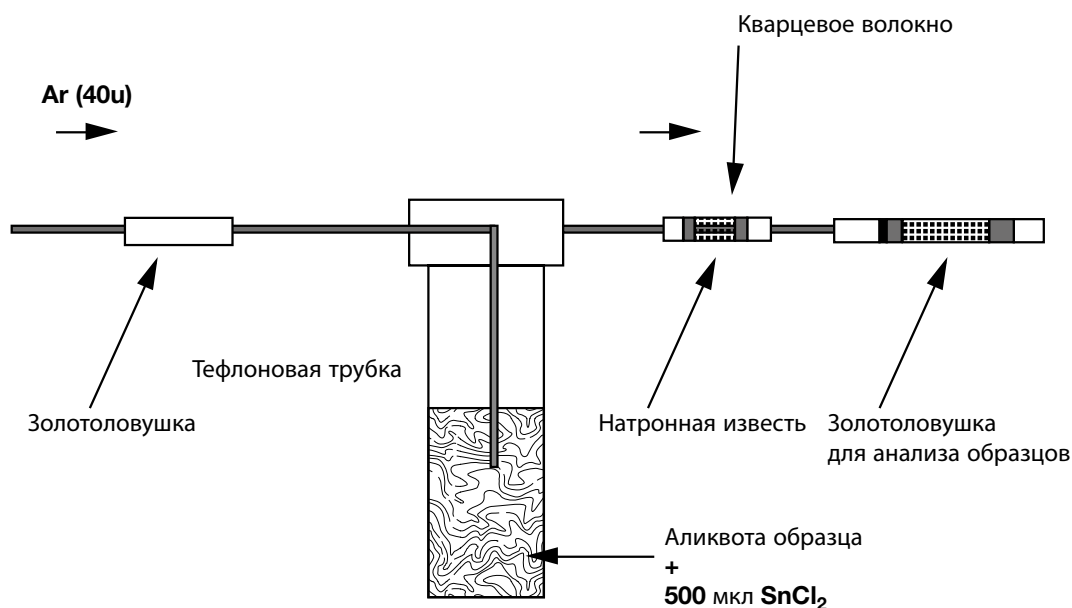
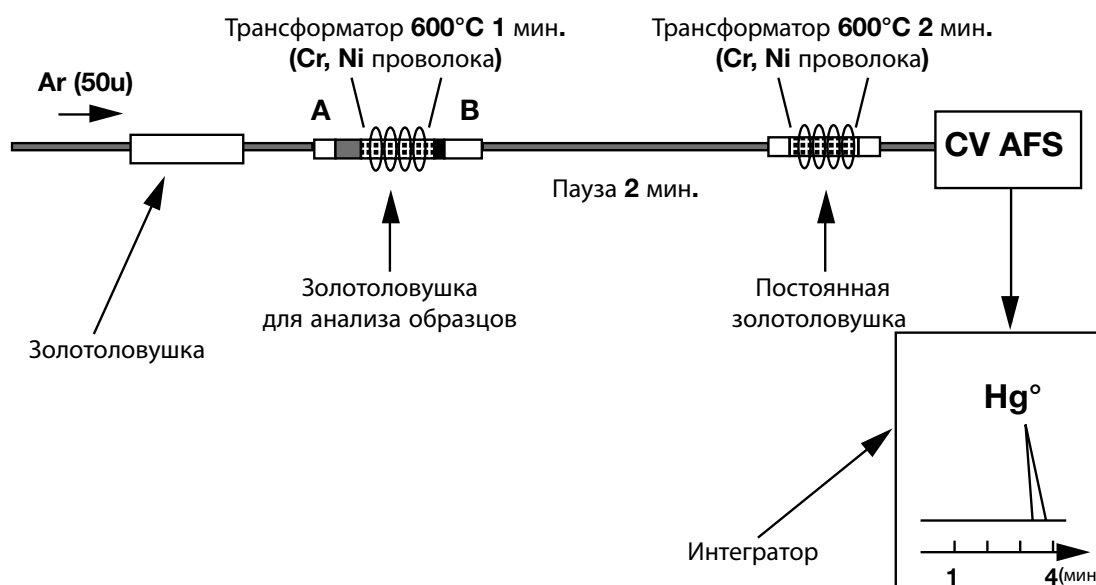


Рис. 3. Аналитическая система



### 3.3.5. Анализ образцов

1. Промойте и заполните барботер бидистиллированной водой (количество воды зависит от объема добавляемого образца, от 0 мл для образцов низкой концентрации, таких как моча и кровь, до трех четвертей объема барботера для образцов более высокой концентрации).
2. Добавьте раствор образца. Объем добавляемого образца зависит от концентрации образца, от нескольких микролитров для образцов волос до нескольких миллилитров для образцов крови и мочи. Реакция образца должна быть в пределах градуировочного графика.
3. Добавьте 500 мкл раствора  $\text{SnCl}_2$ .
4. Прикрепите золотоловушку и прочистите аргоном (азотом или воздухом) в течение 15 минут (рис. 2).
5. Отсоедините и проанализируйте золотоловушку (рис. 3).

### 3.3.6. Анализ двойной амальгамации (рис. 3).

1. Поместите золотоловушку с образцом в измерительной (аналитической) системе в поток аргона.
2. Нагревайте ловушку при 600 °С в течение одной минуты для высвобождения ртути.
3. Подождите две минуты, пока ртуть амальгамируется в постоянной золотоловушке.
4. Высвободите ртуть из постоянной золотоловушки, нагревая ее при 600 °С в течение двух минут.
5. Выявите ртуть с помощью CVAFS.

### 3.4. Расчет

Постройте градуировочный график, используя:

X – пг Hg<sub>2</sub>+ в добавленном стандарте

Y – реакция интегратора (площадь пика в произвольных единицах).

Вычислите градуировочный график, используя линейную регрессию всех точек стандартов (не менее трех) и среднее значение холостых проб барботера (единиц) для нулевого значения:

$$y = b + ax$$

Холостой реагент:

$$[B](pg/ml) = \frac{(Ab - b)}{a \times V}$$

[B] – концентрация метилртути в холостом реагенте (пг/мл)

Ab – реакция, полученная для аликвоты анализируемого холостого реагента (площадь пика в произвольных единицах)

V – объем анализируемого холостого реагента (мл)

Образцы:

$$[S](pg/g) = \frac{\left[ \frac{As - b}{a \times Va} \right] - [B] \times Vs}{W}$$

[S] – концентрация Hg в сухом образце (пг/г сухой)

As – реакция, полученная для аликвоты анализируемого образца (площадь пика в произвольных единицах)

Va – аликвота анализируемого образца (мл)

Vs – общий объем образца (мл)

W – вес образца в сухом состоянии (г)

[B] – концентрация метилртути в холостом реагенте (пг/мл).



## Европейское региональное бюро ВОЗ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) – специализированное учреждение Организации Объединенных Наций, созданное в 1948 г., основная функция которого состоит в решении международных проблем здравоохранения и охраны здоровья населения. Европейское региональное бюро ВОЗ является одним из шести региональных бюро в различных частях земного шара, каждое из которых имеет свою собственную программу деятельности, направленную на решение конкретных проблем здравоохранения обслуживаемых ими стран.

### Государства-члены

Австрия  
Азербайджан  
Албания  
Андорра  
Армения  
Беларусь  
Бельгия  
Болгария  
Босния и Герцеговина  
Венгрия  
Германия  
Греция  
Грузия  
Дания  
Израиль  
Ирландия  
Исландия  
Испания  
Италия  
Казахстан  
Кипр  
Кыргызстан  
Латвия  
Литва  
Люксембург  
Мальта  
Монако  
Нидерланды  
Норвегия  
Польша  
Португалия  
Республика Молдова  
Российская Федерация  
Румыния  
Сан-Марино  
Северная Македония  
Сербия  
Словакия  
Словения  
Соединенное Королевство  
Таджикистан  
Туркменистан  
Турция  
Узбекистан  
Украина  
Финляндия  
Франция  
Хорватия  
Черногория  
Чехия  
Швейцария  
Швеция  
Эстония

WHO/EURO:2020-430-40165-56240

**Всемирная организация здравоохранения**  
**Европейское региональное бюро**

UN City, Marmorvej 51, DK-2100 Copenhagen Ø, Denmark  
Тел.: +45 45 33 70 00 Факс: +45 45 33 70 01  
Эл. адрес: [eurocontact@who.int](mailto:eurocontact@who.int)  
Веб-сайт: [www.euro.who.int](http://www.euro.who.int)