

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения,
Главный государственный санитарный врач



М.И. Римжа

6 июня 2005 г.

Регистрационный № 12–0105

**ОЦЕНКА И КОРРЕКЦИЯ СЕЛЕНОВОГО
СТАТУСА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА
В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ
УСЛОВИЯХ ПРОЖИВАНИЯ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканский научно-практический центр гигиены

Авторы: канд. мед. наук В.А. Зайцев, канд. хим. наук З.Т. Бутько, канд. мед. наук И.А. Застенская, Е.Г. Мохорт

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция определяет методологию оценки и коррекции селенового статуса организма человека в регионах республики, отличающихся экологическими условиями.

Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный и ведомственный санитарный надзор в Республике Беларусь в области обеспечения качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также клинических лабораторных служб лечебно-профилактических организаций (ЛПО), санаторно-профилактических комплексов (СПК) и др., в компетенцию которых входит диагностика, лечение и профилактика заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Селеновый статус — это уровень обеспеченности организма человека селеном, оцениваемый по критериям содержания селена в сыворотке крови, волосах, ногтях и т.д.

Пищевой продукт — продукты в натуральном и переработанном виде, употребляемые человеком в пищу, в том числе продукты детского питания и продукты диетического питания, безалкогольные напитки, жевательная резинка, а также алкогольная продукция, пиво.

Биологически активные добавки к пище (БАД) — продукты, содержащие пищевые и/или биологически активные вещества (их концентраты) природного происхождения или идентичные им вещества искусственного происхождения, предназначенные для употребления внутрь или введения в состав пищевых продуктов с целью обогащения рациона питания человека и не являющиеся единственным источником пищи или диетическим питанием.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПО РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМЫ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СЕЛЕНА

Селен (Se) относится к эссенциальным микроэлементам. Он участвует во многих метаболических процессах, синтезе гормонов щитовидной железы, обладает антиоксидантными и радиопротекторными свойствами, а также способностью к детоксикации тяжелых металлов, нитратов и нитритов.

Селен поступает в организм человека с пищей и водой. Поэтому проведение мониторинга содержания селена в продуктах питания жителей Республики Беларусь является необходимым для оценки и коррекции селенового статуса организма человека в различных экологических условиях проживания.

Данные о селеновом статусе организма человека дает определение содержания этого микроэлемента в биологических субстратах человека: цельной крови, плазме и сыворотке крови, волосах головы, грудном молоке кормящих матерей и т.д.

Для оценки и коррекции селенового статуса населения Республики Беларусь необходимо:

- изучить содержание селена в основных пищевых продуктах;
- определить селеновый статус людей, проживающих в регионах, отличающихся по экологическим условиям;
- провести коррекцию дефицита селена алиментарными факторами.

Работа по оценке и коррекции селенового статуса населения выполняется силами и средствами органов и учреждений Министерства здравоохранения, осуществляющих государственный и ведомственный санитарный надзор в Республике Беларусь в области обеспечения качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также клинических лабораторных служб ЛПО, СПК и др., в компетенцию которых входит диагностика, лечение и профилактика заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ.

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЕЛЕНА В ОСНОВНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Исходя из структуры потребления пищевых продуктов, характерной для населения Республики Беларусь, для проведения скрининговых исследований по содержанию в них селена используются наиболее значимые в питании населения продукты: молоко и молочная продукция, мясо, хлеб, овощи. Общий вклад перечисленных продуктов в структуре потребления составляет 85–90%.

Отбор проб пищевых продуктов производится в соответствии с нормативной документацией на каждый вид продукции

(СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для показателей безопасности» (утвержден и введен в действие приказом Госстандарта от 28 февраля 1997 г. № 43), СТБ 1053-98 «Радиационный контроль. Отбор проб пищевых продуктов. Общие требования» (утвержден и введен в действие приказом Госстандарта от 5 февраля 1998 г. № 3)).

Определение содержания селена в пищевых продуктах проводится методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и гидридной генерацией (МВИ. МН 1792-2002 «Методика выполнения измерений концентраций элементов в жидких пробах на спектрометре ARL 3410+», утвержденная постановлением Главного санитарного врача 16.09.2002 г. (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, № 120–1102, свидетельство № 253/2002)).

Метод основан на атомизации минерализованного образца в аргоновой плазме с последующей регистрацией атомных спектров эмиссионных длин волн. Минерализация образца осуществляется путем автоклавирования в смеси азотной кислоты и перекиси водорода.

Предел чувствительности метода — 0,2 мкг/кг.

Аппаратура, материалы, реактивы:

1. Автоклав аналитический марки АНКОН-АТ-2.
2. Вода дистиллированная, ГОСТ 66709-72.
3. Кислота азотная (HNO_3), ГОСТ 4461-67.
4. Кислота соляная (HCl), плотность — 1,19 г/см³, ГОСТ 3118-77.
5. Перекись водорода (H_2O_2) 30%, ГОСТ 177-77 (1 изм.).

Используемые реактивы должны быть квалификации ч.д.а. или х.ч.

Проведение испытания

Взвешивают примерно 2,0 г пищевого продукта и проводят его минерализацию в автоклаве в следующем режиме: при температуре 120° С — 1 ч, 150° С — 1 ч и 180° С — 1,5 ч в смеси концентрированной азотной кислоты и 30% перекиси водорода в соотношении 6:1 (соответственно). Раствор после полной минерализации образца должен быть прозрачным. Спектрометрическое определение селена (линия эмиссии — 196,09 нм) проводится по указанной выше

методике выполнения измерения. Юстирование спектрофотометра осуществляют по линии эмиссии аргона — 355,431 нм. Калибровка прибора выполняется по трем растворам с известными концентрациями селена, приготовленным из ГСО 6076-91.

Недостаток селена в основных продуктах питания дает основание для оценки селенового статуса организма человека. Суточная норма потребления селена организмом человека, рекомендованная экспертами ФАО/ВОЗ, составляет 50–200 мкг/сут. Адекватная доза поступления селена для взрослого населения Республики Беларусь (в соответствии с требованиями, установленными СанПиН 11-63 РБ-98) составляет 70 мкг/сут. Рекомендуемые дозы поступления селена для детского населения приведены в инструкции «Нормы физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии для различных групп детского населения Республики Беларусь», утвержденной заместителем министра здравоохранения Республики Беларусь 31.12.2002 г., регистрационный № 126–1102.

ОЦЕНКА СЕЛЕНОВОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Содержание селена в сыворотке крови, волосах здорового человека и грудном молоке кормящих матерей относительно постоянная величина, характерная для конкретного района проживания, зависящая от содержания селена в почвах, продуктах питания, экологических условий региона.

Оптимальное содержание селена в сыворотке крови взрослого человека — 120–130 мкг/л, что соответствует максимальной активности селензависимой глутатионпероксидазы тромбоцитов. Уровень селена в сыворотке крови повышается в пубертатном возрасте и уменьшается во время беременности.

В качестве критериев обеспеченности селеном приняты следующие значения содержания селена в сыворотке крови:

- 120–130 мкг/л — оптимальная обеспеченность;
- 90–120 мкг/л — субоптимальная обеспеченность;
- 70–90 мкг/л — легкая форма недостаточности;
- менее 70 мкг/л — глубокая недостаточность.

Данные по содержанию селена в волосах головы позволяют оценить относительную обеспеченность организма указанным микро-

элементом. По данным ВОЗ, интервалы оптимального содержания селена в волосах — 500–1500 мкг/кг.

Содержание селена в женском грудном молоке является критерием оценки селенового статуса кормящих матерей и индикатором обеспеченности селеном детского организма. Референсные значения содержания селена в женском грудном молоке, предлагаемые экспертами ВОЗ, равны 13–24 мкг/л.

Экологическая ситуация в стране обуславливается природными и физико-химическими факторами, антропогенным загрязнением почв, водных и воздушных бассейнов. Различают три степени напряженности экологической ситуации в республике: низкую, умеренную и высокую. Низкой степенью экологической напряженности характеризуется Витебская область, умеренной — Минская, Гродненская и Брестская, высокой — Гомельская и Могилевская области (Природная среда Беларуси. Под ред. В.Ф. Логинова. — Мн., 2002. — 437 с.). Обеспеченность селеном жителей Республики Беларусь связана с экологическими условиями регионов проживания. Данные о содержании селена в биосубстратах жителей различных регионов республики приведены в Приложении 1.

Исследования содержания селена в биологических субстратах человека

Исследования содержания селена в биологических субстратах человека проводят в группах наблюдения, включающих как детей, так и взрослое население в возрасте от 20 до 40 лет. Обследованный контингент людей не должен иметь клинически выраженных признаков заболеваний.

Образцы сыворотки крови, волос головы, грудного молока для определения селена отбираются в соответствии с методикой забора биологического материала, представленной в Приложении 2.

Определение содержания селена в биологических субстратах проводят спектрофлуориметрическим методом с 2,3-диаминонафталином.

Сущность метода определения селена заключается в минерализации образца путем автоклавирования в смеси концентрированной азотной кислоты и 30% перекиси водорода, восстановлении шестивалентного селена до четырехвалентного с образованием се-

ленистой кислоты. Взаимодействие данной кислоты с 2,3-диаминонафталином приводит к образованию комплекса — пиазселенола, величина флуоресценции которого пропорциональна содержанию селена в пробе. Предел чувствительности определения селена данным методом составляет 0,08 мкг/кг (мкг/дм³).

Аппаратура, материалы, реактивы:

– спектрофлуориметр ЭВ-3МА или другой аналогичной марки, λ возбуждения — 300–500 нм, λ эмиссии — 300–700 нм;

– автоклав аналитический марки АНКОН-АТ-2;

– весы лабораторные общего назначения с пределом взвешивания до 200 г, 2-й класс точности, ГОСТ 24104-88;

– электроплитка бытовая;

– баня водяная;

– колбы мерные, ГОСТ 1770-74;

– воронка делительная емкостью 100 см³, ГОСТ 2536-82;

– пипетки 2-го класса точности, ГОСТ 20992-74;

– пробирки химические с притертыми пробками, ГОСТ 20992-74;

– колбы конические на шлифах вместимостью 50, 100, 200 см³, ГОСТ 1770-74;

– воронки химические, ГОСТ 8613-75;

– цилиндры мерные вместимостью 50 и 100 см³, ГОСТ 1770-74;

– фильтры обеззоленные, ТУ 6-09-1678-77;

– бумага индикаторная универсальная, рН = 1–12, ТУ 6-09-1181-76;

– аммиак водный, плотность — 0,88 г/см³, ГОСТ 3760-76;

– вода дистиллированная, ГОСТ 66709-72;

– гексан (C₆H₁₄), ТУ 6-29-3375-78;

– 2,3-диаминонафталин (C₁₀H₁₀N₂), чистота — 98%;

– кислота азотная (HNO₃), ГОСТ 4461-67;

– кислота соляная (HCl), плотность — 1,19 г/см³, ГОСТ 3118-77;

– перекись водорода (H₂O₂) 30%, ГОСТ 177-77 (1 изм.);

– натрий селенистоокислый (Na₂SeO₃), ч. по ТУ 6-09-17209-88;

– референсный образец с известным содержанием селена (селенсодержащее куриное яйцо);

– тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (C₁₀H₁₂N₂Na₄O₈), ТУ 6-09-11-11298-79.

Используемые реактивы должны быть квалификации ч.д.а. или х.ч.

Приготовление растворов

0,1 М раствор: 1 см³ 36% соляной кислоты разбавляют в мерной колбе до 100 см³ дистиллированной водой.

6 М раствор: 51 см³ 36% соляной кислоты разбавляют в мерной колбе на 100 см³ дистиллированной водой.

Раствор аммиака: 25% раствор аммиака разбавляют дистиллированной водой 1:1.

Раствор тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты: 1,25 г соли растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

Раствор 2,3-диаминонафталина: 0,1 г реактива растворяют в 0,1 М соляной кислоте при встряхивании в течение 2–3 ч. Полученный раствор дважды экстрагируют в течение 2 мин гексаном (15–20 см³). Очищенный раствор фильтруют через фильтр средней плотности «белая лента». Хранят раствор не более 4 дней в склянке из темного стекла. Перед каждым употреблением раствор экстрагируют гексаном.

Основной стандартный раствор содержит 1 мкмоль селена в 1 см³. Растворяют 0,01729 г селенистокислого натрия в небольшом количестве 0,1 М соляной кислоты в мерной колбе на 100 см³ и доводят до метки соляной кислотой указанной концентрации. Раствор хранят в темноте не более 1 мес.

Рабочий стандартный раствор содержит 1 нмоль селена в 1 см³. В мерную колбу вместимостью 500 см³ вносят пипеткой 5 см³ основного стандартного раствора и доводят объем до метки 0,1 М раствором соляной кислоты. Раствор хранят не более суток.

Проведение испытания

Взвешивают около 0,2 г сыворотки крови, волос головы или 3–4 г грудного молока и переносят в реакционные камеры сжигания. Для построения калибровочной кривой в 5 реакционных камер сжигания вносят 0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6 см³ стандартного раствора селенистокислого натрия. Во все камеры сжигания добавляют по 6 см³ концентрированной азотной кислоты, 1 см³ перекиси водорода и оставляют при комнатной температуре на 12–18 ч. Затем реакционные камеры помещают в автоклавы аналитические и осуществляют минерализацию в температурном режиме: 160° С — 1 ч, 180° С — 1 ч. Раствор после озоления должен быть прозрачным.

Удаление следов азотной кислоты

Для удаления следов азотной кислоты добавляют к минерализату 1–2 капли перекиси водорода, выдерживают при температуре 150° С в течение 10 мин.

Восстановление Se^{6+} до Se^{4+}

К пробам добавляют по 1 см³ 6 М соляной кислоты и выдерживают при 110° С в течение 10 мин. После окончания нагревания в колбы вносят по 1 см³ дистиллированной воды и пробу охлаждают.

Конденсация селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином

В пробу с минерализатом добавляют 0,5 см³ раствора тетраэтриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и по 1 см³ разбавленного аммиака. Быстро доводят рН проб до 1–1,5 по универсальному индикатору, добавляя в случае необходимости по каплям разбавленный аммиак или 0,1 М раствор соляной кислоты. К полученным растворам приливают по 1 см³ раствора 2,3-диаминонафталина и выдерживают 30 мин при температуре 50° С, закрыв предварительно пробирки от попадания солнечного света. По окончании процесса пробы охлаждают до комнатной температуры и интенсивно экстрагируют 2,5 см³ гексана в течение 50–60 с.

Величину флуоресценции определяют при λ возбуждения — 376 нм, λ эмиссии — 510 нм. Калибровочный график строят в координатах: концентрация рабочего раствора селена — оптическая плотность. Точность анализа проверяют путем сравнения результатов определения селена с сертифицированным значением в стандартном образце (в качестве образцов сравнения используется селенсодержащее куриное яйцо, предварительно гомогенизированное и разлитое по аликвотам). Образцы сравнения хранятся в морозильной камере при температуре –8... –10° С и применяются по мере необходимости.

Обработка результатов

Массовую долю селена (X) в мкг/кг (или мкг/дм³) продукта вычисляют по формуле: $X = 79 \times C / a$, где C — концентрация селена в пробе (нмоль), определенная по калибровочной кривой, построенной в координатах: масса селена (нмоль) — оптическая плотность; 79 — атомный вес селена; a — масса навески образца, взятого на анализ (г), или жидких продуктов (см³).

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение трех определений. Относительное стандартное отклонение в интервале концентраций 1–600 мкг/кг составляет 10%.

Техника безопасности при проведении испытаний

При работе с вредными веществами следует руководствоваться требованиями техники безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.005-88 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» (утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 29.09.88. № 3388), ГОСТ 12.1.007-76 «Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» (утвержден Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 10 марта 1976 г. № 579).

Помещение, в котором проводится определение селена, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Все операции анализа выполняются в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты.

Работу с 2,3-диаминонафталином следует осуществлять только в резиновых перчатках.

В случае выявления дефицита селена в биологических материалах проводят профилактические мероприятия по коррекции селенового статуса организма человека.

КОРРЕКЦИЯ СЕЛЕНОВОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

К эффективным методам, повышающим селеновый статус организма человека, относятся:

- употребление функциональных продуктов питания, обогащенных селеном;
- применение БАД к пище, содержащих селен;
- применение селеносодержащих лекарственных средств.

Оценку селенового статуса после его коррекции алиментарными факторами проводят путем определения содержания селена в сыворотке крови спектрофлуориметрическим методом.

Приложение 1

**Селеновый статус жителей различных регионов
Республики Беларусь (2002–2004 гг.)**

| Область | Степень экологической напряженности | Сыворотка крови | | Волосы |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | | Содержание селена, мкг/л | Показатель обеспеченности селеном | Содержание селена, мкг/кг |
| Витебская | Низкая | 90–110 | Субоптимальная обеспеченность | 470–490 |
| Минская Гродненская Брестская | Умеренная | 80–90 | Легкая форма недостаточности | 440–460 |
| Могилевская Гомельская | Высокая | 70–80 | Легкая форма недостаточности | 420–440 |

**Унифицированная методика забора
проб биологического материала**

***Общие требования к взятию
и транспортировке биологического материала***

Общими требованиями к взятию и транспортировке биологического материала являются:

1. Соблюдение оптимальных сроков для взятия биологического материала на исследование.

2. Отбор проб биологического материала производится в клинических лабораториях или лечебно-профилактических учреждениях процедурными сестрами и фельдшерами-лаборантами.

3. Биологический материал для исследования должен быть взят в необходимом объеме (не менее 0,5 мл сыворотки крови) с обеспечением условий, исключающих его контаминацию ксенобиотиками.

4. Взятие биологического материала должно производиться строго до начала применения лекарств или БАД к пище, содержащих селен, или не ранее чем через 10–14 дней после их отмены.

5. Отобранный биологический материал должен быть промаркирован. В сопроводительном документе-направлении необходимо указать цель исследования, фамилию, имя, отчество, возраст пациента, показания к обследованию, дату взятия пробы, какое учреждение направляет материал.

Образцы биологического материала доставляются в аналитическую лабораторию в транспортных контейнерах (сыворотка крови, грудное молоко — в контейнерах с сухим льдом) лицами, прошедшими специальный инструктаж.

Контейнеры для транспортировки материала должны обеспечить герметичность, стерильность, целостность образцов.

В случае несоблюдения правил взятия и условий доставки биологического материала образцы не подлежат лабораторному исследованию. Об этом сообщается врачу, направившему биологический материал на исследование.

Для проведения скрининговых исследований по определению содержания селена в крови возможно использование остатков сыворотки крови клинических лабораторий ЛПО, СПК и др. при соблюдении условий их хранения и транспортировки.

Методика забора проб венозной крови и получения сыворотки

Взятие венозной крови производится натощак, в утренние часы.

При взятии крови следует соблюдать правила асептики и антисептики в соответствии с «Инструкцией по выполнению инъекций и внутривенных инфузий в условиях ЛПУ и на дому» № 40–9903 от 23.03.1999 г.

Дезинфекция и стерилизация оборудования проводится в соответствии с Приказом МЗ РБ «О проведении дезинфекции и стерилизации учреждениями здравоохранения» от 25.11.2002 г. № 165, Приказом МЗ РБ «О мерах по снижению заболеваемости вирусными гепатитами в Республике Беларусь» от 02.04.1993 г. № 66 и Приказом МЗ РБ «О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД» от 16.12.1998 г. № 351.

Венозная кровь, полученная без антикоагулянтов, собирается в центрифужные стеклянные пробирки объемом 10 мл, отстаивается в них при комнатной температуре (15–20° С) в течение 30 мин до полного образования сгустка. Затем образцы доставляются лаборантом в лабораторию для получения сыворотки крови.

Методика получения сыворотки крови

Оборудование:

1. Центрифужные стеклянные пробирки общим объемом 10–12 мл.
2. Стеклянные палочки или пастеровские пипетки с запаянными на конце капиллярами (для отделения сгустка).
3. Центрифуга лабораторная (до 3000 об./мин).

Отделение сыворотки крови от сгустка выполняют путем центрифугирования образцов при 3000 об./мин в течение 10 мин.

После центрифугирования сыворотку сливают во вторичные (транспортные) пробирки. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

До транспортировки образцы сыворотки крови могут храниться в пластиковых пробирках с крышками в замороженном состоянии при температуре –15... –20° С в течение 3–4 мес.

Методика забора проб волос головы

Пряди волос срезают в 2,0 см от корня с затылочной части головы. Масса стандартной навески волос составляет около 0,3 г. Подготовка проб к анализу сводится к промывке ацетоном 3 раза по 10 мин и бидистиллированной водой 1 раз с последующим высушиванием на воздухе. Подготовленные волосы помещаются в сухой, герметично закрывающийся маркированный флакон (пробирку, бюкс). В таком виде волосы могут храниться при комнатной температуре в течение нескольких лет.

Методика забора проб грудного молока

Общее правило при отборе проб грудного молока заключается в том, чтобы экстрагировать молоко из одной железы до ее полного опорожнения. После этого весь материал переправляется в местную лабораторию, где молоко гомогенизируется, затем делится на несколько порций. Ниже описан процесс отбора материала поэтапно.

1. Для сбора молока используется тщательно очищенный сосуд соответствующей формы.

2. Сосок и окружающий его участок кожи обрабатывают детским мылом с водой, ополаскивают дистиллированной водой и насухо вытирают чистыми бумажными салфетками.

3. Молоко экстрагируется из одной железы до полного или почти полного прекращения секреции обработанными руками матери или механическим отсосом. Это занимает 5–10 мин.

4. Для транспортировки в лабораторию материал переносится в заранее вымытый полиэтиленовый флакон.

5. Флакон помечают фломастером, проставляя соответствующий кодовый номер.

6. Аликвотную часть молока, равную примерно 20–30 мл, после перемешивания переливают в другой полиэтиленовый флакон и сразу помещают в морозильную камеру (–15... –20° С); при такой температуре материал можно хранить в течение 3–4 мес. Для проведения анализа пробу молока переводят в жидкую форму путем оттаивания, содержание селена в образцах определяют спектрофлуориметрическим методом.