

УДК 543.42
УДК 621.384.8

Н.М. БЕРДИНОВА, А.Н. БЫЧЕНКО, Н.В. ГУСЕВА, Д.А. ЖЕЛТОВ, Л.Н. КОРЖАВИНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО-СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

Институт ядерной физики НЯЦ РК, г. Алматы

Разработана методика выполнения измерений (МВИ) определения массовой доли двадцати химических элементов (металлов) в биологических объектах после предварительного кислотного микроволнового разложения методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС). Исследованы биообразцы животного (барана): мышечной ткани, внутренних органов, шерсти и крови. Определение массовой доли каждого из двадцати химических элементов выполняется в результате одного цикла измерения образца.

Разработанная МВИ предназначена для использования в аналитических лабораториях Госсанэпиднадзора, научно-исследовательских организациях, медицинских центрах, специализированных экологических учреждениях и в других организациях, заинтересованных в проведении медико-биологических и других исследований объектов экологического мониторинга и продовольственного сырья животного происхождения в районах с неблагоприятной экологической обстановкой.

Необходимость разработки методики была обусловлена, в первую очередь, отсутствием таковой в нормативной базе Республики Казахстан. Кроме этого, по сравнению с аналогичными разработками [1, 2] и др., методика предназначена, прежде всего, для исследования биообъектов животного происхождения на территориях с неблагоприятной экологической обстановкой, в т.ч. на бывших испытательных ядерных полигонах. В связи с планами Правительства РК по частичной передаче означенных территорий в сферу хозяйственной деятельности, в перечень определяемых элементов (далее – анализов) включены цезий, стронций и уран, определение которых в биологических образцах необходимо для решения задач комплексных экологических исследований обозначенных регионов.

Таблица 1. Выбранные аналиты, диапазон содержаний по МВИ и уравнения межэлементной коррекции

Аналит	Изотоп для измерения	Диапазон массовой доли аналигата по МВИ, мкг/г	Уравнение межэлементной коррекции
алюминий	²⁷ Al	2,00-100	
мышьяк	⁷⁵ As	0,02-5,00	-3,13*(mass77-0,847*(mass82-mass83))
барий	¹³⁸ Ba	0,05-50,0	-0,00093*mass139 - 0,00284*mass140
бериллий	⁹ Be	0,02-2,00	-
кадмий	¹¹⁴ Cd	0,02-2,00	-0,0272*mass118
cobальт	⁵⁹ Co	0,05-5,00	-
хром	⁵³ Cr	0,10-10,0	-
цезий	¹³⁷ Cs	0,02-10,0	-
медь	⁶⁵ Cu	0,40-50,0	-
марганец	⁵⁵ Mn	0,05-50,0	-
молибден	⁹⁸ Mo	0,05-5,00	-
никель	⁶⁰ Ni	0,05-5,00	-
свинец	²⁰⁶ Pb, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb	0,05-5,00	mass206 + mass207 + mass208
сурьма	¹²¹ Sb	0,02-5,00	-
селен	⁸² Se	0,10-5,00	-1,00783*mass83
стронций	⁸⁸ Sr	0,05-50,0	-
таллий	²⁰⁵ Tl	0,02-2,00	-
уран	²³⁵ U, ²³⁸ U	0,02-10,0	mass235+mass238
ванадий	⁵¹ V	1,00-10,0	-3,087*(mass53 - 0,113*mass52)
цинк	⁶⁸ Zn	0,50-300	-

Выбранный перечень элементов охватывает все практические аспекты анализа элементного состава биообъектов, включая санитарно-экологические задачи, и сделан с учётом элементного состава биообъектов [3], а также степени токсичности элементов. По функциональной роли биогенные элементы, необходимые организму для построения и жизнедеятельности клеток и органов, классифицируются как органогены (C, H, O, N, P, S – около 97 % массы организма), элементы электролитного фона (Na, K, Ca, Mg, Cl – 99% общего содержания металлов в организме) и микроэлементы (биологически активные атомы центров ферментов, гормонов и т.п.), к которым относятся, в основном, переходные металлы [3]. Органогены, элементы электролитного фона, а также железо, относятся к макроэлементам, содержание которых превышает 0,01% от массы организма. Содержание микроэлементов в организме составляет от 10^{-2} % до 10^{-5} %; ультрамикроэлементы имеют содержание ниже 10^{-5} %. Таким образом, учитывая элементный состав биообъектов, ограничения метода и назначение методики, в выбранный перечень анализов вошли микро- и ультрамикроэлементы – переходные и амфотерные металлы, в том числе тяжелые и токсичные элементы. В табл. 1 представлены: перечень анализов, интервалы их содержаний, изотопы для масс-спектрометрического измерения, а также уравнения межэлементной коррекции.

Метод ИСП-МС комбинирует использование индуктивно-связанной плазмы в качестве эффективного источника однозарядных ионов с квадрупольным масс-спектрометром, выступающим в роли масс-анализатора, и дискретно-динодным детектором для регистрации отдельных ионов и их потоков. Сфокусированные ионно-оптической системой ионы образца разделяются по отношению массы к заряду (m/z) масс-анализатором и регистрируются детектором. Число соударений ионов за единицу времени пропорционально количеству атомов анализа в исходном образце. Линейный диапазон зависимости интенсивности сигнала от концентрации на современных приборах превышает 6–8 десятичных порядков, позволяя в одном цикле сканирования масс-спектра регистрировать и единичные ионы, и ионные токи. Таким образом, современные приборы ИСП-МС позволяют одновременно количественно определять в пробах содержание десятков элементов на уровне от сотых долей нанограммов до сотен миллиграммов на литр в течение 1–3 минут (без учета времени пробоподготовки).

Для выполнения работ по разработке методики авторами использовался квадрупольный масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой ELAN 9000 производства PerkinElmer SCIEX (рис. 1) с диапазоном измеряемых масс от 2 а.е.м. до 270 а.е.м. Выполнены экспериментальные работы по выбору оптимальных инструментальных параметров масс-спектрометра. Критериями выбора являлись, прежде всего, максимальные чувствительность и экспрессность измерений, минимальные изобарные и полигатомные помехи, максимальный динамический диапазон системы детектирования. В результате были выбраны следующие параметры:

- мощность, подводимая к плазме: 1300 Вт;
- режим детектирования: DUAL (автоматическое использование аналогового и импульсного сегментов детектора);
- режим сканирования: прыжки по пикам (1 точка);
- общее время измерения: 60 с;
- поток газа распылителя: от 0,85 л/мин до 0,95 л/мин;

Ввиду специфики аргоновой плазмы как источника ионов, для анализов выбраны изотопы (см. Таблицу 1), позволяющие проводить измерения с высокой чувствительностью и минимальными полигатомными помехами от газовых компонентов аргоновой плазмы. Коррекция спектральных наложений выполняется программным обеспечением масс-спектрометра автоматически после ввода уравнений (Таблица 1) в программу аналитического метода.



Рис. 1. Квадрупольный масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой ELAN 9000

Подготовка биообразцов к анализу была осуществлена методом автоклавного кислотного разложения (мокрого «озоления»). Метод основан на кислотной минерализации пробы смесью азотной кислоты и пероксида водорода в герметично замкнутом объеме аналитического автоклава при воздействии повышенной температуры и давления. Нагрев реакционной смеси осуществляется микроволновым излучением с применением системы Speed Wave Four (Berghof, Германия) с выходной мощностью магнетрона 1450 Вт в автоклавах DAP-30+ (рис. 2) вместимостью 30 мл при температуре 210°C и давлении не более 8 МПа. Данные автоклавы обеспечивают высокую безопасность и «чистоту» процесса кислотного разложения проб биообразцов.

Для подбора оптимальных условий автоклавного разложения были использованы биообразцы животного (барана): шерсть, биоптаты мягких тканей (печень, мышцы) и кровь. При подготовке к автоклавированию и взятию навески, а также для усреднения пробы применены способы подготовки проб, рекомендованные в [2]. Для проб печени, мышц и шерсти навеска составила ($0,5000 \pm 0,0001$) г, для проб крови – ($1,06 \pm 0,01$) г.

Условия проведения микроволновой кислотной минерализации биообъектов выбраны с учетом документа [2], режим проведения процесса подобран экспериментально. Степень разбавления выщелатов выбрана методом добавок анализов в выщелаты на основании критерия минимума матричного влияния на анализы.

Для автоклавирования пробу помещали в автоклав (рис. 1), вносили постепенно 5 мл концентрированной азотной кислоты (марка ос.ч.) и 1,5 мл перекиси водорода (30%), затем выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре, после этого автоклав герметизировали и загружали в микроволновую печь. Микроволновое разложение проб осуществляли при 210 °C в течение получаса в соответствии с эксплуатационной документацией к микроволновой печи. По окончании процедуры разложения автоклавы извлекали и охлаждали до комнатной температуры. Качественно разложенная проба (выщелат) представляет собой бесцветный или желтоватый прозрачный раствор. Полученный выщелат количественно переносили в мерную пробирку вместимостью 15 см³, троекратно промывая вкладыш 1-2 миллилитрами бидистиллированной воды, и доводили до 15 мл, закрывали и перемешивали. Приготовленные таким образом пробы могут храниться в полипропиленовых пробирках с завинчивающейся крышкой вместимостью 30 мл, при температуре от 0 °C до 5 °C не более 72 часов. Для измерений отбирали аликвоту выщелата и разбавляли в 5 раз.

Для градуировки масс-спектрометра использован мультиэлементный СО состава химических элементов PerkinElmer PurePlus с относительной погрешностью аттестации не более 1 % ($P=0,95$). Программное обеспечение масс-спектрометра автоматически аппроксимирует и выполняет построение линейной градуировочной характеристики в координатах: значение интенсивности сигнала (в имп/с) – значение массовой доли аналита (в мкг/см³).

Расчет массовой доли химических элементов осуществляется программным обеспечением автоматически в методе количественного анализа (Quantitative Analysis) по введенным входным данным (масса навески, коэффициент разбавления).

В ходе разработки МВИ, в соответствии с алгоритмом, описанным в [5, 9.3], методом добавок показано отсутствие значимого влияния биоматрицы на результаты анализа биообразцов по всем анализам.

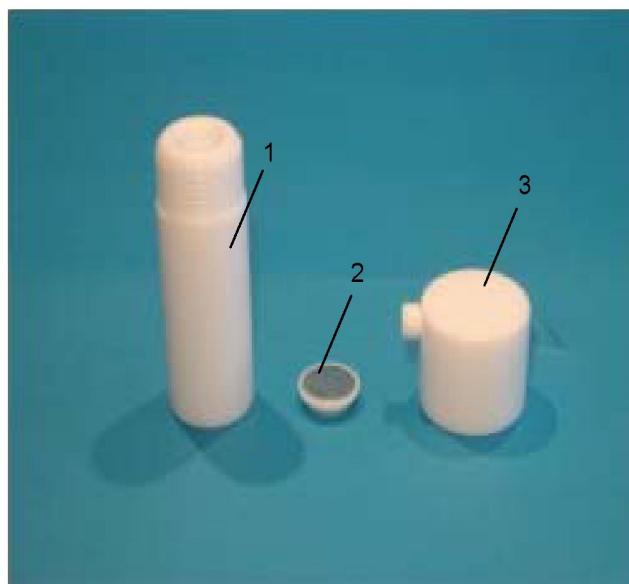


Рис. 2. Автоклав DAP-30+ (Berghof).

1 – реакционный сосуд.
2 – внутренняя крышка с предохранительным диском.
3 – резьбовая крышка.

Выполнена расчетно-экспериментальная оценка показателей качества методики (прецизионности, правильности и точности) с помощью набора образцов для оценивания в виде аттестованных смесей (АС) водных растворов химических элементов в соответствии с рекомендациями [5, 6]. АС представляют собой растворы, которые приготовлены путем разбавления раствором 1 моль/дм³ азотной кислоты государственных стандартных образцов (ГСО) состава растворов ионов анализаторов и аттестованы в соответствии с [6].

Выполнены экспериментальные работы по набору статистических данных (результатов измерений в регламентированных условиях) для оценки показателей качества. В результате статистической обработки полученных данных оценочного эксперимента установлены показатели качества методики (повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности) в виде линейных функций вида:

$$Y = aX + b, \quad (1)$$

где: Y – значение соответствующего показателя качества, мкг/г; X – измеренное значение массовой доли анализа в биообразце, мкг/г; a и b – эмпирические коэффициенты, найденные экспериментальным путем.

Для нижней границы содержаний анализаторов (см. Таблицу 1) приписанные характеристики повторяемости (при Р=0,95) измерений составили:

- показателя повторяемости – не более 15%;
- показателя воспроизводимости – не более 30%;
- показателя точности – не более 50%.

Также на основе полученных в результате метрологического исследования данных разработан алгоритм расчета суммарной стандартной и расширенной неопределенности (с коэффициентом охвата, равным 2) результата измерений в соответствии с положениями [7, 8], и, при необходимости, результат измерений массой доли анализа может быть представлен с расширенной неопределенностью.

В соответствии [9] разработана система оперативного контроля качества (прецизионности и точности) результатов анализа с использованием регламентируемых методикой аттестованных смесей химических элементов. Способ приготовления АС подробно описан в документе на МВИ.

Разработанная МВИ аттестована в соответствии с метрологическими правилами и нормами РК (свидетельство о метрологической аттестации № 12 от 26.03.2012, выдано АО АФ «НацЭкС») и может использоваться всеми заинтересованными пользователями масс-спектрометров с индуктивно-связанной плазмой типа Elan 9000 для решения широкого круга экологических и практических задач по анализу элементного состава биообъектов животного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания МУК 4.1.1483-03 Методы контроля. Химические факторы. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанный аргоновой плазмой. РФ, 2003 г. С 4-6.
2. Методические указания МУК 4.1.985-00. Зарегистрирован в РК ЮФ РПП. «КазИнСт» №022/10532 от 14.04.2006 г. С 6-11
3. Иванов В.В. [Текст] Экологическая геохимия элементов, Справочник в 6-ти кн., под ред. Э.К. Буренков, М: Недра, 1994 г.
4. Седых Э.М. и др. Микроволновое разложение биологических объектов для последующего атомно-абсорбционного и атомно-эмиссионного (с индуктивной плазмой) анализа. Журнал Аналитической Химии, том 46, вып.2, изд-во: Наука, 1991 г. С 292-299.
5. РМГ 61-2003 ГСОЕИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол N 23 от 22 мая 2003 г.). С13-23, 33-38.
6. СТ РК 2.10-2009 Смеси аттестованные. Порядок разработки, аттестации и применения. С 1-12.
7. РМГ 43-2001 Применение «Руководства по выражению неопределенности измерений». Приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 20 от 2 ноября 2001 г.) С 1-18.
8. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК, Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. 2-е издание, 2000. Пер. с англ. – С.-Петербург: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002 С 149 .
9. РМГ 76-2004 ГСОЕИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа. Приняты Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 20 от 2 ноября 2001 г.) С 1-18.

Бердинова Н.М., Быченко А.Н., Гусева Н.В., Желтов Д.А., Коржавина Л.Н.

ИНДУКТИВТІ БАЙЛАНЫСКАН ПЛАЗМАЛЫ МАСС-СПЕКТРМЕТРИЯ ӘДІСІМЕН
ЖАҢУАР ТЕКТЕСТЕРДІҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҰЛГІЛЕРІНДЕГІ ХИМИЯЛЫҚ ЭЛЕМЕНТТЕРДІҢ МАССА-
ЛЫҚ ҰЛЕСІН АНЫҚТАУ

ҚР ҰЯО Ядролық физика институты, Алматы қ.

Индуктивті байланыскан плазмалы масс-спектрометрия (ИБП МС) әдісімен алдын ала қышқыл микротолқынды жіктеуінен кейін жасалған биологиялық нысандардағы жиырма химиялық элементтердің (металдардың) массалық ұлесін анықтауды өлшеуді орындаудың әдістемесі (ӨОӘ) әзірленді. Малдың (көйдің) биоұлгілері зерттелді: бұлшықтетіндері, ішкі ағзалары, жүндөрі мен қандары. Жиырма химиялық элементтердің ербірінің массалық ұлесін анықтау үлгіні өлшеудің бір кезеңі нәтижесінде орындалады.

Әзірленген ӨОӘ экологиялық жағдайлары қолайсыз аудандарда экологиялық мониторинг нысандарына және жаңуар тектестердің азық-түлік шикізатына медициналық-биологиялық және тағы да басқа зерттеулер өткізуге мүдделі Мемсанәпидқадағалаудың аналитикалық зертханаларында, ғылыми-зерттеу ұйымдарында, медициналық орталықтарда, мамандандырылған экологиялық мекемелерде және де басқа ұйымдарда қолдануға арналған.

Berdinova N.M., Bychenko A.N., Guseva N.V., Zheltov D.A., Korzhavina L.N.

DETERMINATION OF CHEMICAL ELEMENTS MASS CONCENTRATION IN ANIMAL-ORIGIN
BIOLOGICAL SAMPLES BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-MASS SPECTROMETRY

Institute of Nuclear Physics NNC RK, Almaty

The method of measurements (MM) was developed for determination of mass concentration of twenty chemical elements (metals) in biological items by inductively coupled plasma-mass spectrometry method (ICP MS) following the preliminary acid microwave digestion. The biological samples of animal (sheep) were investigated: muscle tissue, internal organs, hair and blood. Determination of mass concentration of each of the twenty chemical elements is performed by a single cycle of sample measurement.

The developed MM is intended for application in analytical laboratories of "Gossanepidnadzor" authority, research organizations, medical centers, special environmental agencies and other organizations interested in conducting biomedical and other research of facilities being under environment monitoring and animal-origin food-stuff in areas with unfavorable environment.