

Т.С. Чмиленко, О.В. Сасвич, О.В. Туришева, Ф.О. Чмиленко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара***АТОМНО-ЕМІСІЙНЕ З ІНДУКТИВНО З'В'ЯЗАНОЮ ПЛАЗМОЮ
ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАЛІВ У КРОВІ ТА ЇЇ ФРАКЦІЯХ**

Розроблено методику визначення вмісту Zn, Ni і Fe в цільній крові і плазмі методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою з мікрохвильовою пробопідготовкою. Описано залежність часу пробопідготовки від концентрації окислювача і потужності мікрохвильового випромінювання.

Сучасний стан проблеми. Кров – складний об'єкт хімічного аналізу і складається з декількох фракцій, кожна з яких характеризується складним білковим складом [1;2]. Це визначає умови гомогенізації зразків для їхнього подальшого аналізу. Кров складається з наступних фракцій: еритроцитарна маса, плазма і сироватка, в кожній з яких містяться іони аналізованих металів. Оскільки свіжа кров швидко коагулює, то найчастіше аналізують одну з її складових [2–5]. На наш погляд, представляло інтерес підібрати оптимальні схеми аналізу кожної фракції крові і з'ясувати розподіл у них металів, вміст яких дуже малий. Тому, одним з ключових етапів аналізу є переведення проби в гомогенізований розчин, для подальшої реєстрації аналітичного сигналу методами мас-спектроскопії [6–9]. Відомо декілька способів підготовки проб крові при атомно-емісійному визначенні в ній хімічних елементів: розведення проби (використання модифікаторів матриці, таких як Тритон X-100 і ін.), повне її розкладання і ін. [9–11]. Застосування різних схем розведення проб крові і використання різних розчинів для її модифікації відрізняється не завжди відтворюваними результатами. Більшість дослідників проводять процес підготовки проб методами сухої або мокрої мінералізації [6; 7; 10–12]. Озолення біомедичних проб (450–800 °С, 4–8 годин) обумовлює втрати легколетючих речовин і вносить помилки до результатів аналізу [10;11]. Тому найбільш поширені методи мокрої мінералізації як у відкритих, так і закритих системах [13–17]. При проведенні мокрої мінералізації використовуються різні окислювачі або їхні суміші; концентровані: нітратна, хлорідна, фторідна, сірчана кислоти, пероксид водню і ін. У відкритих системах важливо враховувати умови проведення процесу, такі як температуру кипіння окислювача, оскільки при проведенні мінералізації можливі втрати легколетючих речовин. При проведенні мінералізації в закритих системах, з метою максимального руйнування органічних матриць проб і уникнення втрат легколетючих речовин, застосовуються такі додаткові чинники як тиск або дія різних фізичних полів [16–20]. Доцільно ефективно використання автоклавної техніки з резистивним або мікрохвильовим (МХ) нагрівом, які раціонально доповнюють один одного в лабораторіях широкого профілю. Деструкція і мінералізація проб здійснюється в герметично замкнутій реакційній ємності аналітичного автоклава при підвищених, у порівнянні з класичними відкритими системами, температурі і тиску [18–25].

Метод МХ мінералізації дозволяє підвищити експресність проведення аналізу, поліпшити його відтворюваність, характеризується відсутністю втрат проби і

простотою проведення. У літературі наведені різні схеми мінералізації окремих фракцій крові з використанням різних окислювачів і параметрів процесу [22–24].

Мета та завдання роботи. Метою роботи було вивчення і визначення оптимального окислювального середовища і параметрів мікрохвильової мінералізації крові та її фракцій при атомно-емісійному визначенні феруму, цинку та нікелю.

Матеріал та методики. Процес мінералізації проводили таким чином: відібрану пробу розкладали окислювальними реагентами у спеціальній посудині з радіопрозорого хімічно інертного матеріалу (скло, кварц, фторопласт), посудину герметично закривали, поміщали до мікрохвильової системи і нагрівали реакційну суміш у МХ полі.

Кількісне визначення хімічних елементів (феруму, цинку і ніколу) проводилося з використанням атомно-емісійного спектрометра з індуктивно зв'язаною аргонною плазмою «IRIS Intepid II XDL» (США). Робочі режими (табл. 1) були оптимізовані для того, щоб отримати найбільші співвідношення фону до сигналу. Емісійні лінії для кожного елемента вибиралися за величиною найбільш значущого аналітичного сигналу.

Таблиця 1

Умови атомно-емісійного визначення металів на спектрометрі
«IRIS Intepid II XDL»

Потужність	1300 Вт
Охолоджуючий потік	15 л/мин
Допоміжний потік	0,2 л/мин
Несучий потік	0,85 л/мин
Швидкість подачі проби	1,5 л/мин
Спектральні лінії, нм	Zn – 213,856
	Fe – 234,349
	Ni – 221,647

Найчастіше як окислювач при аналізі біомедичних об'єктів використовується нітратна кислота різної концентрації [18; 20–22]. Підготовлені зразки крові і плазми мінералізували в мікрохвильовому мінералізаторі MARS-5 за різними схемами. В якості окислювача органічної складової проб використовували концентровану нітратну кислоту, температура процесу 170 °С, потужність – 400 Вт, час варіювався в інтервалі 5–30 хв.

Для того, щоб вибрати оптимальні умови мінералізації було перевірено декілька комбінацій параметрів проведення цього процесу зі зміною об'єму HNO_3 (конц) від 0,1 до 10 мл та часом процесу від 5 до 30 хв.

Дані, отримані при проведенні мінералізації, за різними умовами співставляли з результатами, отриманими при мінералізації проб у герметичному реакторі (ГР). Пробопідготовка в герметичному реакторі: 2 мл проби і 2 мл концентрованої нітратної кислоти, мінералізували при температурі 170 °С протягом 30 хв [17].

Результати проведення серій експериментів наведено у таблицях 2 і 3.

Як видно з даних, наведених у таблиці 2 оптимальний час мікрохвильової мінералізації при 170 °С і потужності 400 Вт – 25 хвилин. При подальшому збільшенні часу процесу за цих умов величина вмісту металів не змінюється. Для порівняння були проведені експерименти з мінералізації проб плазми крові в герметичному реакторі (таблиця 3). Дані, отримані при проведенні мінералізації проб крові і

плазми двома методами (МХ і ГР) співставимі, але тривалість проведення мікрохвильової мінералізації в цілому значно менше.

Таблиця 2

Знайдено Zn, Ni и Fe у плазмі крові при мікрохвильовій мінералізації в MARS-5 (n=3, P=0,95)

№	Час, хв	Вміст металів, мкг/г		
		Zn	Ni	Fe
1	5	3,17±1,12	0,02±0,01	6,84±1,03
2	10	4,80±1,52	0,08±0,02	13,02±3,41
3	15	5,10±1,41	0,10±0,02	14,00±3,56
4	20	5,72±1,62	0,17±0,04	16,50±4,57
5	25	5,94±1,73	0,20±0,04	18,68±5,02
6	30	5,94±1,67	0,20±0,04	18,65±5,35

Таблиця 3

Вміст Zn, Ni и Fe у плазмі крові та цільній крові при мінералізації в герметичному реакторі (n=3, P=0,95)

№	Об'єкт аналізу	Вміст металів, мкг/г		
		Zn	Ni	Fe
1	Плазма	5,90±1,75	0,20±0,03	17,85±4,63
2		6,10±1,80	0,21±0,04	18,10±5,28
3	Кров	11,10±3,21	0,40±0,08	36,73±8,21
4		11,06±3,04	0,42±0,09	37,10±8,50

За отриманими даними була побудована діаграма залежності величини аналітичного сигналу від часу проведення процесу і концентрації нітратної кислоти (рис.1).

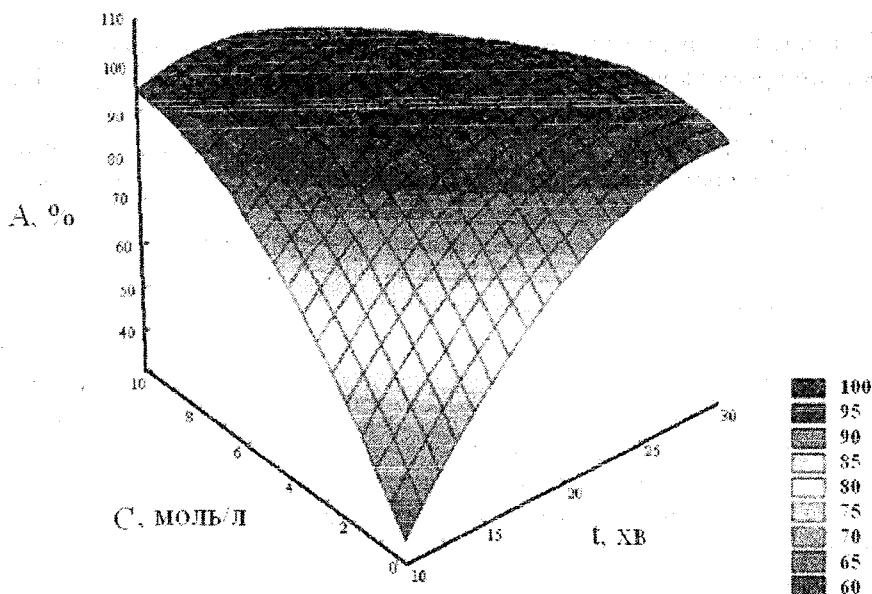


Рис.1. Діаграма залежності величини аналітичного сигналу (A) від часу проведення процесу (t) та концентрації нітратної кислоти (C, моль/л)

Як видно з рис. 1. оптимальні умови мікрохвильової мінералізації проб плазми крові наступні: використання 10 М нітратної кислоти протягом 25 хв.

За результатами проведених досліджень зразків крові і плазми запропанована наступна схема аналізу: відбір зразка → розділення фракцій → відбір аналізованої проби → мікрохвильова мінералізація → реєстрація аналітичного сигналу. Використання мікрохвильового мінералізатора MARS-5 дозволило скоротити загальний час аналізу в декілька разів.

Висновки. Визначено вміст феруму, цинку і нікелю у пробах крові і її плазми методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою.

Установлено оптимальні параметри мікрохвильової мінералізації проб крові і плазми: час 25 хв, температура 170 °С, потужність 400 Вт. Показано, що найефективнішим окислювачем є 10 М розчин нітратної кислоти; оптимальне співвідношення об'єму аналізованої проби і окислювача – 1:2 відповідно.

Запропонована схема мікрохвильової підготовки проб крові дозволила максимально перевести визначаємі елементи в гомогенізований розчин.

Бібліографічні посилання

1. Шабалин В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. – М., 2001. – 304 с.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В.Меньшикова. – М., 1987. – 378 с.
3. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н. Тица – М., 1997. – 942 с.
4. Комаров Ф.И. Биохимические исследования в клинике / Ф.И. Комаров, Б.Ф. Коровкин, В.В. Меньшиков. – Л., 1981. – 408 с.
5. Чмиленко Ф.О. Хімічні елементи і речовини в організмі людини – у нормі та в патології / Ф.О. Чмиленко, Ю.С. Сапа, Т.С. Чмиленко та ін. – Д., 2006. – 216 с.
6. Determination of iron, copper, zinc, rubidium, molybdenum, and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry / H. Vanhoe, C. Vandecasteele, J. Versieck, R. Dams / J. Anal Chem. – 1989. – Sep 1. – V. 61. – P.1851–1854.
7. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values / J. P. Gouille, L. Mahieu, J. Castermant, N. Neveu, L. Bonneau, G. Lainé, D. Bouige, C. Lacroix. – Forensic Sci Int. – 2005. – V.153(1). – P. 39–44.
8. Studies on some trace and minor elements in blood. A survey of the Kalpakkam (India) population. Part I: Standardization of analytical methods using ICP-MS and AAS / T. R. Mahalingam, S. Vijayalakshmi, R. K. Prabhu, A. Thiruvengadasami, C. K. Mathews, K. R. Shanmugasundaram // Biol Trace Elem Res. – 1997. – V. 57. – Issue 3. – P. 191–206.
9. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry / H. I. Afridi, T. G. Kazi, M. K. Jamali, G. H. Kazi, M. B. Arain, N. Jalbani, G. Q. Shar, R. A. Sarfaraz // Toxicol Ind Health. – 2006. – V. 22(9). – P. 381–393.
10. Trace element analysis in biological samples / In A. S. Prasad, H. L. Johnson, H. E. Sauberlich // Clinical Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements. – N. Y., 1982. – P 462–468.
11. A rugged and transferable method for determining blood cadmium, mercury, and lead with inductively coupled plasma-mass spectrometry / J. William McShane, R. Steven Pappas, Veronica Wilson-McElprang. – Spectrochimica Acta Part B, 2008. – V.63–Issue 6. – P. 638–644.
12. Determination of zinc in blood serum by electrothermal atomic absorption spectrometry with matrix modification / M. Accominotti, Y. Pegon, J. J. Vallon // Clinical Biochemistry. – 1988. – V. 173. – Issue 2. – P. 99–106.

13. A comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry with electrothermal atomic absorption spectrophotometry for the determination of trace elements in blood and urine from non occupationally exposed populations / M. A. White // *J Trace Elem Med Biol.* – 1999. – V. 13. – Issue (1–2). – P. 93–101.
14. **Malin E. Kylander, Dominik J. Weiss, Teresa Jeffries, Barry J. Coles.** Sample preparation procedures for accurate and precise isotope analysis of Pb in peat by multiple collector (MC)-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2004. – V. 19. – P. 1275 – 1277.
15. Ultra-trace analysis of platinum in human tissue samples. Rudolf Elisabeth, Hann Stefan, Stringeler Gerhard, Pieter Christian / *Anal. And Bioanal. Chem.* – 2005 – № 7. – P.1500–1506.
16. **Орлова В.А.** Современные возможности автоклавной химической пробоподготовки / В. А. Орлова, С. А. Шерстяникова, Ю. А. Карпов // *Заводская лаборатория.* – 1993. – № 9. – С.1–7.
17. Спектрофотометрические методы определения тяжелых металлов в объектах окружающей среды и биологическом материале: Практич. руководство для работников лабораторий санитарно-эпидемиолог. станций / Под. ред. М. Т. Дмитриева, Э.И. Грановского. – Алма-Ата, – 1986. – 56 с.
18. **Кубракова И.В.** Микроволновое окисление органических веществ азотной кислотой / И.В. Кубракова, А.А. Формановский, Т.Ф. Кудинова и др. // *Журн. аналит.химии.* – 1999. – Т.54, № 5. – С.524–530.
19. **Кузьмин Н.М.** Микроволновая пробоподготовка / Н.М. Кузьмин, И.В. Кубракова // *Журн. аналит. химии.* – 1996. – Т. 51, № 1. – С. 44–48.
20. **Чмиленко Т.С.** Эффективность различных методов подготовки проб при атомно-абсорбционном определении Купрума и Ферума в медико-биологических объектах / Т.С. Чмиленко, О.В. Сасвич, Ф.А. Чмиленко // *Вісник Дніпропетр. ун-ту. Хімія.* – 2007. – Вип. 13, № 10/2. – С. 34–38.
21. Microwave-assisted sample preparation and preconcentration for ETAAS Kubrakova I. / *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* – 1997. – V. 52. – Issue 9–10. – P. 1469–1481.
22. Pressurized microwave digestion of biological samples for metal determination. Isao Kojima, Tetsuo Uchida, Chuzo Iida // *Analytical Sciences.* – 1988. – V. 4, №.2. – P.211–214.
23. The rapid decomposition of biological materials by using a microwave acid digestion bomb. Stripp RA, Bogen DC // *J Anal Toxicol.* – 1989. – V. 13. – Issue 1. – P. 57–59.
24. Microwave sample-digestion procedure for determination of arsenic in moss samples using electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry./ Niemela M, Peramaki P, Piispanen J. // *Anal Bioanal Chem.* – 2003. – V. 375 – P.673–678.
25. A simple optimized microwave digestion method for multielement monitoring in mussel samples. Saavedra Y., González A., Fernández P., Blanco J. // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* – 2004. – V. 59. – Issue 4. – P. 533–541.

Надійшла до редколегії 19.01.09