

Н. Б. Иваненко, А. А. Иваненко, Е. Б. Носова, Н. Д. Соловьев

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕРИЛЛИЯ И НИКЕЛЯ В КРОВИ АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫМ МЕТОДОМ С ЭЛЕКТРОТЕРМИЧЕСКОЙ АТОМИЗАЦИЕЙ И ЗЕЕМАНОВСКОЙ МОДУЛЯЦИОННОЙ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ КОРРЕКЦИЕЙ ФОНА

Введение. В настоящее время в медицинской науке интенсивно развивается новое направление — биоэлементология. Биоэлементология изучает содержание, связи, взаимодействие химических элементов как в организме здорового человека, так и в предпатологических состояниях [1, 2].

Для оценки элементного статуса человека, токсического воздействия элементов на организм необходимы статистически достоверные методики определения элементов в различных биологических объектах. В настоящей работе мы поставили перед собой задачу создания аналитических методик определения содержания бериллия и никеля в крови. Выбор объекта исследования обусловлен абсолютной диагностической специфичностью и информативностью крови [3, 4]. Результаты анализа крови на содержание бериллия и никеля могут быть ценными для диагностики и предотвращения профзаболеваний при обследовании рабочих, контактирующих с соединениями этих элементов в производственных условиях.

Бериллий используют в сплавах с медью и никелем для увеличения их тепло- и электропроводности, он применяется в ядерных реакторах как наиболее эффективный замедлитель и отражатель нейтронов, производстве люминесцентных ламп. Бериллий является одним из компонентов ракетного топлива. В медицине применяется в рентгеновских установках, поскольку пропускает рентгеновские лучи в 17 раз лучше, чем алюминий. Физиологическая роль бериллия изучена недостаточно, однако известно, что бериллий может принимать участие в регуляции фосфорно-кальциевого обмена, поддержании иммунного статуса организма [3]. Однако повышенное содержание бериллия в пище способствует образованию фосфата бериллия и, как следствие, размягчению костной ткани (бериллиоз). Элиминация соединений бериллия из организма (особенно из органов лимфатической системы, где они аккумулируются) происходит чрезвычайно медленно, в течение более 10 лет.

Соединения никеля используются при изготовлении монет, различных сплавов, имплантантов. В плазме крови никель находится в основном в связанном состоянии с белками: α_2 -макроглобулин и α_1 -гликопротеин. Никель участвует в ферментативных процессах, окислении аскорбиновой кислоты, угнетает действие адреналина [5]. При повышенном содержании никеля в организме возрастает возбудимость центральной и вегетативной нервной системы, снижается иммунная защита, возможен отёк лёгких и мозга, повышается риск развития новообразований в лёгких, почках, коже. Карбонил никеля является канцерогеном. Данные о влиянии пониженного содержания никеля отсутствуют, однако, в экспериментах над животными показано, что значительный дефицит никеля вызывает их гибель [3].

Создание аналитических методик определения Be и Ni — трудная задача не только из-за сложного матричного состава крови (компоненты плазмы и взвешенные в ней

форменные элементы — эритроциты, тромбоциты, лейкоциты), но и из-за низкой концентрации этих элементов. По данным из разных источников, среднее содержание в крови здоровых людей составляет: для Ni 1,7–4,4 мкг/л [1], 1–50 мкг/л [3], 3–7 мкг/л [5], 1–28 мкг/л [6], 0,025–0,8 мкг/л [7]; для Be \leq 0,001 мкг/л [3], \leq 0,008–0,04 мкг/л [7]. Очевидно, что для определения этих элементов в биологических и природных объектах необходимы высокочувствительные методы анализа. В первую очередь это масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой ИСП-МС [7–9] и атомная абсорбция с электротермическим способом атомизации ААС-ЭТА [10–12]. Несмотря на то, что метод ААС-ЭТА широко распространён, доступен и востребован при определении различных элементов в клинико-диагностических лабораториях, работ по определению содержания никеля и бериллия в крови практически нет. В случае бериллия это можно объяснить пределами обнаружения (ПО) элемента для определения фоновых содержаний (ПО 0,008–0,06 мкг/л), хотя токсические содержания, превышающие фоновые на несколько порядков величины, можно уверенно определять в рамках метода. ПО никеля в приборах ААС-ЭТА (0,07–0,25 мкг/л) достаточен для надёжного его определения как в крови здоровых людей, так и в случае интоксикации соединениями этого элемента. К тому же при использовании атомно-абсорбционных спектрометров с высокоэффективной зеемановской коррекцией фона можно проводить прямой анализ крови (без разложения пробы) [13–15]. Такой подход не только сокращает время анализа (2–3 мин на одно элементопределение), минимизирует объём крови, необходимой для анализа (5–10 мкл на одно элементопределение), но и позволяет избежать появления значимых систематических погрешностей на стадии пробоподготовки.

Экспериментальная часть.

Приборы. Атомно-абсорбционный спектрометр МГА-915 с зеемановской модуляционной поляризационной коррекцией фона производства ООО «Люмэкс», Россия, Санкт-Петербург. Графитовые кюветы Массмана с интегрированной платформой Львова и без платформы. Одноканальные пипетки переменного объёма 5–50 мм³ (дозатор), погрешность измерения не более 5 %.

Реактивы. Водный раствор ионов бериллия и никеля 1 г/л ГСО (ЦИКВ), вода дистиллированная ГОСТ 6709-72, вода деионизированная, модификаторы — нитрат палладия 10 г/л (Merck), кислота азотная концентрированная ос.ч. ГОСТ 11125-84, нитрат аммония ос.ч. ТУ 6-09-292-75.

Анализируемые образцы. Гепаринизированные пробы крови были предоставлены токсикологической поликлиникой ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России. Пробы крови отбирали в утреннее время в положении сидя из локтевой вены. Для забора крови применялась вакуумная система (Vacutest[®], Vacutest КИМА, Арзенгранде, Италия).

Построение градуировочных характеристик. В атомизатор вводили поочерёдно 5, 10, 15, 20, 30, 40 мкл градуировочных водных растворов ионов бериллия и никеля с концентрацией 0,1 и 10 мкг/л соответственно. Измеряли аналитические сигналы ($n = 5$), проводя нагрев графитового атомизатора по оптимизированной температурно-временной программе.

Проведение измерений. Перед проведением измерений пробы крови разбавляли в 5 раз деионизированной водой. При определении бериллия в атомизатор с платформой Львова вводили 10 мкл разбавленной пробы. При определении никеля в атомизатор вместе с разбавленной пробой крови (20 мкл) вводили 10 мкл 2 % водного раствора нитрата аммония. Аналитические сигналы измеряли в соответствии с оптимизированной температурно-временной программой.

Результаты и их обсуждение. При разработке методик определения бериллия и никеля в крови без предварительной минерализации пробы были использованы основные принципы концепции STPF, предложенной Уолтером Славиным [16]: эффективная коррекция неселективного поглощения в варианте прямой зеемановской модуляционной поляризационной коррекции фона, реализованная в спектрометре МГА-915 [17]; оптимизация температурно-временной программы нагрева атомизатора; использование атомизаторов с платформой; химическая модификация; разбавление проб крови в 5 раз деионизированной водой. При определении бериллия применяли атомизатор с интегрированной платформой. При определении никеля — атомизатор без платформы, так как в данном случае использовали большую аликвотную порцию пробы крови (20 мкл), а также модификатор и проба не удерживалась на платформе. Из-за высокой температуры атомизации никеля для атомизатора продольного нагрева (2700–2800 °С) использование печей с платформой нежелательно по причине необходимости повышения температуры атомизации как минимум на 200 °С и увеличения времени атомизации [18].

Химическая модификация. При элементном анализе объектов сложного состава, к которым, безусловно, относится цельная кровь, возникают трудности, связанные с влиянием матричного состава пробы. Известно, что хлорид-ион является одним из основных мешающих компонентов при атомно-абсорбционном анализе с электротермической атомизацией [19]. Присутствие в матрице пробы высокой концентрации хлорида приводит, как правило, к снижению сигнала абсорбции ряда элементов из-за более высокой летучести хлоридов по сравнению с другими формами элементов. Цельная кровь содержит примерно 0,55 мас. % хлорида (0,9 мас. % хлорида натрия). Было показано, что присутствие в пробе 0,9 % NaCl значительно снижает аналитический сигнал абсорбции при определении никеля (при разбавлении проб в 5 раз) и практически не влияет при том же разбавлении в случае бериллия. Для устранения влияния матрицы на практике используют химическую модификацию поверхности атомизатора и самой пробы [18, 20, 21]. Было изучено действие модификаторов пробы с целью устранения мешающего влияния хлорид-иона. В представляемой работе использованы модификаторы: 2 % раствор нитрата аммония (NH_4NO_3) и 0,1 % раствор нитрата палладия ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$). Для выбора оптимального модификатора при определении никеля проводили измерение раствора, содержащего 0,2 % хлорида натрия и 20 мкг/л никеля, что соответствует пятикратно разбавленной крови. На рис. 1 показано действие модификаторов.

Оптимальной химической модификацией матрицы пробы при определении никеля оказалось введение в атомизатор 10 мкл 2 % раствора NH_4NO_3 , поскольку при его использовании происходит полное восстановление сигнала абсорбции никеля. Применение традиционного химического модификатора [22] в ААС-ЭТА нитрата палладия оказалось нежелательным из-за значительного загрязнения данного реактива соединениями никеля.

При определении бериллия использование модификаторов — NH_4NO_3 , $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, HNO_3 (2 % раствор) — не оказало заметного влияния на аналитический сигнал абсорбции, поэтому в дальнейшем опыт проводили без модификатора.

Оптимизация температурно-временных параметров процесса анализа. Для получения достоверных результатов в рамках метода ААС-ЭТА необходима оптимизация температурно-временной программы нагрева атомизатора. Стадия атомизации во многом определяет чувствительность определения элементов. Температура этой стадии должна быть оптимальной для полного перевода аналита в атомарное состояние. Оптимальная температура стадии атомизации элементов — это

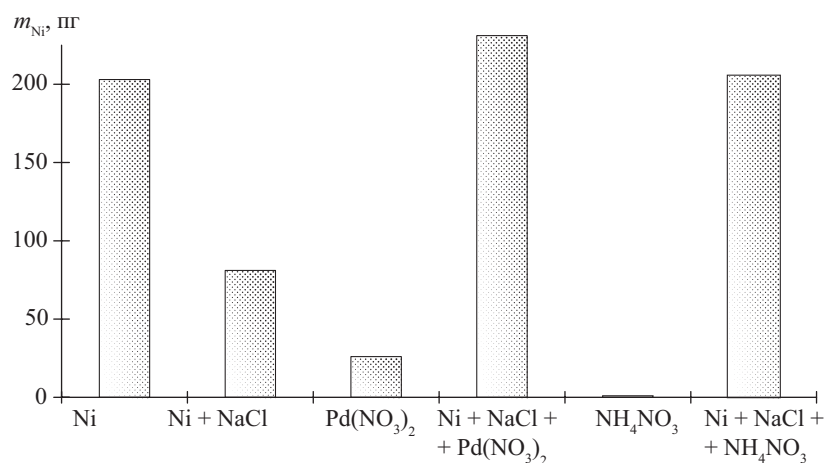


Рис. 1. Влияние химических модификаторов на определение Ni (20 мкл стандартного раствора Ni 10 мкг/л) в присутствии хлорид-иона (0,2 мас. %) для модификации в атомизатор вместе с пробой вводили 10 мкл раствора соответствующего модификатора; концентрация $Pd(NO_3)_2$ 1 мас. %; NH_4NO_3 2 мас. % ($n = 5$)

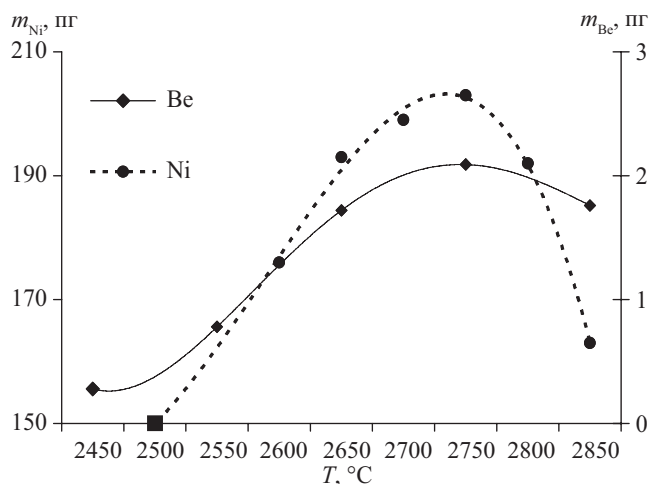


Рис. 2. Выбор оптимальной температуры атомизации при определении Be и Ni ($n = 5$): в атомизатор вводили 2 пг Be и 200 пг Ni

минимальная температура, обеспечивающая максимальный аналитический сигнал. При введении в атомизатор стандартных растворов никеля, бериллия концентрации 10 мкг/л, 0,2 мкг/л соответственно и пошаговом изменении температуры атомизации на 50 °С максимальные аналитические сигналы были получены для температур атомизации 2750 °С для бериллия и 2700 °С для никеля (рис. 2).

Стадия пиролиза температурно-временной программы во многом определяет правильность анализа, поэтому при разработке атомно-абсорбционных методик оптимизации температуры пиролиза уделяется большое внимание. Эта стадия позволяет перевести анализируемый элемент в удобную для атомизации форму. На этом этапе проходят различные термохимические реакции с участием компонентов пробы и модификаторов. В результате происходит частичное разложение составляющих матрицы и удаление летучих продуктов потоком аргона. Температура пиролиза выбирается

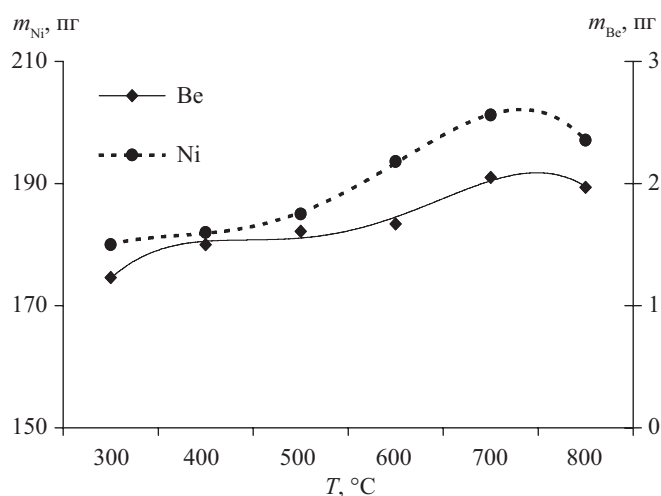


Рис. 3. Выбор оптимальной температуры пиролиза при определении Be и Ni ($n = 5$): в атомизатор вводили 2 пг Be и 200 пг Ni

достаточно высокой, чтобы максимально полно разложить матрицу, но при этом исключить потери определяемых элементов. Была изучена зависимость аналитического сигнала бериллия и никеля от температуры пиролиза и выбрана максимальная температура, обеспечивающая проведение определений без потерь элементов с минимальным относительным стандартным отклонением.

Таблица 1
Температурно-временная программа нагрева атомизатора

Стадия	Бериллий		Никель	
	t , с	T , °C	t , с	T , °C
Сушка	60	120	45	90
Пиролиз	20	700	20	800
Атомизация	2	2750	2,0	2700
Очистка	2	2800	2,0	2780
Пауза	90	—	90	—

На рис. 3 представлены зависимости, полученные при введении в атомизатор стандартных растворов никеля концентрации 10 мкг/л и бериллия концентрации 0,2 мкг/л при пошаговом изменении температуры пиролиза на 100 °C и времени пиролиза 20 с.

Оптимизированная по всем стадиям нагрева атомизатора температурно-временная программа представлена в табл. 1.

Таблица 2
Результаты анализа стандартного образца состава крови

Элемент	$C_{ср.}$, мкг/л	$C_{пасп.} \pm \Delta_{пасп.}$, мкг/л
Бериллий	$4,96 \pm 0,13$	$4,9 \pm 0,2$
Никель	$52,3 \pm 2,4$	$50,4 \pm 3,2$

Правильность разработанных методик проверяли с использованием анализа стандартного образца состава крови Seronorm™ Trace Elements Whole Blood L-3 (Sero, Норвегия). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Для оценки правильности и воспроизводимости методик во всём динамическом диапазоне от 0,5 до 25 мкг/л для Be и от 1 до 25 мкг/л для Ni проанализированы образцы разбавленной крови с добавками. Воспроизводимость (S_r) не превышала 12 %. Таким образом, только грамотная оптимизация температурно-временной программы нагрева атомизатора позволила получить достоверные результаты.

Анализ реальных образцов крови. По разработанным методикам были проанализированы реальные образцы крови. При определении бериллия использовали кровь двух крыс, которым вводили хлорид бериллия внутривенно. Концентрация бериллия составила $1,3 \pm 0,2$ мкг/л и $1,6 \pm 0,2$ мкг/л ($n = 5$, $P = 0,95$). Содержание

никеля определяли у здоровых людей ($n = 24$) и отдельно у электросварщиков ($n = 38$). Среднее содержание никеля в контрольной группе составило $4,2 \pm 1,5$ мкг/л ($P = 0,95$), у электросварщиков средняя концентрация оказалась значительно больше $10,4 \pm 3,2$ мкг/л ($P = 0,95$).

Разработанные методики могут быть использованы для оценки профессиональной нагрузки сотрудников, контактирующих с материалами, содержащими бериллий и никель.

Литература

1. Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине. М., 2003. 272 с.
2. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. В. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / под ред. А. В. Скального. СПб., 2008. 544 с.
3. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / под ред. Н. И. Калетиной. М., 2008. 1016 с.
4. Токсикологическая химия / под ред. Т. В. Плетенёвой. М., 2008. 512 с.
5. Элленхорн М. Дж. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека: в 2 т. М., 2003. Т. 2. 1036 с.
6. Клиническое руководство по лабораторным тестам / под ред. Н. У. Гица. М., 2003. 944 с.
7. Heitland P., Kuster H. D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS // J. Trace Elements in Medicine and Biology. 2006. Vol. 20. P. 253–262.
8. D'Ilio S., Violante N., Di Gregorio M. et al. Simultaneous quantification of 17 trace elements in blood by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system // Anal. Chim. Acta. 2006. Vol. 579. P. 202–208.
9. Bocca B., Alimonti A., Petrucci F. et al. Quantification of trace elements by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry in urine, serum, blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease // Spectrochim. Acta. (B). 2004. Vol. 59. P. 559–566.
10. Castroa M. A., Roblesa L. C., Lumbrerasa J. M. et al. Determination of beryllium by electrothermal atomic absorption spectrometry using tungsten surfaces and zirconium modifier // Anal. Chim. Acta. 2009. Vol. 636. P. 158–162.
11. Burguera J. L., Burguera M., Rondon C. et al. Determination of beryllium in natural and waste waters using on-line flow-injection preconcentration by precipitation: dissolution for electrothermal atomic absorption spectrometry // Talanta. 2000. Vol. 52. P. 27–37.
12. Olmedo P., Pla A., Hernandez A. F. et al. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2010. Vol. 659. P. 60–67.
13. Иваненко Н. Б., Иваненко А. А., Носова Е. Б., Соловьев Н. Д. Определение токсических и фоновых содержаний ртути в крови атомно-абсорбционным методом с электротермической атомизацией и зеемановской модуляционной поляризационной коррекцией фона // Вестн. С.-Петербурга. ун-та. Сер. 4: Физика, химия. 2010. Вып. 4. С. 97–104.
14. Solovyev N. D., Ivanenko N. B., Ivanenko A. A. Whole Blood Thallium Determination by GFAAS with High-Frequency Modulation Polarization Zeeman Effect Background Correction // Biol. Trace Elem. Res. Published online 5th October 2010. DOI 10.1007/s12011-010-8865-0.
15. Ганеев А. А., Иваненко Н. Б., Иваненко А. А. и др. Атомно-абсорбционное определение селена в крови, сыворотке крови и моче // Экологич. химия. 2006. Т. 15. Вып. 2. С. 124–129.
16. Slavin W., Manning D. C., Carnrick G. R. The stabilized temperature platform furnace // Atom. Spectr. 1981. Vol. 2. P. 137–145.
17. Ганеев А. А., Шолупов С. Е., Сляднев М. Н. Зеемановская модуляционная поляризационная спектрометрия как вариант атомно-абсорбционного анализа: возможности и ограничения // Журн. аналит. химии. 1996. Т. 51. С. 855–864.

18. *Пупышев А. А.* Атомно-абсорбционный спектральный анализ. М., 2009. 784 с.
19. *L'vov B. V.* Electrothermal atomization — the way toward absolute methods of atomic absorption analysis // *Spectrochimica Acta*. 1978. Vol. 338. P. 153–193.
20. *Ortner H. M., Bulska E., Rohr U.* et al. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry-mechanisms of action (A tutorial review) // *Spectrochim. Acta. (B)*. 2002. Vol. 57. P. 1835–1853.
21. *Обогрелова С. А., Пупышев А. А.* Действие неорганических химических модификаторов в электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (на примере As, Se и Te) // *Аналитика и контроль*. 2006. Т. 10. № 3–4. С. 233–266.
22. *Schlemmer G., Welz B.* Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry // *Spectrochim. Acta. (B)*. 1986. Vol. 41. N 11. P. 1157–1165.

Статья поступила в редакцию 25 декабря 2010 г.