https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-86-90
УДК 543.423

CC BY 4.0

Оригинальная статья/Research article

Влияние способа пробоподготовки образцов биологической природы на результаты определения тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектроскопии

Е. Н. Блохина[1], Н. В. Келус[2], В. С. Чучалин[2]*

1 – ООО «Центр Тест Сервис», 126626, Россия, г. Москва, ул. Староалексеевская, д. 5
2 – ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

***Контактное лицо:** Чучалин Владимир Сергеевич. **E-mail:** phtech@ssmu.ru

Статья получена: 24.05.2019. **Статья принята к печати:** 15.07.2019

Резюме

Введение. В статье показана значимость пробоподготовки для определения концентрации тяжелых металлов в биологических объектах методом атомно – эмиссионной спектроскопии микроволновой плазмой. Проведен сравнительный анализ результатов определения тяжелых металлов Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn разными способами прободготовки: с помощью твердофазной экстракции и микроволнового разложения.
Цель. Целью настоящей работы являлось сравнение методов и условий пробоподготовки биологических проб для определения содержания тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектрометрии микроволновой плазмы (МП-АЭС).
Материалы и методы. Объектом исследования для определения содержания тяжелых металлов являлась печень золотистых хомяков обоего пола массой 60–145 г вида Golden Syrian SPF категории, полученных из университета Федерального государственного научного учреждения «Федеральный исследовательский Центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук» (г. Новосибирск). Количественное определение тяжелых металлов в биологических пробах проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США).
Результаты и обсуждение. Сравнение содержания элементов в пробе, с использованием исследуемых пробоподготовок показало, что максимальное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается в случае применения метода микроволнового разложения. Наиболее полное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается при экстрагирование в течение 30 минут.
Заключение. Показано, что более высокие результаты регистрируются при использовании метода микроволнового разложения. Этот метод обеспечивает максимальное извлечение металлов, является наиболее точным, экспрессным и менее трудоемким, по сравнению с другими рассматриваемыми методами и подходит для определения большинства тяжелых металлов.

Ключевые слова: атомно-эмиссионный спектрометр, микроволновая подготовка, тяжелые металлы, твердофазная экстракция, биологические объекты.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. В. С. Чучалин спланировал эксперимент, Н. В. Келус и Е. Н. Блохина проводили анализ на оборудовании. Все авторы участвовали в обработке данных, обсуждении результатов и оформлении статьи. Работа выполнена инициативно, без поддержки программ и грантов.

Для цитирования: Блохина Е. Н., Келус Н. В., Чучалин В. С. Влияние способа пробоподготовки образцов биологической природы на результаты определения тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектроскопии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(3): 86–90.

Influence of the Method of Treatment of Samples of Biological Nature on the Results of Determination of Heavy Metals by Atomic Emission Spectroscopy

Elena N. Blokhina[1], Nadezhda V. Kelus[2], Vladimir S. Chuchalin[2]*

1 – LLC «Center test service», 5, Staroalekseevskaya str., Moscow, 126626, Russia
2 – Siberian State Medical University, 2, Moscowskiy Trakt, Tomsk, 634050, Russia

***Corresponding author:** Vladimir S. Chuchalin. **E-mail:** phtech@ssmu.ru

Received: 24.05.2019. **Accepted:** 15.07.2019

Abstract

Introduction. The article is devoted to the relevance of choosing sample preparation method for heavy metals concentration determination in biological sample by using atomic emission spectrometry. Much attention is given to compare 2 methods of sample preparation: solid-phase extraction and microwave decomposition. As the result of analysis of heavy metals Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn content using these sample preparation methods the following conclusions are drawn: maximum extraction of heavy metals is achieved by using microwave decomposition method.
Aim. The purpose of this work was to compare the methods and conditions for the sample preparation of biological samples for the determination of the content of heavy metals using atomic emission spectrometry.
Materials and methods. The object of the study to determine the content of heavy metals (Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn) was the liver of golden hamsters of both sexes weighing 60–145 g of the type Golden Syrian SPF category, obtained from the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Novosibirsk). Quantitative determination of heavy metals in biological samples was carried out on an Agilent 4100 atomic emission spectrometer with a microwave plasma (Agilent Technologies, USA).
Results and discussion. Comparison of the content of elements in the sample using the sample preparations under study showed that the maximum extraction of heavy metals from biological samples is achieved when using the method of microwave decomposition. The most complete extraction of heavy metals from biological samples is achieved by extraction within 30 minutes.
Conclusion. This method warrants the maximum metal extraction, is more accurate, rapid and less labor intensive compared to other methods considered, and is suitable for determining most heavy metals.

Keywords: atomic emission spectrometry, microwave decomposition, heavy metals, solid-phase extraction, biological sample.

Conflict of interest: no conflict of interest.

© Блохина Е. Н., Келус Н. В., Чучалин В. С., 2019
© Blokhina E. N., Kelus N. V., Chuchalin V. S., 2019

Contribution of the authors. Vladimir S. Chuchalin planned the experiment, Nadezhda V. Kelus and Elena N. Blokhina carried out an analysis on the equipment. All authors participated in data processing, discussion of the results and design of the article. The work was done initiatively, without the support of programs and grants.

For citation: Blokhina E. N., Kelus N. V., Chuchalin V. S. Influence of the method of treatment of samples of biological nature on the results of determination of heavy metals by atomic emission spectroscopy. *Drug development & registration*. 2019; 8(3): 86–90.

ВВЕДЕНИЕ

Пробоподготовка является важнейшим этапом процесса идентификации и количественного определения веществ в различных материалах и объектах. В химическом анализе применяются десятки методов пробоподготовки, учитывающих особенностями испытуемого объекта и природы определяемых веществ. Методы и условия процесса пробоподготовки призваны обеспечить полное удаление органических компонентов, постоянство определяемых элементов и перевод целевых веществ в форму, удобную для последующих операций анализа. Следует также отметить, что сложность и длительность способа пробоподготовки могут оказать решающее влияние на выбор и оценку эффективности того или иного метода аналитического контроля. Наиболее надежными и эффективными являются автоклавные методы пробоподготовки, предусматривающие использование систем герметично замкнутых реакционных объемов с микроволновым или резистивным нагревом. При этом наиболее часто используется автоклавная пробоподготовка в микроволновых сверхвысокочастотных (СВЧ) печах, такие системы широко используются в современных лабораториях при проведении рутинных анализов. Целью воздействия микроволнового излучения на этапе подготовки проб является получение требуемого компонента в форме, удобной для определения, чаще всего растворенной.

Известен альтернативный метод пробоподготовки, зарекомендовавший себя в других химических исследованиях, но мало изученный для биологических объектов – твердофазная экстракция (ТФЭ). Метод основан на экстрагировании веществ с их последующим отделением от биологического материала с использованием сорбционных колонок. Преимущества этого метода заключаются в получении достаточно очищенных от сопутствующих компонентов извлечений, простоте использования, сокращении времени при проведении серийных анализов

Содержание тяжелых металлов (токсичных элементов) в различных продуктах и лекарственных средствах природного происхождения является важнейшим критерием, определяющим уровень их безопасности и степени антропогенного влияния на сырье. Анализ микроколичеств химических элементов в биологических объектах представляет собой достаточно сложную задачу. В настоящее время существуют две основные группы аналитических методов для определения тяжелых металлов: электрохимические и спектрометрические методы [1–3].

Достоинствами атомно-спектроскопических методов – атомно-эмиссионного и атомно-абсорбционного – являются универсальность и экспрессность, что особенно важно при анализе большого числа проб. Метод пламенной фотометрии, благодаря простоте выполнения, экспрессности и доступности оборудования, достаточно широко используется в практике клинических лабораторий при определении щелочных металлов в биологических жидкостях.

Трудности использования метода атомно-эмиссионной спектроскопии связаны с большим разнообразием проб, наличием в них примесей, мешающих определению. Сопутствующие вещества, количество которых варьирует в широком диапазоне, влияют на процессы испарения и возбуждения атомов в источнике света и существенным образом искажают результаты определения. Поэтому пробоподготовка биологических объектов является критически важным этапом в определении тяжелых металлов [4–8].

Целью настоящей работы являлось сравнение условий и режима пробоподготовки биологических проб для определения содержания тяжелых металлов методом атомно-эмиссионной спектрометрии микроволновой плазмы (МП-АЭС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования для определения содержания тяжелых металлов (Fe, Zn, Rb, Cu, Al, Mn) являлась печень золотистых хомяков обоего пола массой 60–145 г вида Golden Syrian SPF категории, полученных из Федерального государственного научного учреждения «Федеральный исследовательский Центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской Академии наук» (г. Новосибирск). Животных выводили из эксперимента путем асфиксии углекислым газом, подвергали вскрытию и извлекали орган. Образцы печени хранили при –80 °С в морозильной камере [9]. Количественное определение тяжелых металлов в биологических пробах проводили на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США).

Подготовка биологических проб с помощью микроволновой пробоподготовки Speedware four SW-4. Описано множество методов пробопродготовки биологических проб для АЭС-анализа [10–12]. Мы использовали метод кислотного разложения в микроволоновой печи, который пригоден для большинства органических соединений и характеризуется высокой эффективностью. Кислотное разложение проб проводилось в системе Speedware four SW-4 (Berghof, США) с использованием азотной и соляной кислот. Измерение холостых растворов показало, что содержание анализируемых металлов находится ниже предела обнаружения метода.

Биологические пробы массой 0,3 г помещали во фторопластовые автоклавы, добавляли 5 мл азотной кислоты (х.ч.) и 1 мл соляной кислоты (х.ч.), автоклавы закрывали и помещали в систему, где их подвергали микроволновому и термическому воздействию в режиме, приведенном в таблице 1.

Таблица 1. Режим микроволновой пробоподготовки объектов

Table 1. Mode of microwave sample preparation of objects

№ шага программы	Температура, °С	Давление	Время роста, мин	Время удерживания, мин	Мощность микроволновой печи, % от максимальной (1450 Вт)
1	180	40	10	5	60
2	200	40	1	25	60
3	50	0	1	10	60
4	50	0	1	5	40
5	50	0	1	5	40

В результате пробоподготовки получены прозрачные растворы без посторонних включений, пригодные для анализа методом МП-АЭС. Растворы переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки водой очищенной. Полученный раствор анализировали на содержание тяжелых металлов на МП-АЭС.

Пробоподготовка биологических проб с помощью твердофазной экстракции. Пробу массой 0,3 г помещали в стакан, добавляли 5 мл воды очищенной и гомогенизировали с помощью диспергатора IKA basic ULTRA-TURRAX. Полученную взвесь переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 0,1 н азотной кислотой. Далее суспензию подвергали центрифугированию в разные сроки: сразу после гомогенизации и разведения, через каждые 30 минут после приготовления разведения. Для анализа отбирали 6 мл надосадочного раствора. Для активирования сорбента перед началом работы на ТФЭ через картридж (HF Bond Elut C18) пропускали 5 мл метанола, затем сорбент уравновешивали 5 мл воды. С помощью одноканального дозатора в картридж вносили количество пробы, составляющей 3/4 вместимости патрона. В процессе элюирования на сорбенте удерживаются органические примеси, а элюент собирается в емкость для слива. Полученный элюент анализировали на содержание тяжелых металлов на МП-АЭС.

Пробоподготовка биологических проб с помощью экстрагирования без использования сорбента. Пять проб одного образца массой 0,3 г помещали в стаканы, добавляли 5 мл воды первой степени чистоты и гомогенизировали с помощью диспергатора IKA basic ULTRA-TURRAX. Полученный раствор переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили до метки 0,1 н азотной кислотой. Первую пробу центрифугировали сразу, последующие пробы центрифугировали, через каждые 30 минут. Далее отбирали надосадочную жидкость и анализировали на МП-АЭС.

Определение содержания тяжелых металлов методом МП-АЭС. Концентрацию тяжелых металлов (Fe, Zn, Rb, Cu, Ni, Al, Mn) определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой Agilent 4100 (Agilent Technologies, США) при длине волны Fe (259,940 нм), Zn (213,857 нм), Rb (780,027 нм), Cu (324,754 нм), Al (396,152 нм), Mn (403,076 нм). Для построения градуировочного графика готовили 3 раствора стандартных концентраций. На аналитических весах в мерных колбах взвешивали ГСО определяемых элементов или смесь элементов (Bottle ICP-OES Wavecal conc), доводили до метки водой. Далее производили расчет концентрации ионов определяемых элементов в градуировочных растворах по формуле:

$$X_{гр} = \frac{C_{ст} \cdot m_{ст}}{V},$$

где $X_{гр}$ – концентрация ионов в градуировочном растворе, мг/л; $C_{ст}$ – концентрация соответствующего элемента в ГСО или многоэлементный калибровочный стандарт, мг/л; $m_{ст}$ – масса взвешенного стандарта, мг; V – объем колбы, мл.

Анализ градуировочных образцов и построение градуировочного графика осуществляли в ходе испытания аналитической серии. Содержание определяемых элементов в растворах после пробоподготовки проводили атомно-эмиссионным методом на спектрометре Agilent 4100 при определенных условиях (таблица 2).

В соответствии с руководством по эксплуатации спектрометра Agilent 4100 осуществляли подготовку прибора, выбор элементов, основных линий, задавали концентрации градуировочных растворов, навески проб, объемы проб, разведение. Число репликаций (параллельных определений для каждого раствора) составляло 3. Предел обнаружения элементов в анализируемом растворе для атомно-эмиссионного спектрометра Agilent 4100 составлял для Fe – 0,1 mg/kg; Zn – 0,5 mg/kg; Rb – 0, 5 mg/kg; Mn – 0,1 mg/kg; Cu – 0,1 mg/kg; Al – 0,1 mg/kg.

Таблица 2. Условия проведения атомно-эмиссионного анализа с микроволновой плазмой

Table 2. Conditions for the atomic emission analysis with microwave plasma

Параметр прибора	Настройка
Распылитель	Стеклянный концентрический
Камера распылителя	Однопроходная стеклянная циклоническая
Трубки для образцов	Оранжевые/зеленые
Трубки для отходов	Голубые/голубые
Время считывания	15 с
Давление в распылителе	160–220 кПа
Количество повторов	3
Время стабилизации	15 с
Коррекция фона	Автоматически

Идентификацию элементов проводили по наличию пиков на заданной длине волны, соответствующих определяемым элементам. Массовая доля определяемого элемента в образце для каждой навески рассчитывалась автоматически в программе MP Expert (как среднее арифметическое трех параллельных определений).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение содержания элементов в пробе, с использованием исследуемых пробоподготовок показало, что максимальное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается в случае применения метода микроволнового разложения (рисунок 1). Этот метод оказался наименее трудоемким и экспрессным (среднее время разложения пробы и переведения в раствор занимает 2 часа). Оптимальные условия разложения биологических проб в системе микроволновой пробоподготовки Speedware four SW-4 (Berghof, США) подбирали экспериментально (таблица 1). В результате пробоподготовки были получены прозрачные растворы без посторонних включений, пригодные для анализа методом МП-АЭС.

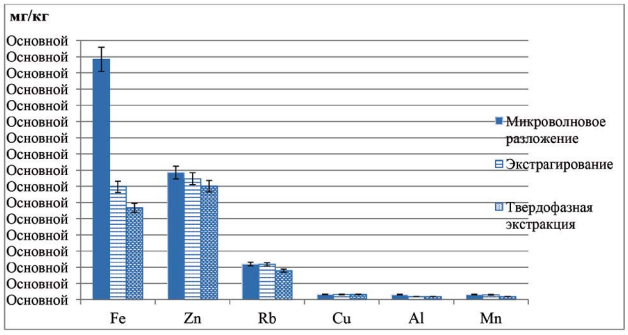

Рисунок 1. Определяемое содержание металлов в объекте исследования при различных способах пробоподготовки, (M±m, n=6)

Figure 1. The dependence of the metal content in the object of study on the method of sample preparation, (M±m, n=6)

При использовании методов твердофазной экстракции и экстракции степень извлечения ряда металлов оказалась ниже, чем при микроволновом разложении: в фильтрате, полученном без ультразвуковой обработки, содержалось существенно меньшее количество железа, алюминия и марганца, что свидетельствует об их частичном переходе в раствор (рисунок 1). Помимо неполной экстракции потеря отдельных элементов (особенно для алюминия и марганца) может быть связана с их задержкой на картридже, это видно при сравнении результатов определения концентрации тяжелых металлов в пробах после твердофазной экстракции и микроволнового разложения (рисунки 1 и 2). Так же следует отметить, что метод твердофазной экстракции достаточно трудоемок и требует более длительной пробоподготовки (измельчение пробы, растворение в кислоте, гомогенизация, фильтрование). Единственным элементом, полнота определения которого не связана с методом пробоподготовки, оказалась медь (рисунок 1).

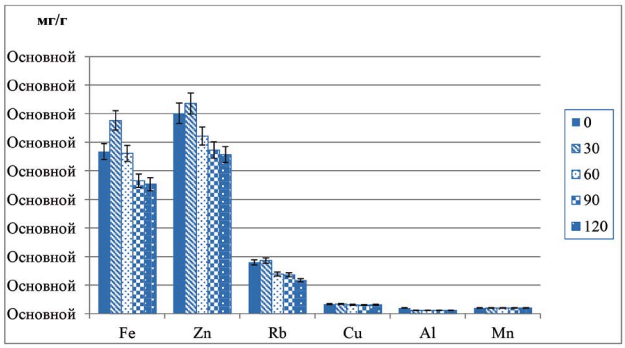

Рисунок 2. Влияние времени настаивания на содержания металлов в пробе при твердо фазной экстракции (M±m, n=6)

Figure 2. The effect of infusion time on the metal content in the sample during solid-phase extraction (M±m, n=6)

Наиболее полное извлечение тяжелых металлов из биологических проб достигается при экстрагирование в течение 30 минут (рисунок 2). Более продолжительное настаивание суспензии биоматериала в экстрагенте не сопровождалось ростом измеряемых показателей, как и при твердофазной экстракции (рисунок 2) так и при обычной экстракции (рисунок 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов измерения содержания тяжелых металлов в биологическом материале с использованием различных способов пробоподготовки свидетельствует, что наибольшее количество элементов более точно определяется при использовании метода микроволнового разложения. Этот метод обеспечивает максимальное извлечение металлов, является наиболее точным, экспрессным и менее трудоемким

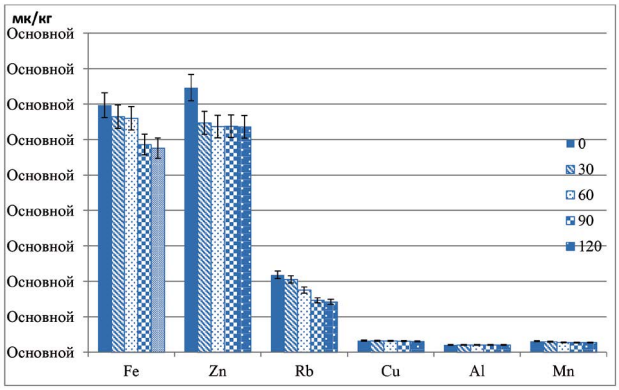

Рисунок 3. Влияние времени настаивания на содержания металлов в пробе при экстракции (M±m, n=6)

Figure 3. The effect of infusion time on the metal content in the sample during extraction (M±m, n=6)

по сравнению с другими рассмотренными методами. Метод микроволнового разложения при подготовке проб подходит для определения большинства тяжелых металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Штин С. Учебно-методический комплекс дисциплины «Особенности пробоотбора и пробоподготовки объектов окружающей среды». Екатеринбург: *Урал. гос. ун-т им. А. М. Горького.* 2008: 47.
2. Бок Р. Методы разложения в аналитической химии. М. 1984: 432.
3. Пупышев А. Пламенный и электротермический атомно-абсорбционный анализ. Екатеринбург: *Урал. гос. техн. ун-т.* 2008: 101.
4. Субботина Н. С., Дмитрук С. Е., Бабешина Л. Г., Келус Н. В., Никифоров Л. А., Носкова Г. Н., Тартынова М. И. Исследование исходного сырья и экстрактов на содержание тяжелых металлов. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.* 2010; 8 (3): 92–97.
5. Кингстон Г. М., Джесси Л. В. Пробоподготовка в микроволновых печах. М. 1991: 326.
6. Орлова В. А. Автоклавная пробоподготовка в химическом анализе. Дис. ... докт. хим. наук. М. 2001: 313.
7. Kelus N., Novikova Y., Chuchalin V., Blokhina E., Novikov D. Investigation of metal ions sorption of brown peat moss powder. *AIP Conference Proceedings*. 2017; 1899(1): 050002. https://doi.org/10.1063/1.5009865.
8. Келус Н. В. Технология сорбента на основе сфагнового мха. Дис. ... канд. фарм. наук. – Спб. 2013: 147.
9. Lezhava S. P., Pershina A. G., Kokova D. A. Opistorchisfelineus Infection and Harmful Metals Bio-Concentration. *A Pilot Study in Hamster Model.* 2015; 1085: 370–376.
10. Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M. Comparative Analysis of Sample Preparation Methods. *Anal. Chem.* 2012: 341–348.
11. Segstro E., Goltz D., Hall T. Eaching Sample Preparation in the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* 2000: 1486.
12. Steehler J. K. Sample preparation techniques in analytical chemistry. *J. Chem. Educ.* 2004: 162–199.

REFERENCES

1. Shtin S. Educational and methodical complex of discipline «Features of sampling and sample preparation of environmental objects»: Ekaterinburg: *Ural. state un-t them. A. M. Gorky.* 2008: 47 (In Russ.).
2. Bock R. Methods of decomposition in analytical chemistry. M. 1984: 432 (In Russ.).
3. Pupyshev A. Flame and electrothermal atomic absorption analysis. Ekaterinburg: *Ural. state tech. Univ.,* 2008: 101 (In Russ.).
4. Subbotina N. S., Dmitruk S. E., Babeshina L. G., Kelus N. V., Nikiforov L. A., Noskova G. N., Tartynova M. I. The study of raw materials and extracts on the content of heavy metals. *Bulletin of Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine.* 2010. 8(3): 92–97 (In Russ.).
5. Kingston G. M., Jesse L. V. Sample preparation in microwave ovens. M. 1991: 326 (In Russ.).
6. Orlova V. A. Autoclave sample preparation in chemical analysis. Dis. ... Dr. chemical sciences. M. 2001: 313 (In Russ.).
7. Kelus N., Novikova Y., Chuchalin V., Blokhina E., Novikov D. Investigation of metal ions sorption of brown peat moss powder. *AIP Conference Proceedings*. 2017; 1899(1): 050002. https://doi.org/10.1063/1.5009865.
8. Kelus N. V. Sorbent moss based sorbent technology. Dis. ... Cand. farm sciences. – SPb. 2013: 147(In Russ.).
9. Lezhava S. P., Pershina A. G., Kokova D. A. Opistorchisfelineus Infection and Harmful Metals Bio-Concentration. *A Pilot Study in Hamster Model.* 2015; 1085: 370–376.
10. Tulipani S., Llorach R., Urpi-Sarda M. Comparative Analysis of Sample Preparation Methods. *Anal. Chem.* 2012: 341–348.
11. Segstro E., Goltz D., Hall T. Eaching Sample Preparation in the Undergraduate Laboratory. *J. Chem. Educ.* 2000: 1486.
12. Steehler J. K. Sample preparation techniques in analytical chemistry. *J. Chem. Educ.* 2004: 162–199.