

УДК 502.22:504.5:614.1:54
© Коллектив авторов

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАНАДИЯ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

Т.С. Уланова, О.В. Гилева, Е.В. Стенно, Г.А. Вейхман

ФБУН “Федеральный научный центр медико–профилактических технологий управления рисками здоровью населения”, отдел химико-аналитических методов исследования, лаборатория элементного анализа, 614045, ул. Монастырская, 82, Пермь; эл. почта: veikhman_ga@mail.ru

Приведены параметры масс-спектрометрического определения ванадия в цельной крови. Оптимизированы условия подготовки проб крови, позволяющие снизить погрешность измерения и определять ванадий на уровне референтных концентраций. Правильность результатов подтверждена анализом стандартных образцов крови SERONORM L1, L2 и L3. Среднегрупповое содержание ванадия в цельной крови детей (n=80) г. Чусовой составило $1,29 \pm 0,45$ мкг/л. У взрослых жителей г. Чусовой (n=77) среднегрупповое содержание ванадия в цельной крови составило $1,63 \pm 0,25$ мкг/л.

Ключевые слова: масс-спектрометрический метод, индуктивно связанная плазма, столкновительная ячейка, внутренний стандарт, ванадий, цельная кровь.

ВВЕДЕНИЕ. Наиболее значимыми антропогенными источниками поступления ванадия называют предприятия чёрной и цветной металлургии, которые производят высокопрочные сплавы ванадия или используют его в производстве легированных сталей. В атмосферу Пермского края выбрасывается 24 вида веществ, относящихся к первому классу опасности. Большая часть из них (92%) приходится на долю диванадия пентоксида. Основная масса этого вещества поступает с выбросами ОАО “Чусовской металлургический завод” (крупнейший производитель ванадия и феррованадиевых сплавов в Европе), который находится в непосредственной близости к жилым кварталам города Чусовой, формируя риск для здоровья населения [1].

Содержание ванадия в крови человека, по разным литературным источникам варьирует в широком диапазоне концентраций и составляет $7,9 \pm 0,04$ мкг/л [2]; $0,06-0,87$ мкг/л [3]; $4,62 \pm 0,8$ мкг/л [4]; $0,016-0,11$ мкг/л [5]. Ванадий и его соединения оказывают токсическое воздействие на дыхательную систему, вызывая кашель, затрудненное дыхание, боль в горле, а также на сердечно-сосудистую систему, значительно увеличивая систолическое, диастолическое и/или среднее артериальное давление. Воздействие на печень и почки может сопровождаться гиперплазией, воспалением, фиброзом [6-8]. Таким образом, для выполнения работ по оценке риска здоровью населения актуальным становится точное и достоверное количественное определение ванадия в биосредах человека.

* - адресат для переписки

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАНАДИЯ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Количественное определение ванадия в образцах крови осуществляли на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7500cx (США) с октопольной ячейкой. Мощность генератора плазмы 1500 Вт. Для введения проб использовали двухканальную распылительную камеру Скотта. Скорость подачи образца в распылительную камеру составляла 0,4 мл/мин. Скорость работы детектора осуществлялась ≤ 100 мкс на 1 ион. Для настройки использовали раствор ${}^7\text{Li}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{89}\text{Y}$, и ${}^{205}\text{Tl}$ в 2% азотной кислоте с концентрацией 1 мкг/л для каждого элемента ("Tuning Solution", США). Использовался жидкий аргон высокой чистоты 99,99% (ТУ-2114-005-00204760-99). Максимальная скорость потока аргона составляла 20 л/мин, давление в канале подводки газа 700 ± 20 кПа, $T_{\text{плазмы}} = 8000-10000$ К. В качестве основного стандартного раствора использовали раствор, содержащий 27 элементов с концентрацией 10 мг/л в 5% водном растворе азотной кислоты (Multi-Element Calibration Standard-2A, США). Концентрации градуировочных растворов для определения ванадия составляли 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 мкг/л. Для приготовления растворов внутреннего стандарта (ВС) использовали комплексный стандартный раствор ${}^{209}\text{Bi}$, ${}^{73}\text{Ge}$, ${}^{115}\text{In}$, ${}^6\text{Li}$, ${}^{45}\text{Sc}$, ${}^{159}\text{Tb}$, ${}^{89}\text{Y}$ с концентрацией 10 мг/л в 5% водном растворе азотной кислоты (Internal Standard Mix, США). Для минерализации образцов и приготовления градуировочных растворов использовали азотную кислоту о.с.ч. 18-4, ГОСТ 11125-84 (Россия). Все растворы разбавляли деионизированной водой с удельным сопротивлением 18,2 МОм•см, очищенной в системе Milli-Q Integral ("Millipore SAS", Франция). Холостую пробу готовили аналогично рабочей. Для подготовки к анализу лабораторной посуды из стекла, тефлона, полипропилена использовали ультразвуковую мойку Elmasonic S 100H (Германия). Посуду выдерживали 20 мин в бидистиллированной воде при 55°C, далее 20 мин в водном растворе азотной кислоты (1:5) при 55°C, далее 20 мин в деионизированной воде при 55°C. Отбор проб крови осуществлялся из вены в вакуумные пробирки из полипропилена с напылением лития гепарина ("PUTH", КНР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Содержание ванадия в образцах крови определяли масс-спектрометрическим методом с индуктивно связанной аргоновой плазмой в соответствии с МУК 4.1.1483-03 [9]. Вместе с тем, при валидации методики мы столкнулись с некоторыми сложностями. Во-первых, возникла необходимость детализировать подготовку биоматериала к анализу, поскольку из-за высокого содержания углерода в матрице, он не полностью сгорает в плазме и осаждается на горелке, распылителе и на деталях ионной оптики. Микроволновый способ пробоподготовки позволяет радикально устранить влияние матрицы, хотя и значительно увеличивает время анализа. Для минерализации проб крови использовали микроволновую систему SW-4 ("Berghof", Германия). Разложение осуществляли в кварцевых вкладышах автоклавов DAQ-20, изготовленных из фторопласта TFM, рассчитанных на максимальное давление 100 бар и температуру 230°C. Для разложения 0,5 мл цельной крови в кварцевые вкладыши автоклавов добавляли 3,5 мл концентрированной азотной кислоты и 1 мл бидистиллированной воды. Разложение проводили при максимальной температуре 175°C и давлении 50 бар. Весь процесс разложения проводили в течение 45 мин. В методике [9] допускается и простое разбавление пробы крови 2-3% азотной кислотой непосредственно перед анализом. При использовании этого варианта подготовки проб к анализу нам не удалось достичь гомогенизации пробы, поэтому нами были внесены следующие

изменения: к пробе крови объёмом 0,1–0,2 мл добавляли 0,1 мл комплексного раствора внутреннего стандарта и 0,2–0,4 мл концентрированной азотной кислоты плотностью 1,415 г/см³. Пробирку с содержимым взбалтывали и оставляли на 3 ч. Затем доводили содержимое пробирки до 10 мл деионизованной водой и центрифугировали 10 мин со скоростью 2700–3000 об/мин на центрифуге ЦЛМН–Р10–01–“Элекон” (Россия). Способ кислотного растворения позволяет значительно сократить время, затрачиваемое на подготовку проб. Кроме того, авторы методики [9] предлагают радикальный способ разбавления пробы крови в 500 раз. При следовых содержаниях ванадия в пробе такое разбавление приводит к работе на нижних пределах обнаружения, характеризующейся максимальными погрешностями измерения.

Серьезные ограничения количественного определения ванадия в крови масс–спектрометрическим методом связаны с интерференциями, обусловленными присутствием в плазме однозарядных ионов ClO⁺, ArO⁺, ClN⁺, ArN⁺, SN⁺, SO⁺, ArC⁺ и др. [10]. Ранее для устранения интерференционных помех нами использовался расчётный метод с использованием поправочных коэффициентов, учитывающих вклад мешающих ионов. Эффективность такого метода не превышает 1–2 порядка и значительно уступает эффективности при использовании реакционных или столкновительных ячеек, что особенно значимо при определении следового содержания элемента [11]. В настоящее время для устранения полиатомных интерференций нами используется столкновительная ячейка с гелием в качестве газа–реактанта. Скорость потока гелия составляла 5 мл/мин. Кроме того, для определения ванадия потребовалось подобрать внутренний стандарт. По методике [9] для коррекции матричного эффекта в качестве внутреннего стандарта для всех элементов используется ¹¹⁵In. Известно, что атомная масса внутреннего стандарта должна быть как можно ближе к атомной массе определяемых элементов, что особенно значимо для количественного определения маленьких масс. На практике это означает, что при анализе элементов с лёгкими массами использование ¹¹⁵In может привести к завышению или занижению результата измерения. Так, для диапазона малых концентраций, в соответствии с [9], указывается погрешность измерения 40%, что не позволяет достоверно оценить содержание элемента в крови при низких уровнях концентраций. Вследствие близости атомных масс, в качестве внутреннего стандарта для определения ванадия ⁵¹V в крови нами был выбран германий ⁷²Ge.

Контроль результатов анализа проводили путём использования эталонного материала со структурой матрицы, близкой к изучаемому материалу. Для этой цели использовали стандартные образцы крови SERONORM L1 – L3 (“Sero AS, Billingstad”, Норвегия).

Рекомендуемые нами условия проведения анализа (пробоподготовка, столкновительная ячейка, внутренний стандарт) позволили снизить погрешности определения ванадия по методике [9], и составили для уровня L1 – 7,27%, для уровня L2 – 9,7%, для уровня L3 – 4,6% (таблица).

Таблица. Контроль правильности определения содержания ванадия с использованием стандартных образцов крови SERONORM L1-L3 (n=5), мкг/л.

L1		L2		L3	
Аттестовано 1,1 мкг/л		Аттестовано 5,9 мкг/л		Аттестовано 13,0 мкг/л	
Найдено	Δ, %	Найдено	Δ, %	Найдено	Δ, %
1,18	7,27	5,32	9,8	13,6	4,6

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАНАДИЯ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Использование отработанных нами условий проведения анализа по определению ванадия в крови было реализовано при обследовании детей трёх детских дошкольных учреждений (ДДУ), а также взрослых жителей г. Чусовой (группы наблюдения).

Биомедицинские исследования выполняли в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинской Декларации 1975 года с дополнениями 1983 года, с национальным стандартом РФ ГОСТ-Р 52379-2005.

От каждого законного представителя ребенка, включенного в выборку, получено письменное информированное согласие на добровольное участие в биомедицинском исследовании, выполненном специалистами ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» на базе мобильного консультативно-диагностического отделения и клиники в период 2010-2011 гг. Общее число обследованных составляет 241, из которых 125 детей и 116 взрослых пациентов.

Результаты представляли как среднее \pm ошибка средней в мкг/л. Статистическую достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия при $p \leq 0,05$ считали достоверно значимыми.

Среднегрупповое содержание ванадия в крови детей, посещающих ДДУ №6 (n=21), составляет $1,18 \pm 0,32$ мкг/л, ДДУ №12 (n=45) – $1,5 \pm 0,2$ мкг/л, ДДУ № 19 (n=14) – $1,2 \pm 0,3$ мкг/л. В качестве контрольной группы были обследованы дети, постоянно проживающие на условно чистой территории п. Сылва Пермского края (n=45), также посещающие детское дошкольное учреждение. Среднегрупповое содержание ванадия в крови группы контроля составляет $0,17 \pm 0,1$ мкг/л. В группе взрослых жителей г. Чусовой среднегрупповое содержание ванадия в крови (n=77) составило $1,63 \pm 0,25$ мкг/л. В качестве контрольной группы были обследованы взрослые п. Сылва (n=39), содержание ванадия в крови составило $0,95 \pm 0,1$ мкг/л. В качестве референтного уровня использовали данные Н. Тица [3], составляющие 0,06-0,87 мкг/л. Результаты исследования представлены на рисунке.

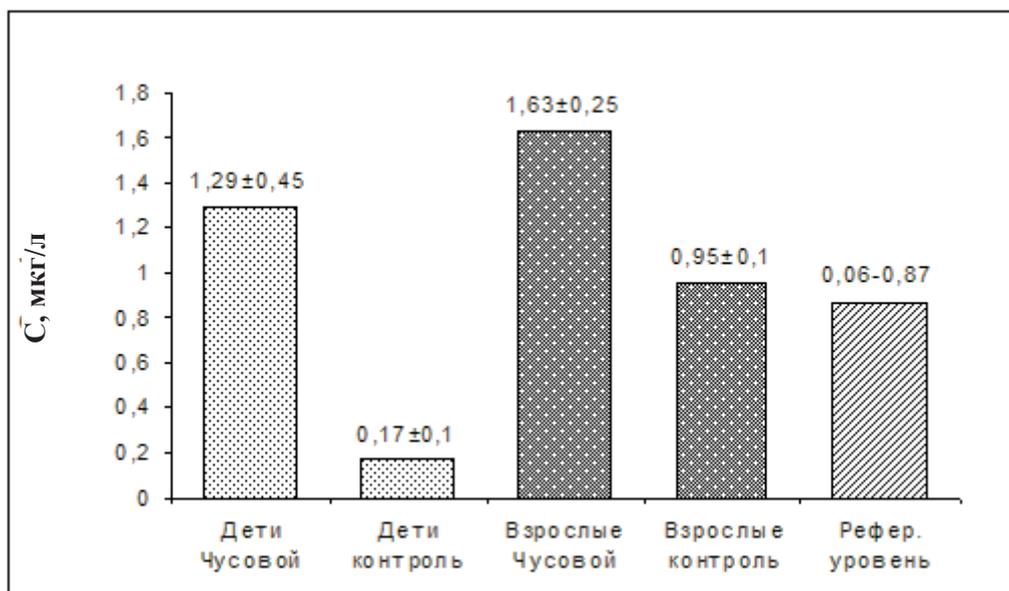


Рисунок.

Сравнение содержания ванадия в крови контрольных и исследуемых групп, мкг/л.

Обнаружено достоверное превышение концентраций ванадия в крови детей всех обследуемых групп г. Чусовой относительно контрольной группы ($p=0,0017$). Концентрация ванадия в крови взрослых жителей г. Чусовой достоверно превышает контроль ($p=0,0001$). Содержание ванадия в крови детей и взрослых г. Чусовой превышает максимальный референтный уровень по Н. Тицу. Таким образом, детское и взрослое население г. Чусовой подвержено риску негативного влияния выбросов металлургического предприятия.

ВЫВОДЫ.

1. Предложены модифицированные условия проведения масс-спектрометрического анализа образцов крови на содержание ванадия, позволяющие осуществлять контроль за состоянием здоровья населения, проживающего в зоне влияния металлургического производства.

2. Обнаружено достоверное превышение концентраций ванадия в крови детей и взрослых г. Чусовой по отношению к контрольным группам ($p=0,0017$ и $p=0,0001$ соответственно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Экологический доклад "Состояние и охрана окружающей среды Пермского края в 2007 году" [Электронный ресурс] / Управление по охране окружающей среды Министерства природных ресурсов Пермского края – URL: <http://www.permecology.ru/reports2007.php> (дата обращения: 04.03.2012).
2. *Лифшиц В.М., Сидельникова В.И.* (1998) Биохимические анализы в клинике, М.
3. *Тиц Н.У.* (2003) Клиническое руководство по лабораторным тестам (пер.с англ), Юнимед-пресс, М.
4. *Уланова Т.С.* (2006) Научно-методические основы химико-аналитического обеспечения гигиенических и медико-биологических исследований в экологии человека. Дисс. докт. биол. наук, НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды РАМН. Москва.
5. *Heitland P., Koster H.D.* (2006) *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **20**, 253-263.
6. *Korbecki J., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D.* (2012) *Acta Biochimica Polonica*, **59**(2), 195-200.
7. *Venkataraman B.V., Sudha S.* (2005) *Asian J. Exp. Sci.*, **19**(2), 127-134.
8. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR VANADIUM (2012) Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
9. Методы контроля. Химические факторы. (2003) Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой. МУК 4.1.1483-03. М.
10. *Пупышев А.А., Эпова Е.Н.* (2001) *Аналитика и контроль*, **5**(4), 335-369.
11. *Карандашев В.К., Туранов А.Н., Орлова Т.А., Лежнев А.Е., Носенко С.В., Золотарева Н.И., Москвина И.Р.* (2007) *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*, **73**(1), 12-22.

Поступила: 25. 04. 2013.

PECULIARITIES OF VANADIUM DETERMINATION IN WHOLE BLOOD BY ICP-MS

T.S. Ulanova, O.V. Gileva, E.V. Stenno, G.A. Veikhman

Federal State Scientific Institution “Federal Scientific Center for Medical and Prophylactic Health Risk Management Technologies”, Monasturskaya ul., 82, Perm, 614045 Russia;
e-mail: veikhman_ga@mail.ru

The parameters of vanadium determination by ICP-MS in whole blood are presented. Conditions for blood sample preparation to reduce measure errors and to determine vanadium at the reference concentration level were optimized. The accuracy of the results is confirmed by analysis of standard blood samples Seronorm L1, L2 and L3. Vanadium mean in whole blood for the group of children from the town of Chusovoy (n=80) was 1.29 ± 0.45 $\mu\text{g/L}$, and vanadium mean for grown-ups from the town of Chusovoy was 1.63 ± 0.25 $\mu\text{g/L}$.

Key words: inductively coupled plasma mass spectrometry, whole blood, reaction/collision cell, internal standard, vanadium.