

Электротермическое атомно-абсорбционное определение платины в биожидкостях

А.С. Алемасова, О.А. Пономаренко

Донецкий национальный университет, ул. Университетская, 24, 83001 Донецк, Украина; e-mail: alemasovaa@gmail.com

Поступила: 30 октября 2012 г / Принята к публикации: 27 декабря 2012 г.

Оптимизированы условия электротермического атомно-абсорбционного определения спектроскопического (ЭТААС) определения платины в биожидкостях пациентов, получающих противоопухолевые препараты на основе платины. Проведено термодинамическое моделирование высокотемпературных процессов пиролиза и атомизации платины из водного раствора хлорида платины(IV), а также из медицинского препарата карбоплатина и на основании его результатов выбрана температурно-временная программа нагрева атомизатора, а также показана возможность образования в газовой фазе термостойкого карбида PtC, что может служить одним из источников матричных помех.

Для устранения матричных помех и улучшения сходимости результатов предложено использовать химический модификатор диметилглиоксим в водно-спиртовом растворе. Дериватографическое исследование процесса пиролиза диметилглиоксимата платины и рентгенофазовое исследование промежуточных продуктов пиролиза свидетельствуют, что восстановление платины происходит при значительно более низкой температуре (300°C), чем для стандартного раствора. Разработана прямая (без кислотного вскрытия) ЭТААС методика определения платины в сыворотке крови, асцитической жидкости и суспензии лимфоцитов с пределом обнаружения 20 мкг/л и S_r не превышает 0.1.

A. ALEMASOVA, O. PONOMARENKO. ELECTROTHERMAL ATOMIC ABSORPTION DETERMINATION OF PLATINUM IN THE BIOLIQUIDS. – *The conditions for platinum electrothermal atomic absorption spectroscopic (ETAAS) determination in biological liquids of patients using platinum-based anticancer drugs were optimized. The thermodynamic simulation of high-temperature pyrolysis and atomization processes of platinum chloride(IV) water solutions and platinum-containing drug Carboplatin was carried out and time-temperature atomizer heating program was selected based on the simulation results. The possibility of heat-resistant carbide PtC formation in gaseous phase was shown to be a reason of the matrix interferences.*

Chemical modifier dimethylglyoxime as water-alcohol solution was proposed for the matrix interferences elimination and results reproducibility improvement. Platinum dimethylglyoximate pyrolysis process investigation made by derivatography method as well as the intermediate pyrolysis products investigation made by X-ray phase method showed that platinum reduction takes place at much more lower temperature (300°C) than for the standard solution.

The direct (without preliminary sample acid decomposition) ETAAS procedure of platinum determination in the blood serum, ascitic fluid and lymphocytes was developed, the detection limit was found to be 20 µg/L and S_r does not exceed 0.1.

Ключевые слова: электротермическая атомно-абсорбционная спектроскопия, платина, химические модификаторы, биожидкости

Key words: electrothermal atomic absorption spectrometry, platinum, chemical modifiers, bioliquids

Препараты на основе платины (например, карбоплатин, цисплатин) обладают эффективными радиопротекторными, противоопухолевыми свойствами и активно используются в медицинской практике [1].

Актуальной задачей является исследование распределения этих препаратов (по содержанию Pt) в субклеточных структурах опухолевых клеток и в биожидкостях людей, получающих эти препараты. Определение содержания Pt в биожидкостях методами атомно-абсорбционной спектроскопии всегда связано с кислотным вскрытием

пробы и разрушением органической матрицы, а также в ряде случаев с предварительным отделением и концентрированием платины [2-5].

Электротермическая атомно-абсорбционная спектроскопия (ЭТААС) обладает необходимой чувствительностью для определения следовых количеств Pt в биожидкостях человека, однако биологические матрицы значительно ухудшают предел обнаружения и показатели сходимости метода по сравнениями со стандартными растворами [6]. При анализе большого количества проб предварительное кислотное вскрытие зна-

чительно удлиняет анализ и увеличивает стоимость элемент-определения. Методы разделения и концентрирования не всегда могут быть использованы при анализе биопроб малого объема, например, суспензии лимфоцитов.

Целью данной работы являлся поиск эффективных химических модификаторов для устранения матричных влияний при ЭТААС определении Pt и разработка прямой (без предварительной пробоподготовки) методики определения Pt в биожидкостях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Аппаратура. Определение платины проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Сатурн-3 (ОКБА, г. Северодонецк, Украина) с электротермическим атомизатором Графит-2 и дейтериевым корректором фона. Дозирование пробы осуществлялось с использованием ручного дозатора P200 с точностью до $\pm 0.4\%$. Исследуемые растворы дозировали на графитовые платформы с пиропокрытием производств ОКБА (г. Северодонецк, Украина). Использовали графитовые трубки с пиропокрытием МПГ-6. Источником резонансного излучения служила лампа с полым катодом производства ООО «КОРТЭК» (г. Москва, Россия). Измерение интегральной абсорбционности платины проводили при ширине щели монохроматора 0.2 нм на резонансной длине волны 265.9 нм. В качестве инертного газа использовали аргон сорт "высший". Исследование термодеструкции комплексов Pt(IV) проводили на дериватографе Q-1500D системы Paulik-Paulik-Ergey в динамическом режиме в диапазоне температур 20 - 800°C в алундовых тиглях с крышкой в атмосфере воздуха. Химический состав продуктов пиролиза диметилглиоксима платины исследовали рентгенофазовым методом на рентгеновском дифрактометре ДРОН-2. Взвешивание сухих веществ осуществлялось на аналитических весах WA – 33.

Реагенты. Все реактивы, применяемые в работе, соответствовали квалификации "чда" и выше. Для приготовления стандартного раствора Pt(IV) использовали стандартный образец состава растворов ионов металлов (ФХИ НАН Украины, г. Одесса) с концентрацией платины 1.00 мг/мл. Использовался раствор препарата карбоплатина $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ производства Эбеве (Австрия), концентрация платины в котором составляла 5.255 мг/мл.

В качестве химических модификаторов использовали органические реагенты, образующие с ионами Pt(IV) комплексные соединения, – диметилглиоксим, дифенилкарбазон, диантипирилметан и хромазуrol S. Исходные растворы модификаторов с концентрацией 0.010 моль/л готовили растворением 0.0290 г диметилглиоксима, 0.0601 г дифенилкарбазона либо 0.0971 г диантипирилметана в этаноле и разбавляли этанолом до метки в мерной колбе объемом 25 мл. Раствор

хромазуrola S (чда) готовили растворением навески 0.1511 г в воде и разбавляли водой до метки в мерной колбе объемом 25.00 мл. Во всех растворах, которые дозировали в графитовую печь, концентрация модификаторов была на порядок ниже и составляли 0.001 моль/л.

Объекты исследования. Исследование эффективности химических модификаторов при ЭТААС определении платины проводили на модельном объекте – сыворотке свиной крови, которую получали центрифугированием цельной свиной крови при 3000 об/мин в течение 15 мин. Биожидкости пациентов, получающих препарат карбоплатин, были представлены Донецким областным противоопухолевым центром. Сыворотку крови пациентов получали аналогичным образом. Асцитическую жидкость получали пунктированием брюшной полости пациентов.

Для выделения суспензии лимфоцитов из человеческой крови отбирали 10 мл крови из локтевой вены, помещали в пробирку, содержащую гепарин, отстаивали в течение 40-60 мин при комнатной температуре до четкого разделения эритроцитов и плазмы. В центрифужную пробирку наливали 2-3 мл концентрированного раствора CsCl для создания градиента плотности, на него наслаивали 4-6 мл отстоявшейся плазмы и верхний слой эритроцитов. Соотношение объемов градиент:плазма находилось в диапазоне от 1:2 до 1:4.

Пробирки центрифугировали в течение 40 мин при 1500-1800 об/мин при температуре 20°C. В процессе центрифугирования эритроциты и гранулоциты "проваливались" в градиент и оседали на дно пробирки. На верхней границе градиента образовывалось рыхлое кольцо беловатого цвета, состоящее в основном из лимфоцитов с примесью моноцитов. Над слоем лимфоцитов находилась плазма. Суспензию лимфоцитов отбирали в сухую коническую центрифужную пробирку.

Все биожидкости хранились в герметичных пластиковых контейнерах при температуре 2-8°C не более суток. Перед их дозированием в графитовую печь пробы выдерживали при комнатной температуре в течение часа.

Методика эксперимента

Чувствительность ЭТААС определения платины оценивали по величине характеристической массы m_0 (масса аналита, которая обеспечивает 1% поглощения или абсорбционность $A=0.0044$) [7]. Для определения значения m_0 в мерные пробирки вместимостью 10 мл добавляли аликвоты стандартного раствора Pt(IV) с тем, чтобы после разбавления до метки концентрация Pt(IV) находилась в диапазоне 50-400 мкг/л, добавляли 0.60 мл 0.010 М спиртовых или водных растворов модификаторов, вносили 2.00 мл исследуемой биожидкости (сыворотки крови человека или свиной, асцитической жидкости, суспензии лимфоцитов), разбавляли водой до 6 мл и тщательно перемешивали. Параллельно готовили раствор

холостой пробы без платины. Аликвоту 20 мкл полученных растворов дозировали на платформу с пиролитическим покрытием, расположенную внутри графитовой печи, и проводили нагрев атомизатора по четырехстадийной программе: сушка, пиролиз, атомизация и очистка печи. На стадии сушки температура была 105°C (30 с); очистку проводили при 2900°C в течение 3 с. Оптимальные температуры на стадии атомизации и пиролиза выбирали по результатам термодинамического моделирования высокотемпературных процессов пиролиза и атомизации для конкретного объекта, а также исходя из экспериментальных кривых пиролиза и атомизации. На стадии атомизации отключали поток аргона во внутренней полости графитовой печи. Регистрировали величину интегральной абсорбционности платины и рассчитывали значение характеристической массы m_0 по формуле

$$m_0 = \frac{C \cdot V \cdot 0.0044}{A},$$

где C – концентрация платины в дозируемом растворе; V – объем дозируемого раствора; A – значение интегральной абсорбционности.

Аналогичная методика использовалась и при определении m_0 в растворах, не содержащих биожидкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Прогнозировать матричные помехи и температуры отдельных стадий нагрева атомизатора при ЭТААС определении платины возможно с использованием термодинамического моделирования термохимических процессов в графитовой печи, которое было проведено с использованием программы HSC CHEMISTRY 4.0. Результаты моделирования для стандартного раствора H_2PtCl_6 , а также для медицинского препарата карбоплатина $C_6H_{12}N_2O_4Pt$ представлены графически в виде зависимости количества различных форм платины (в кмольях) в конденсированной и газовой фазах в условной аналитической зоне (рис. 1 и 2).

Из данных рис. 1 и 2 видно, что процесс образования свободных атомов Pt для стандартного раствора и Pt-содержащего препарата различаются незначительно. Атомный пар платины образуется при испарении конденсированной восстановленной платины. Максимально допустимая температура пиролиза при испарении стандартного раствора составляет 1700°C, для карбоплатина она несколько ниже – 1500°C, что согласуется с экспериментально найденными из кривых пиролиза температурами (1750°C для стандартного раствора Pt(IV) и 1580°C для карбоплатина).

Учитывая экспериментальные данные и результаты термодинамического моделирования, а также необходимость максимально отогнать сложную органическую матрицу биожидкостей, оптимальная температурно-временная програм-

ма нагрева атомизатора на стадии пиролиза включала плавный подъем температуры до 900°C за время 30 с; выдерживание при 900°C в течение 20 с и последующий плавный подъем температуры до 1800°C за 20 с.

Из данных рис. 1 и 2 видно, что в температурном интервале 1800-2500°C в конденсированной фазе возможно образование термостойкого карбида платины PtC (температура разложения свыше 2600°C [8]), доля которого, вероятно, будет возрастать для проб, содержащих большое количество углерода, что приведет к снижению доли атомных паров платины и к уменьшению аналитического сигнала.

Экспериментально найденные значения характеристической массы m_0 и относительного стандартного отклонения S_r результатов измерения абсорбционности Pt в оптимальных условиях для стандартного раствора и растворов исследованных биожидкостей приведены в табл. 1.

Полученное значение характеристической массы для стандартного раствора близко к известному 56 пг [9]. Матрицы всех исследованных биожидкостей ухудшают чувствительность ЭТААС определения платины в 1.5-2 раза. При этом наблюдается значительное ухудшение сходимости результатов. Устранить или уменьшить негативное влияние матрицы можно, работая в условиях концепции температурно стабилизированной печи с платформой, одним из компонентов которой является использование химических модификаторов [10].

Ранее при ЭТААС определении Pt в биологических пробах использовали химические модификаторы смесь $(NH_4)_2H_2EDTA+NH_3+NH_4H_2PO_4$ [11], аммиак [12], сульфат меди [13]. Для устранения негативного влияния матрицы нами была исследована эффективность органических комплексообразующих модификаторов, которые могут образовывать с ионами платиновых металлов (и в частности с ионами Pt(IV)) комплексные соединения в растворах – диметилглиоксим [14], хромазуол S [15], дифенилкарбазон [16] и диантипирилметан [17].

Эффективность модификаторов оценивали по их способности увеличивать чувствительность, улучшать сходимость результатов и устранять депрессирующее влияние модельной матрицы сыворотки свиной крови. Для количественной оценки степени изменения чувствительности использовали отношения характеристических масс платины в сыворотке без модификатора m_0^M и в его присутствии m_0^M .

Степень устранения матричного влияния оценивали по отношению характеристических масс платины в стандартном растворе m_0^{CT} и в сыворотке в присутствии модификатора m_0^M . Изменение сходимости результатов оценивали по отношению величин относительного стандартного отклонения для сыворотки без модификатора S_r и в его присутствии S_r^M .

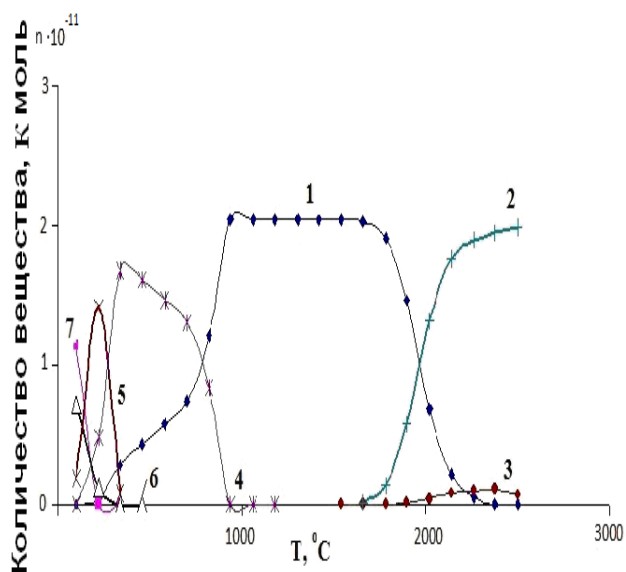


Рис. 1. Результаты термодинамического моделирования процесса атомизации платины из стандартного раствора: 1 – Pt_к; 2 – Pt_г; 3 – PtC_г; 4 – PtCl_к; 5 – PtCl_{2к}; 6 – PtCl_{3к}; 7 – PtCl_{4к}; к – конденсированная фаза; г – газовая фаза атомизатора

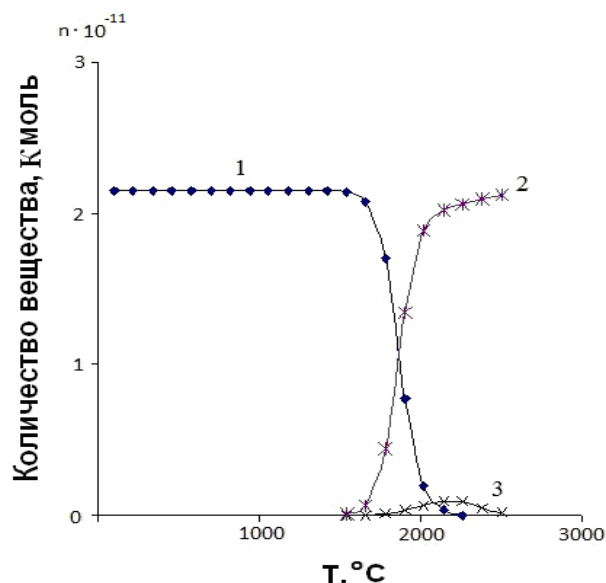


Рис. 2. Результаты термодинамического моделирования процесса атомизации платины из карбоплатина: 1 – Pt_к; 2 – Pt_г; 3 – PtC_г; к – конденсированная фаза; г – газовая фаза атомизатора

Таблица 1. Влияние матриц биожидкостей на величину характеристической массы (m_0) и относительно стандартного отклонения (S_r) при ЭТААС определении Pt

Объект	Метрологические характеристики	
	m_0 , пг	S_r (n=3; P= 0.95)
Стандартный раствор (концентрация Pt(IV) 200 мкг/л)	65	0.07
Сыворотка крови	96	0.2
Асцитическая жидкость	106	0.1
Суспензия лимфоцитов	131	0.3

Полученные данные представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что полное устранение матричного влияния (m_0^{CT}/m_0^M) наблюдается только для диметилглиоксима. При этом показатель сходимости улучшается в 1.5 раза.

Для выяснения возможной схемы действия этого модификатора процесс пиролиза диметилглиоксимата Pt(IV), синтезированного по стандартной методике [18], был исследован дериватографическим методом (рис. 3).

Из данных рис. 3 следует, что пиролиз комплекса протекает ступенчато и заканчивается уже при 300°C. На дифференциальной термоаналитической кривой (рис.3, кривая 3) наблюдается два эндотермических пика при 190 и 230°C. Эндотермические пики характерны для процессов дегидратации, возгонки, разрыва связи, плавления и кипения.

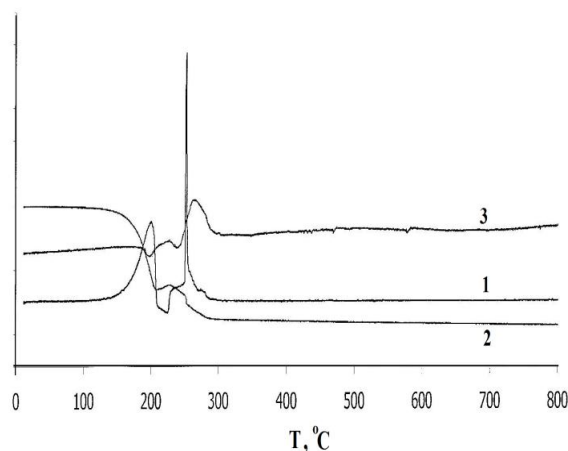


Рис 3. Данные дериватографического исследования процесса пиролиза диметилглиоксимата платины(IV): 1 – дифференциальная кривая потери массы; 2 – интегральная кривая потери массы; 3 – дифференциальная термоаналитическая кривая

Таблица 2. Эффективность химических модификаторов при ЭТААС определении Pt в сыворотке свиной крови (концентрация модификатора – 0.001 моль/л)

Модификатор	m_0/m_0^M	m_0^{CT}/m_0^M	S_r/S_r^M
Диметилглиоксим*	1.0	1.0	1.5
Дифенилкарбазон*	0.98	0.69	0.73
Хромазуrol S	0.98	0.69	0.48
Диантипирилметан*	0.91	0.58	0.63

* растворитель – смесь H₂O и C₂H₅OH (объемная доля этанола 9.6%)

Таблица 3. ЭТААС определение платины в биожидкостях с модификатором диметилглиоксимом (n=3; P=0.95)

Объект анализа	Введено карбоплатина (в пересчете на Pt), мкг/л	Найдено	
		$\bar{c} \pm \delta$, мкг/л	S _r
Сыворотка свиной крови	252	266±26	0.04
Сыворотка крови человека	252	259±26	0.04
Асцитическая жидкость	100	107±13	0.05
Суспензия лимфоцитов	100	95±19	0.08

По-видимому, при пиролизе диметилглиоксима происходит образование промежуточных соединений, для идентификации которых продукты пиролиза, полученные при температуре 230°C, исследовали рентгенофазовым методом.

Были идентифицированы возможные фазы [(NH₃)₂PtOH]₂(NO₃)₂, [Pt(NH₃)₂](NO₃)₂, C₂H₁₂N₄O₄Pt, C₄H₁₂N₄O₈Pt₂, PtO₂. При температуре 280°C наблюдается экзотермический пик, который сопровождается небольшим увеличением массы. По-видимому, это можно объяснить процессами окисления промежуточных продуктов пиролиза. Известно, что радикальный характер пиролиза комплексов, которые модификатор образует с ионами определяемого элемента, способствует хемосорбции аналита на графитовой поверхности и его низкотемпературной термостабилизации [19].

Хемосорбция предотвращает диффузию аналита к холодным периферийным концам платформы, ведет к воспроизводимым условиям атомизации и к улучшению сходимости. Рентгенограмма зольного остатка подтверждает, что при 300°C происходит практически полное восстановление платины из комплекса.

В то же время из данных рис. 1, 2 следует, что при испарении стандартного раствора хлорида

платины(IV) при 300°C восстановление платины только начинается. Восстановление платины при более низких температурах и ее переход в газообразное состояние препятствует, по-видимому, образованию термостойкого карбида платины и способствует устранению влияния матрицы.

Диметилглиоксим был использован в качестве модификатора при прямом (без кислотного вскрытия пробы) ЭТААС определении Pt в биожидкостях. Аликвоту биожидкости, объемом 2.00 мл помещали в мерную пробирку вместимостью 10 мл, добавляли 0.6 мл 0.010 М спиртового раствора диметилглиоксима, разбавляли до объема 6.0 мл дистиллированной водой и перемешивали. Аликвоты 20 мкл полученных растворов дозировали на графитовую платформу и измеряли интегральную абсорбционность платины в оптимальных условиях нагрева атомизатора.

Содержание Pt в сыворотке крови определяли по методу градуировочного графика, построенного с использованием растворов, приготовленных разбавлением стандартного раствора Pt(IV).

Правильность результатов доказывали методом "введено-найденно" (табл. 3).

Предел обнаружения по 2S-критерию составляет 20 мкг/л. Величина относительного стандартного отклонения не превышает 0.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана прямая без предварительного кислотного вскрытия методика определения платины в биожидкостях человека (сыворотка крови, асцитическая жидкость, суспензия лимфоцитов) с использованием модификатора диметилглиоксима. Значение относительного стандартного отклонения S_r не превышает 0.1.

пензия лимфоцитов) с использованием модификатора диметилглиоксима. Значение относительного стандартного отклонения S_r не превышает 0.1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2011. – С. 139-148.
2. Begerow J, Turfeld M, Dunemann L. Determination of physiological noble metals in human urine using liquid-liquid extraction and Zeeman electrothermal atomic absorption spectrometry // *Anal. Chem.*, 1997. – № 340. – P. 277-283.
3. Zheng Yang, Xiandeng Hou, Bradley T. Jones. Determination of platinum in clinical samples // *Applied. spectroscopy reviews*, 2002. – V. 37(1). – P. 57-88.
4. Najafi Nahid Mashkouri, Shahparvizi Shahram, Rafati Hasan. Preconcentration and determination of ultra-traces of platinum in human serum using the combined electrodeposition-electrothermal atomic absorption spectroscopy (ED-ETAAS) and chemometric method // *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 2010. – Т. 53(1). – P. 58-61.
5. Zhang Yanzi, Shu Yonghong, Chen Jianping. Direct determination of cis-platinum complexes in whole blood by GTAAS with compact platform // *J. Trace Elements Science*, 2003. – Т. 10(11). – P. 51-54.
6. Vouillamoz-Lorenz S., Bauer J., Lejeune F., Decosterd L. A. Validation of an AAS method for the determination of platinum in biological fluids from patients receiving the oral platinum derivative JM216 // *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 2001. – Т. 25, № 3-4, – С. 465-475.
7. Львов Б.В., Николаев В.Г., Норман Е.А., Кочарова Н.В., Романова Н.П. Теоретический расчет чувствительности измерений в атомно-абсорбционной спектрометрии с температурно-стабилизированной печью с платформой // *Ж. аналит. химии*, 1989. – Т. 44, № 5. – С. 802-808.
8. Ивановский А.Л. Нитриды и карбиды металлов платиновой группы: синтез, свойства и моделирование // *Успехи химии*, 2009. – Т. 78, № 4. – С. 328-344.
9. Atomic Absorption Spectrometry. Methods Manual. Thermo Electron Spectroscopy Ltd., 2004. Registration № 441506, Issue 4.
10. Slavin W., Manning D.C. and Carnrick G.R. The stabilized temperature platform furnace // *At. Spectrosc.*, 1981. – V.2, № 5. – P. 137-145.
11. Волынский А.Б. Использование органических модификаторов матрицы в электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии // *Ж. аналит. химии*, 1995. – Т. 50, № 1. – С. 4-32.
12. Amorusi P., Lessard D., Bansal S.K., and ather. Analysis of enloplatin by liquid chromatography and of platinum by atomic absorption spectrometry in various biological fluids // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994. – V.12, № 8. – P. 1023-1033.
13. Юделевич И.Г., Старцева Е.А. Атомно-абсорбционное определение благородных металлов. – Новосибирск: Наука, 1981. – 160 с.
14. Гинзбург С.И., Езерская Н.А., Прокофьева И.В., Федоренко Н.В., Шленская В.И., Бельский Н.К. Аналитическая химия платиновых металлов. – М.: Наука, 1972. – 617 с.
15. Алемасова А.С., Высоцкий Ю.Б., Щепина Н.Д., Муратов Д.В. Модифицирование поверхности графитовой печи с использованием химических модификаторов на основе комплексов палладия(II) в электротермическом атомно-абсорбционном методе // *Методы и объекты химического анализа*, 2006. – Т. 1, № 2. – С. 108-115.
16. Manku G.S. Diphenylcarbazone as a Sensitive Reagent for the Spectrophotometric Determination of Iridium(IV) // *Microchimica Acta*, 1973. – V. 61, № 3. – P. 341-348.
17. Лазарев А.И. Органические реагенты в анализе металлов. – М.: Металлургия, 1980. – 232 с.
18. Чугаев Л.А. Химия комплексных соединений. Исследования в области комплексных соединений. Статьи 1907-1926. – Л.: Наука, 1979. – 488 с.
19. Алемасова А.С. Высокотемпературные процессы превращения комплексообразователей и комплексов металлов в атомно-абсорбционном анализе. – Донецк.: ДонГУ, 1997. – 297 с.