Методы и объекты хиимического анализа, 2010, т.5, №1, с.14-18

Особенности пробоподготовки образцов мягких тканей при определении металлов

Чмиленко Ф.А., Саевич О.В.

Днепропетровский национальный университет Украина, 49050, г. Днепропетровск, ул. Научная, 13 E-mail: analyticdnu@mail.ru

Поступила: 22 января 2008 г./ Принята к публикации: 3 сентября 2009 г.

Описано влияние воздействия ультразвука на длительность пробоподготовки биообразцов мягких тканей. Определены оптимальные параметры ультразвуковой обработки. Предложена ускоренная методика определения содержания кадмия, меди, свинца, никеля, железа и цинка в образцах тканей такого органа, как легкие, методами атомной спектроскопии: абсорбции или эмиссии с ИСП, с использованием ультразвука на стадии минерализации.

Chmilenko F., Saevich O. Features of sample preparation soft tissues at determination of metals – Influence ofultrasound is described on duration of sample preparation biotstandards of soft fabrics. The optimum parameters of ultrasonic treatment are certain. The speed-up method of determination of maintenance of cadmium is offered,copper, lead, nickel, iron and zinc in the standards of fabrics of such organ, as lights, by the methods of atomicspectroscopy: absorptions or emissions with ISP, with the use of ultrasound on the stage of mineralization.

Ключевые слова: *пробоподготовка, ультразвук, атомная спектроскопия, тяжелые металлы,*
Keywords: *sample preparation, ultrasound, atomic spectroscopy, heavy metals*

Алгоритм отбора проб сложных объектов и последующей их подготовки к анализу определяется не только агрегатным состоянием исследуемых образцов. Так, методики пробоподготовки для растительных образцов невозможно использовать при анализе животных тканей. Даже при проведении анализа образцов одного живого организма, но из различных органов и биосред, необходимо использовать специальные методики, продолжительность и условия минерализации проб в которых сильно различаются [1-3]. Для интенсификации процесса минерализации растительных и ряда животных биопроб ранее было использовано воздействие высокоэнергетических полей. Использование микроволнового излучения (МВИ) позволило значительно сократить время проведения минерализации некоторых видов биопроб [5,6], в то время как ультразвуковое (УЗ) излучение использовалось только при пробоподготовке твердых проб [7,8]. При этом существующие методики применялись для определения содержания небольшого количества элементов. Таким образом, в литературе практически отсутствуют универсальные методики для определения ряда элементов при их совместном присутствии.

Целью настоящего исследования была разработка ускоренной универсальной методики количественного определения кадмия, меди, свинца, никеля, железа и цинка в мягких биомедицинских образцах с помощью атомно-абсорбционного (ААС) и атомно-эмиссионного с индуктивно связанной плазмой (АЭС ИСП) методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследованы образцы ткани легких крыс, отбор которых осуществляли в клинической лаборатории. С целью исключения внешнего загрязнения образцов отбор осуществлялся хромированными хирургическими инструментами, обработанными в 1% растворе ЭДТА. Непосредственно после этого образцы обрабатывали в течение 5-7 минут таким же раствором ЭДТА с последующей промывкой в дистиллированной воде по методике [9].

При необходимости анализа больших серий биомедицинских проб существует несколько способов их длительного хранения. В ряде методик, предлагается проводить высушивание обработанных проб мягких тканей при разных температурах до постоянной массы [9,10]. Однако, при проведении сушки при высоких температурах возможны потери летучих веществ, содержащих определяемые компоненты, что соответственно должно отразиться на точности полученных результатов. Другой способ консервации образцов - непосредственно после отбора материал для анализа немедленно замораживают и хранят при t= -10°C [11,12]. Это менее трудоемкая методика, поэтому

© Чмиленко Ф.А., Саевич О.В.

при дальнейшей работе именно она и была использована нами. Перед минерализацией пробу размораживали, измельчали хромированным медицинским скальпелем и отбирали навеску – 0,300 г для минерализации.

Обычно минерализация мягких биомедицинских проб проводится в сильно агрессивных средах, использование которых позволяет разрушить органическую матрицу образца [1,2,8-12]. В качестве окислителей при минерализации применяют азотную, фтористоводородную или хлористоводородную кислоты. Процесс минерализации состоит из нескольких операций, что естественно усложняет проведение анализа [3,4]. Так при определении железа в биоорганических пробах минерализацию проводили в два этапа: пробы озоляли небольшим количеством концентрированной серной кислоты при 500-550º С с последующим растворением получаемого осадка в HCl [13,14]. В работе [15] для более полного перевода пробы в раствор процесс проводили при повышенных температурах в присутствие сильного окислителя как (HNO3) также с дальнейшей обработкой 20 % раствором HC1. Иногда для полного растворения осадка минерализата применяют HF [3,4].

Ранее было показано, что для биомедицинских образцов, находящихся в твердом состоянии, применение УЗ воздействия позволяет проводить минерализацию, при температурах 50-70° С и без применения дополнительных реактивов, используя только концентрированную азотную кислоту [7,8,16]. Поэтому нами проводилась пробоподготовка по следующей схеме: навеску пробы 0,300 г минерализовали кипячением в концентрированной азотной кислоте в течение 30 минут. Минерализат сразу обрабатывали ультразвуком с помощью диспергатора УЗДН-1М при различных частотах, интенсивности и времени воздействия УЗ. Отработку параметров УЗ воздействия, используемого при проведении пробоподготовки, проводили только при определении содержания цинка, железа и свинца. Оптимальные величины этих параметров использовались при проведении последующих определений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость содержания элементов при обработке минерализата ультразвуком различной частоты представлена в таблице 1. УЗ колебания интенсифицируют процесс полного разрушения органической матрицы проб мягких тканей. При обработке горячего минерализата происходит усиление окислительных свойств реагента. При температуре 70-75° С в ультразвуковых кавитационных пузырьках и прилегающим к ним областям, вещества распадаются, образуя множество заряженных частиц и радикалов. Фрагменты белковой матрицы реагируют с радикалами, возбужденными молекулами газа и воды. Изменяя параметры УЗ моделировали максимальное воздействие на степень развития кавитации в системе. Полученные данные показывают, что максимальная степень вскрытия проб наблюдается при частоте 22 кГц. Исследование влияния времени ультразвукового воздействия на полноту раскрытия проб показывает, что при воздействии УЗ на пробы мягких тканей до 3 минут включительно, наблюдается увеличение степени извлечения из пробы определяемых элементов. Дальнейшее увеличение продолжительности обработки характеризуется постоянством последних (рис. 1). Время воздействия УЗ при исследованных частотах влияет практически одинаково (табл.1). Поэтому нами в дальнейших опытах использовалась частота УЗ-воздействия 22 кГц в течение 5 минут.

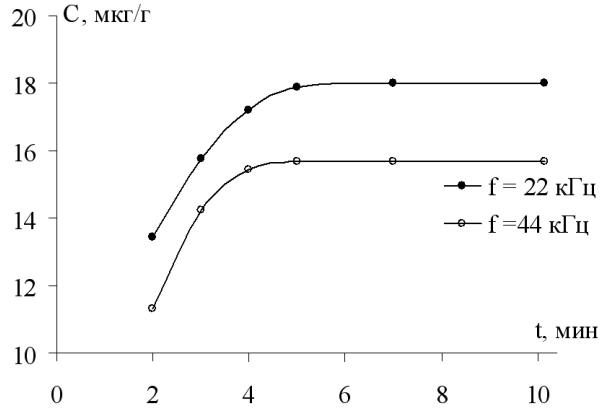
Таблица 1 Содержание Fe, Zn, Pb в пробах в зависимости от времени и частоты УЗ при I = 3,0 Вт/см^2

τ, мин	f = 22 кГц			f = 44 кГц		
	Содержание микроэлементов в минерализатах, мкг/г					
	Fe	Zn	Pb	Fe	Zn	Pb
2	75,30±	13,45±	5,99±	71,88±	11,34±	2,34±
3	78,05±	15,78±	7,96±	74,53±	14,25±	2,65±
4	78,83±	17,21±	7,96±	76,29±	15,43±	2,72±
5	78,93±	17,89±	9,27±	78,93±	15,67±	3,76±
7	78,92±	18,01±	9,27±	79,41±	15,67±	3,76±
10	78,90±	18,01±	9,27±	79,48±	15,67±	3,77±

Следует отметить, что опыты этой серии (табл.1) проводились при постоянной интенсивности воздействия УЗ, равной 3,0 Вт/см². С целью выяснения влияния этого параметра на извлечение определяемых элементов из ткани легких варьировали величину интенсивности УЗ воздействия при частоте 22 кГц и времени 5 минут. Результаты этих экспериментов, показывают, что

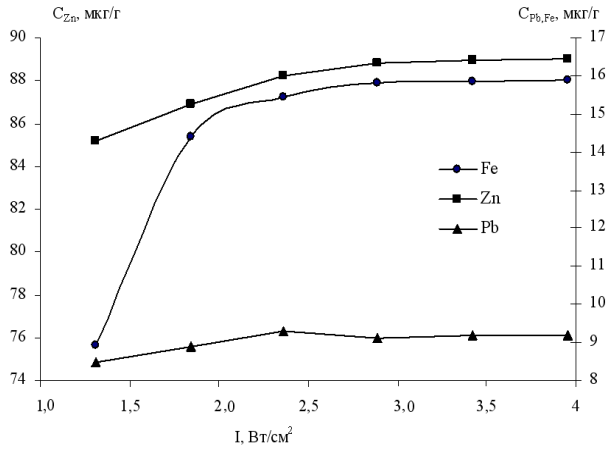
максимальное извлечение определяемых элементов наблюдается при интенсивности УЗ большей 3,5 Вт/см² (рис. 2).

Рис. 1. Изменение содержания цинка в минерализатах от времени УЗ воздействия при различных частотах



Таким образом, оптимальные параметры ультразвуковой обработки при определении железа, цинка и свинца следующие: длительность ультразвуковой обработки 5 минут; частота - 22 кГц; интенсивность – 3,5-3,7 Вт/см2. Для дальнейших опытов схема минерализации с использованием УЗ имеет следующий вид: 0,300 г пробы кипятят в азотной кислоте в течение 30 минут. Полученный минерализат обрабатывают ультразвуком (частота–22 кГц, мощность –3,5-3,7 Вт/см², время – 5–7 мин) при помощи ультразвукового диспергатора УЗДН-1М.

Рис. 2. Влияние интенсивности ультразвукового воздействия на выход элементов в минерализат (т =5 мин, f=22 кГц).



Количественное определение химических элементов (кадмия, меди, свинца, никеля, железа и цинка) проводили с использованием спектрометров: атомно-эмиссионного с индуктивно связанной аргоновой плазмой “IRIS Intepid II XDL” (ICP AES) и атомно-абсорбционного С-115 ПКС. Проводили сравнительное определение химического состава проб с использованием двух схем минерализации по методикам: 1) стандартной с использованием герметического реактора [17] и 2) разработанной с применением УЗ-воздействия.

В таблицах 2-4 представлены данные, характеризующие определяемое содержание кадмия, свинца, меди, никеля, железа и цинка в пробах тканей легких различных животных при проведении этапа минерализации по двум схемам.

Табл. 2. Содержание кадмия и меди в легких медицинских крыс* (n=3 p=0,95)

№ пробы	Кадмий, мкг/г				Медь, мкг/г			
	УЗ		ГР		УЗ		ГР	
	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС
1	6,60±0,93	6,89±0,81	6,77±1,13	7,02±1,17	86,18±14,33	85,03±14,14	90,33±15,02	92,51±15,38
2	5,21±0,87	5,51±0,75	4,75±0,79	5,11±0,85	83,96±13,96	82,47±13,71	85,11±14,15	84,46±14,04
3	8,31±1,38	8,23±1,37	8,65±1,44	7,52±1,25	81,63±13,57	82,81±13,77	80,28±13,35	81,45±13,54
4	4,86±0,81	4,21±0,70	4,20±0,70	4,74±0,62	84,15±13,99	81,65±13,58	85,86±14,28	84,02±13,97
5	4,79±0,80	4,52±0,75	4,22±0,70	4,88±0,65	77,38±12,87	76,51±12,72	77,49±12,88	79,91±13,29
6	10,24±1,70	11,22±0,87	10,86±1,81	10,23±1,70	86,44±14,37	85,01±14,14	87,71±14,58	85,23±14,17
7	5,07±0,84	4,92±0,69	4,98±0,83	4,42±0,73	79,62±13,24	80,74±13,43	81,32±13,52	79,12±13,16
8	4,72±0,78	4,17±0,70	4,23±0,70	4,20±0,67	84,23±14,01	88,65±14,74	89,38±14,86	89,13±14,82
9	4,94±0,82	4,92±0,82	4,96±0,82	5,07±0,86	82,63±13,74	80,64±13,41	81,35±13,53	83,53±13,89
10	6,07±1,01	6,05±1,01	5,84±0,97	5,86±0,92	74,81±12,44	75,46±12,56	73,61±12,24	72,34±12,03
11	4,57±0,76	4,34±0,72	5,05±0,84	4,87±0,81	81,05±13,48	86,52±14,38	80,19±13,33	84,67±14,08

*Следует отметить, что для медицинских образцов необходимо приводить данные для каждого образца, т.к. содержание химических элементов в органах живых организмов может существенно различаться в зависимости от многих факторов окружающей среды и индивидуальных особенностей индивидуума.

© Чмиленко Ф.А., Саевич О.В.

Табл. 3. Содержание свинца и цинка в легких медицинских крыс (n=3 p=0,95)

№ пробы	Свинец, мкг/г				Цинк, мкг/г			
	УЗ		ГР		УЗ		ГР	
	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС
1	9,21±1,53	9,78±1,63	8,89±1,48	9,10±1,51	9,24±1,54	9,21±1,53	9,30±1,55	9,26±1,54
2	15,04±2,50	17,24±2,87	16,42±2,73	16,78±2,79	10,96±1,82	11,00±2,00	11,25±1,87	11,05±1,84
3	10,10±1,68	9,66±1,61	10,35±1,72	11,04±1,84	20,32±3,38	19,58±3,26	20,44±3,40	20,14±3,35
4	9,64±1,60	9,95±1,65	8,23±1,37	8,67±1,44	7,80±1,30	7,35±1,22	7,95±1,32	7,54±1,25
5	10,09±1,68	9,45±1,57	9,02±1,50	9,34±1,55	19,05±3,17	18,13±3,01	18,87±3,14	18,60±3,09
6	10,68±1,78	10,81±1,80	8,98±1,49	10,23±1,70	10,96±1,82	10,81±1,80	10,28±1,71	10,53±1,75
7	9,45±1,57	9,73±1,62	8,89±1,31	9,23±1,37	23,54±3,91	23,73±3,95	22,77±3,79	23,35±3,88
8	9,56±1,59	8,89±1,44	8,43±1,40	9,21±1,53	20,32±3,38	19,58±3,26	19,86±3,30	20,11±3,34
9	9,82±1,63	9,86±1,64	9,41±1,56	9,98±1,66	15,56±2,42	16,86±2,80	15,79±2,63	15,90±2,64
10	11,87±1,97	10,02±1,67	10,34±1,72	10,20±1,53	18,87±3,14	20,02±3,33	20,13±3,35	19,65±3,27
11	9,63±1,60	9,31±1,55	8,45±1,24	8,71±1,35	20,63±3,43	22,31±3,88	22,44±3,73	21,68±3,60

Табл. 4. Содержание никеля и железа в легких медицинских крыс (n=3, p=0,95)

№ пробы	Никель, мкг/г				Железо, мкг/г			
	УЗ		ГР		УЗ		ГР	
	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС	АЕС	ААС
1	0,53±0,09	0,31±0,03	0,35±0,06	0,27±0,04	60,83±10,11	59,31±9,86	62,34±10,37	65,21±10,84
2	0,69±0,11	0,69±0,11	0,70±0,12	0,64±0,11	43,96±7,31	44,30±7,37	42,63±7,09	43,04±7,16
3	0,25±0,04	0,29±0,05	0,24±0,04	0,30±0,05	50,32±8,37	49,90±8,30	50,26±8,36	51,13±8,50
4	0,33±0,05	0,37±0,06	0,38±0,06	0,35±0,06	74,88±12,46	75,37±12,53	70,50±11,72	73,26±12,18
5	0,48±0,08	0,41±0,07	0,50±0,08	0,53±0,09	57,61±9,58	60,03±9,98	60,34±10,03	59,20±9,84
6	0,66±0,10	0,69±0,11	0,71±0,12	0,68±0,10	86,61±14,40	84,72±14,09	82,74±13,76	80,22±13,34
7	0,75±0,14	0,73±0,12	0,70±0,13	0,72±0,12	58,96±9,80	57,61±9,58	55,49±9,23	57,32±9,53
8	1,12±0,15	1,58±0,26	1,23±0,17	1,37±0,21	46,67±7,76	45,58±7,58	47,44±7,89	45,53±7,50
9	0,56±0,09	0,61±0,11	0,60±0,10	0,62±0,10	79,27±13,18	78,86±13,11	75,68±12,58	76,87±12,78
10	0,72±0,12	0,67±0,11	0,70±0,12	0,72±0,12	63,88±10,62	65,04±10,81	66,05±10,98	66,56±11,07
11	0,63±0,10	0,73±0,12	0,66±0,11	0,70±0,12	80,63±13,41	82,01±13,64	79,34±13,19	78,45±13,04

Результаты, полученные при анализе мягких тканей по различным методикам, сопоставимы независимо от схемы проведения пробоподготовки (таблицы 2-4). Так, содержание кадмия при минерализации исследуемых проб по двум схемам (в герметическом реакторе и с воздействием УЗ), например, в образце № 3 практически одинаково. Аналогичные результаты наблюдаются практически для всех определяемых элементов в исследуемых образцах мягких тканей.

Полученные данные показывают, что статистическая значимая разница в результатах химического анализа, при проведении минерализации двумя разными методиками, при определении кадмия, меди, свинца, никеля, железа и цинка методами атомно-эмиссионной и атомно-абсорбционной спектроскопии незначительна, т.е. применимость предложенной нами методики для определения металлов свидетельствует о ее универсальности.

ВЫВОДЫ

Применение ультразвукового воздействия на систему «проба – окислитель» при минерализации образцов тканей легкого значительно ускоряет разрушение их органической матрицы, что сокращает время проведения многоэлементного анализа таких объектов методами атомно-абсорбционной или атомно-эмиссионной с индуктивно связанной плазмой спектроскопии. Подобраны оптимальные параметры УЗ-воздействия: интенсивность 3,5-3,7 Вт/см², частота 22 кГц, время 5–7 минут. На основе полученных результатов разработана экспрессная методика определения химических элементов в мягких биомедицинских пробах.

Проведено определение кадмия, меди, свинца, никеля, железа и цинка различными спектроскопическими методами: по разработанной и традиционной (разложение в герметическом реакторе) методикам пробоподготовок. Сходимость полу-

ченных результатов свидетельствует о возможности использования предложенной методики минерализации с использованием УЗ-воздействия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Irnius A., Speieiene D., Pajenekovskyte K., Tautkus St., Kazlauskas R., Kareiva A. Rapid quantitative determination of metals in blood and liver by FAAS// Chemija. - 2005.- Vol. 16.- №. 3-4.- P. 29-33.

2. Sverre H. Omang. Trace determination of mercury in biological materials by flameless atomic absorption spectrometry // Analytica Chimica Acta.- 1973.-Vol. 63.- Issue 2.- P. 247-253.

3. Soares M., Bastos M., Ferreira M. Determination of arsenic, cadmium and lead in porcine and bovine kidneys by electrothermal atomic absorption spectrometry// Analyst. –1995. – Vol. 120. – P. 2367–2370.

4. Mader. P.; Szakova, J.; Curdova, E. Combination of classical dry ashing with stripping voltammetry in trace element analysis of biological materials: review of literature published after 1978 // Talanta – 1996. – Vol. 43, № 4. – P. 521–534

5. Кубракова И.В., Мясоедова Г.В., Еремин С.А., Плетнев И.В., Моходоева О.Б., Морозова В.А., Хачатрян К.С. Подготовка проб в условиях микроволнового нагрева // Методы и объекты химического анализа. – 2006. – Т. 1. – № 1. – С. 27-34.

6. Седых Э.М., Петровская И.Н., Матусиевич Г.П., Старшинова Н.П., Банных Л.Н., Орлова В.А., Кузьмин Н.М. Микроволновое разложение биологических объектов для последующего атомно-абсорбционного и атомно-эмиссионного (с индуктивно связанной плазмой) анализа // Журн. аналит. химии. –1991. – Т.46, № 2. – С.292–299.

7. Чмиленко Ф.А., Саевич О.В., Чмиленко Т.С., Смитюк А.В.Ускоренное атомно-абсорбционное определение тяжелых металлов в волосах // Вісник Дніпропетровського університету. Сер. Хімія. – 2002. – Вип. 8. – С. 3–6.

8. Чмиленко Т.С., Саєвич О.В., Чмиленко Ф.О. Ефективність підготовки проб при атомно-абсорбційному визначенні купрума і ферума в медіко-біологічних об'єктах // Вісник Дніпропетровського університету. Серія Хімія. – 2007. – С 29–32.

9. Menden E., Brockman D., Choudhury H., Petering H.. Dry Ashing of Animal Tissues for Atomic Absorption Spectrometric Determination of Zinc, Copper, Cadmium, Lead, Iron, Manganese, Magnesium and Calcium // Analytical chemistry. – 1977. – Vol. 49, № 11. – P. 1644–1645.

10. Moniuszko-Jakoniuk J., Jurczuk M., Galazyn-Sidorczuk M., Brzoska M.. Lead Turnover and Changes in the Body Status of Chosen Micro- and Macroelements in Rats Exposed to Lead and Ethanol // Polish Journal of Environmental Studies. – 2003. – Vol. 12, № 3. – P. 335–344.

11. Rudolf Elisabeth, Hann Stefan, Stringeler Gerhard, Pieter Christian. Ultra-trace analysis of platinum in human tissue samples// Anal. And Bioanal. Chem. –2005 –№ 7– P.1500–1506.

12. Mader P., Szakova J., Miholova D.. Classic dry ashing biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to them inhibition in insoluble residue // Analusis. –1998. – Vol. 26. – P. 121-129.

13. Van Loon J.C. Selected method of trace metal analysis. Biologycal and environmental samples. Wiley: Intersience, New York, 1985. –326 p.

14. Subramanian K. Determination of metals in biofluids and tissues: Sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques // Spectrochimica Acta, – 1996. –Vol. 51. – P. 291–319.

15. Kazim U., Yılmaz E., Esengül K. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey)// Microchemical. -2008.–Vol. 90. – P. 67–70.

16. Чмиленко Т.С., Саєвич О.В., Сапа Ю.С., Чмиленко Ф.О. Експресна методика визначення біоелементів у волоссі людини // Вісник Дніпропетр. ун–ту. Медицина і охорона здоров'я. – 2003. – Вип. 4. – С 120-123.

17. Спектрофотометрические методы определения тяжелых металлов в объектах окружающей среды и биологическом материале: Практическое руководство для работников лабораторий санитарно-эпидемиологических станций/ Под. ред. М.Т. Дмитриева, Э.И. Грановского. – Алма-Ата, – 1986. – 56 с.

© Чмиленко Ф.А., Саевич О.В.