Оценка содержания токсичных микроэлементов в крови рабочих машиностроительного предприятия

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

ФБУН «Федеральный научный центр медико–профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская ,82, Пермь, 614045, Россия, veikhman_ga@mail.ru

Поступила: 6 марта 2013 г / Принята к публикации: 3 июня 2013 г.

Предложена модификация методики определения массовых концентраций свинца, кадмия, мышьяка в крови методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, исследования проведены на на масс-спектрометре Agilent 7500cx (USA) в стандартном режиме. Для минерализации проб крови использовали микроволновое разложение в системе SW-4 (Berghof, Germany) или кислотное растворение концентрированной азотной кислотой с последующим центрифугированием. В качестве внутреннего стандарта для определения As^{75} использовали Ge^{73}, а для Cd^{112} и Pb^{207} - Tb^{159}. Правильность результатов подтверждена анализом стандартных образцов крови SERONORM L1, L2 и L3 и с использованием метода «введено-найдено». В образцах крови рабочих и служащих машиностроительного предприятия среднее содержание токсичных элементов составляет 32.9-42.6 мкг/дм^3(для свинца), 1.1-1.4 мкг/дм^3 (для кадмия) и 3.7-5.6 мкг/дм^3 (для мышьяка).

T.S. ULANOVA, E.V. STENNO, G.A.VEYKHMAN, O.V. GILEVA, M.A. BAKANINA. *THE ESTIMATION OF THE CONTENTS OF TOXIC TRACE ELEMENTS IN ENGINEERING PLANT WORKERS BLOOD. - In this paper, we present the method of determination of mass concentrations of lead, cadmium, arsenic in the blood by mass spectrometry with inductively coupled plasma on Agilent 7500cx (USA) in standard mode. For the mineralization of the blood samples it was used SW-4 microwave decomposition system (Berghof, Germany) or acid-dissolution of concentrated nitric acid with following centrifuging. As an internal standard for the determination of As^{75} it was used Ge^{73}, for Cd^{112} and Pb^{207} - Tb^{159}. Accuracy of results is confirmed by analysis of standard samples of blood SERONORM L1, L2 and L3, and using the "put-found". Samples of blood of the engineering company workers are investigated on content of toxic elements lead, cadmium, arsenic by mass spectrometry with inductively coupled plasma. The average grade of toxic elements is 32.9-42.6 μgL^{-1} (for lead), 1.1-1.4 μgL^{-1} (for cadmium) и 3.7-5.6 μgL^{-1} (for arsenic) in blood sample of machine builder working.*

Ключевые слова: масс-спектрометрический метод с индуктивно связанной плазмой, кровь, токсичные микроэлементы
Keywords: mass spectrometry with inductively coupled plasma, blood, toxic trace elements

Загрязнение окружающей среды в регионах размещения промышленных предприятий характеризуется повышенным содержанием соединений свинца, меди, кадмия, мышьяка, никеля и других элементов. Группа токсичных микроэлементов (свинец, кадмий, мышьяк) является приоритетной группой при анализе биосред работающего населения [1,2,3].

По классификации МАИР [4] данные элементы и их соединения являются потенциальными канцерогенами, свинец отнесен к группе 2А, кадмий и мышьяк к 1 группе. Все сказанное подтверждает актуальность детализации методических разработок по определению токсичных элементов в биосредах с использованием высокочувствительных аналитических методов.

Целью настоящих исследований является валидация методики определения содержания мышьяка, кадмия и свинца в крови методом масс - спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой (МУК 4.1.1483-03) и контроль этих элементов в крови рабочих машиностроительного предприятия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Количественное определение свинца, кадмия и мышьяка в пробах крови осуществляли на масс-спектрометре Agilent 7500cx (USA) в стандартном режиме. Мощность генератора плазмы 1500 Вт. Диаметр инжекторной трубки плазменной горелки 2.5 мм. Использовали жидкий аргон высокой чистоты 99.998% (ТУ-2114-005-00204760-99). Максимальная скорость потока аргона составляла 20 л/мин, давление в канале подводки газа 700±20 кПа, Тплазмы = 8000 - 10000 К. Скорость подачи образца в распылительную камеру составляла 0.4 мл/мин. Скорость работы детектора осуществлялась ≥100 мкс на 1 ион. Для настройки использовали раствор Li^7, Co^{59} ,Y^{89} и Tl^{205} в 2% азотной кислоте с концен-

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

трацией 1 мкг/дм^3 для каждого элемента (Tuning Solution, USA).

В качестве основного стандартного раствора использовали раствор, содержащий 27 элементов с концентрацией 10 мг/дм^3 в 5% водном растворе азотной кислоты (Multi-Element Calibration Standard-2A, USA). Для приготовления растворов внутреннего стандарта (ВС) использовали комплексный стандартный раствор Bi^{209}, Ge^{73}, In^{115}, Li^{7}, Y^{89} , Sc^{45}, Tb^{159}, с концентрацией 10 мг/дм^3 в 5% водном растворе азотной кислоты (Internal Standard Mix, USA). Для минерализации образцов и приготовления градуировочных растворов использовали азотную кислоту о.с.ч, 18-4, ГОСТ 11125-84 (Россия). Все растворы разбавляли деионизированной водой, электропроводимостью 18.2 MΩ/см, очищенной в системе Milli-Q Integral (Millipore SAS, France). Для подготовки к анализу лабораторной посуды из стекла, тефлона, полипропилена использовали ультразвуковую мойку Elmasonic S 100H (Germany). Посуду выдерживали 20 мин в бидистиллированной воде при 55 °С, далее 20 мин в водном растворе азотной кислоты (1:5) при 55 °С, далее 20 мин в деионизованной воде при 55 °С. Забор проб крови осуществлялся из вены в вакуумные пробирки из полипропилена с напылением лития гепарина (PUTH, China). Для минерализации проб крови использовали микроволновую систему SW-4 (Berghof, Germany). Разложение осуществлялось в кварцевых вкладышах автоклавов DAQ-20, изготовленных из фторопласта TFM, рассчитанных на максимальное давление 100 бар и температуру 230º С.

Для разложения 0.5 см^3 цельной крови в кварцевые вкладыши автоклавов добавляли 3.5 см^3 концентрированной азотной кислоты и 1 см^3 бидистиллированной воды. Разложение проводили при максимальной температуре 175 °С и давлении 50 бар. Весь процесс разложения проводили в течение 45 мин. Контроль результатов анализа осуществляли с использованием стандартных образцов крови SERONORM уровней L1 – L3 (Norway).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при анализе биосред методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) существуют ограничения на содержание органических соединений в пробе, поскольку не полностью сгоревший в плазме углерод осаждается на горелке, распылителе и на деталях ионной оптики. Кроме того, растворы с высокой концентрацией матричных компонентов не рекомендуется вводить в плазму из-за изменения температуры плазменного факела и вероятности засоления узкого канала распылителя [5]. Микроволновый способ пробоподготовки позволяет радикально устранить влияние матрицы, хотя и значительно увеличивает время анализа.

Правильность определения содержания мышьяка, кадмия и свинца в крови проверяли методом «введено-найдено». Добавки вводили в образец крови перед пробоподготовкой в микроволновой системе разложения SW-4. Результаты представлены в таблице 1.

Результаты определения добавки оказались сопоставимы с введенной концентрацией.Для повышения точности анализа желательно в образцы вводить элементы внутреннего сравнения или внутренний стандарт (ВС). В то же время известно, что масса ВС должна быть как можно ближе к атомной массе определяемых элементов [5]. Очевидно, что для определения As^{75} наиболее подходящим ВС является Ge^{73}, а для Cd^{112} - In^{115}. Для определения Pb^{207} возможно использование Tb^{159} или Bi^{209}. В таблицах 2, 3 представлены результаты анализа стандартных образцов крови SERONORM уровней L1 – L3 с различными ВС. Из данных таблиц 2, 3 следует, что погрешность определения (Δ, %) As^{75} по Ge^{73} ниже на уровнях L1 и L2, чем с In^{115}, а Cd^{112} и Pb^{207} на разных уровнях концентраций с различными ВС практически не отличаются, поэтому в целях экономии времени, затрачиваемого на обработку результатов, нами было принято решение использовать Ge^{73} при определении As^{75} и Tb^{159}для Cd^{112} и Pb^{207}.

В методике МУК 4.1.1483-03 [6] 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.

С целью уменьшения осаждения матричных элементов на рабочих поверхностях никелевых конусов интерфейса и снижения его пропускной способности, в дальнейшем нами были внесены следующие изменения**:** к пробе крови объемом 0.1–0.2 см^3 добавляли 0.1 см^3 комплексного раствора ВС и 0.2–0.4 см^3 концентрированной азотной кислоты плотностью 1.415 г/см^3.

Пробирку с содержимым взбалтывали и оставляли на 3 часа. Затем доводили содержимое пробирки до 10 см^3 деионизированной водой и центрифугировали 10 минут со скоростью 2700 – 3000 об/мин на центрифуге ЦЛМН–Р10–01–«Элекон» (Россия).

Таблица 1. Контроль определения содержания элементов в крови (метод добавок, n=5)

№	As, мкг/дм^3		Cd, мкг/дм^3		Pb, мкг/дм^3	
	введено	найдено	введено	найдено	введено	Найдено
1	0.1	0.08	0.1	0.09	0.1	0.12
2	0.2	0.17	0.2	0.19	0.2	0.21

Таблица 2. Результаты анализа стандартных образцов крови SERONORM L1 – L3 при определении As^{75} с различными ВС

Уровень	Аттестованное значение, мкг/дм^3	Ge^{73}		In^{115}	
		Найдено, мкг/дм^3	Δ, %	Найдено, мкг/дм^3	Δ, %
L1	5.5±2.8	6.0	5.5	4.8	12.7
L2	15.6±2.6	15.5	2.6	17.1	13.5
L3	30.9±3.8	28.7	7.1	30.6	1.0

Таблица 3. Результаты анализа стандартных образцов крови SERONORM L1 – L3 при определении Cd^{112} и Pb^{207} с различными ВС

Элемент	Уровень	Аттестованное значение, мкг/дм^3	In^{115}		Tb^{159}	
			Найдено, мкг/дм^3	Δ, %	Найдено, мкг/дм^3	Δ, %
Cd	L1	0.67±0.08	0.70	2.1	0.69	3.0
	L2	6.5±0.4	6.24	4.0	6.3	3.1
	L3	12.3±1.2	11.9	3.2	11.6	5.7
Pb	L1	14.8±1.0	17.1	15.5	16.0	8.1
	L2	336.0±36.0	327.3	2.70	310.0	4.8
	L3	638.0±44.0	629.0	1.40	602.0	5.6

По результатам экспериментальных исследований и метрологической экспертизы модифицированная методика измерений массовых концентраций мышьяка, кадмия и свинца аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009 в Центре метрологии и сертификации Уральского отделения РАН г. Екатеринбург (таблица 4). Данный вариант методики определения мышьяка, кадмия и свинца в цельной крови масс-спектрометрическим методом с индуктивно связанной плазмой отличается от действующих в настоящее время МУК 4.1.1483-03 условиями пробоподготовки, выбором внутреннего стандарта для каждого определяемого элемента, расширением диапазонов измеряемых концентраций в растворе.

Таблица 4. Диапазон измерений, показатели точности измерений элементов в крови, мкг/дм^3

Элемент	Диапазон измерений, мкг/дм^3	Ггранцы относительной погрешности (P=0.95), ± δ, %
Свинец	0.1 - 1	36
	1 -100	24
	100 - 1500	12
Кадмий	0.01 – 0.1	36
	0.1 - 1	30
	1 - 100	20
	100 - 1000	10
Мышьяк	0.1 - 1	38
	1 - 100	34
	100 - 500	22

Нижний предел обнаружения данной методики позволяет определять концентрации мышьяка, кадмия и свинца в цельной крови на уровне референтных концентраций. Референтные пределы по Н. Тицу кадмия в крови составляют 0.3 – 1.2 мкг/дм^3, свинца 0-300 мкг/ дм^3 , мышьяка 2-23 мкг/ дм^3 [7,8]. С целью изучения факторов риска, влияющих на здоровье рабочих и служащих машиностроительного предприятия г. Перми, были исследованы образцы крови рабочих сборочного цеха, инженеров-конструкторов, сотрудников вневедомственной охраны (ВОХР).

Группа изолировщиков сборочного цеха (N=28) состояла из 10 женщин (34.48%), средний возраст которых 51.6±4.6 лет, стаж 12.0±6.7 лет. Мужчины – изолировщики (N=18) имели средний возраст 39.4±5.7 лет и стаж работы 7.1±3.6 лет.

Группа ВОХР состояла из 30 мужчин (81.08%), средний возраст 36.7±3.9 лет и 7 женщин (18.92%), средний возраст 39.7±5.7 лет. Группа сотрудников конструкторского отдела состояла из 15 женщин (50%) и 15 мужчин (50%), средний возраст женщин составлял 47.73±5.05 лет и 49.00±9.21 лет у мужчин. Стаж работы составил 7.63±2.48 лет у женщин и 13.67±8.63 лет у мужчин.

Контрольная группа была сформирована из 47 преподавателей и сотрудников школы, постоянно проживающих в экологически чистом районе Пермского края (п. Усть-Качка). Контрольная группа максимально приближена к выбранному контингенту работающих по полу и возрасту.

Содержание мышьяка, кадмия и свинца в крови определялось масс-спектрометрическим методом по предлагаемой методике. Результаты представляли как среднее ± ошибка средней (M±m) в мкг/дм^3(таблица 5).

Статистическую достоверность различий оценивали с помощью t – критерия Стьюдента. Различия при $p \le 0.05$ считали достоверно значимыми. Содержание свинца в крови изолировщиков, конструкторов и сотрудников ВОХР достоверно выше в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($p \le 0.00001$). Содержание мышьяка в крови изолировщиков достоверно превышено в 6 раз, у конструкторов в 5 раз, у сотрудников ВОХР в 4 раза по сравнению с контрольной группой ($p \le 0.00001$).

Не обнаружено достоверных отличий в содержании кадмия во всех группах работающих и контрольной группе. В то же время содержание кадмия достигает референтного уровня по Н. Тицу [7,8] во всех профессиональных группах.

Таблица 5. Содержание элементов в крови взрослых пациентов, мкг/ дм^3

Профессия	Возраст, лет	Свинец	Кадмий	Мышьяк
Учителя (контрольная группа, n=47)	47.14±3.0	18.8±5.6	1.0±0.7	0.7±0.1
Конструкторы (n=23)	49.78±1.72	32.9±7.8	1.1±0.6	4.6±0.6
Охранники (n=37)	39.35±3.86	42.6±6.5	1.1±0.3	3.7±0.7
Рабочие сборочного цеха(n=28)	44.68±4.61	42.3±5.9	1.4±0.3	5.6±0.7
Референтный уровень [7,8]	взрослые	0-300	0.3-1.2	2-23

ВЫВОДЫ

1. Осуществлена валидация методики МУК 4.1.1483-03 по определению содержания мышьяка, кадмия и свинца в цельной крови масс-спектрометрическим методом с индуктивно связанной плазмой, в ходе которой предложены новые варианты подготовки проб, выбраны внутренние стандарты для каждого определяемого элемента, расширены диапазоны измеряемых концентраций в растворе.

2. Установлено достоверное превышение содержания свинца и мышьяка у рабочих и служащих машиностроительного предприятия по сравнению с содержанием в крови неэкспонируемых жителей контрольной территории. Содержание кадмия практически одинаково во всех обследованных профессиональных группах и достигает верхнего допустимого референтного уровня.

3. Предлагаемые условия определения свинца, кадмия и мышьяка в крови масс-спектрометрическим методом с индуктивно связанной плазмой могут быть использованы при анализе биосред населения, проживающего в различных условиях антропогенного воздействия, а также при обследовании рабочих промышленных предприятий для ранней диагностики профзаболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С. Микроэлементозы человека. М.: Медицина, 1991. 495 с.

2. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека: в 2 томах. М.: Медицина, 2003. Т. 2. 1044 с.

3. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. М.: Мир, 2004. 272с.

4. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Р.2.1.10.1920 – 04. М.: Минздрав России, 2004. 143с.

5. Карандашев В.К., Туранов А.Н., Орлова Т.А. и др. Использование метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в элементном анализе объектов окружающей среды. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Том 73. №1. С. 12-22.

6. Методы контроля. Химические факторы. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Методические указания МУК 4.1.1482-1483-03. М.: Минздрав России, 2003. 56с.

7. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.:Юнимед-пресс, 2003. 960с.

8. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.4 ed. New Delhi. 2006. 2412 p.