

Journal of Siberian Federal University. Chemistry 3 (2016 9) 308-317

~ ~ ~

УДК 543.421:546.81

Electrothermal Atomic Absorption Determination of Lead Soluble Forms Extracted by Phosphate Buffer Solution in Biological Samples

**Vladimir N. Losev,
Natalia V. Maznyak and Anna P. Verkhoturova***
*Scientifically–research engineering center “Crystal”
of Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 24.03.2016, received in revised form 15.05.2016, accepted 18.07.2016

To determine the lead soluble forms in laboratory rats tissues in exogenous intoxication experiment a procedure of phosphate buffer extraction (PBS) and electrothermal atomic-absorption determination has been proposed. The detection limit of the lead soluble forms is 0.03 mg/kg. The relative standard deviation in the samples with more than 0.1 mg/kg lead does not exceed 0.2.

Keywords: biological samples, lead, phosphate buffer solution, electrothermal atomic absorption spectroscopy.

DOI: 10.17516/1998-2836-2016-9-3-308-317.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: pavloahun@yandex.ru

Электротермическое атомно-абсорбционное определение растворимых форм свинца, выделенных экстракцией фосфатным буферным раствором из биологических образцов

В.Н. Лосев,

Н.В. Мазняк, А.П. Верхотурова

Научно-исследовательский инженерный центр «Кристалл»

Сибирского федерального университета

Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Для определения растворимых форм свинца в тканях органов лабораторных крыс при экзогенной интоксикации предложено экстракционное выделение фосфатным буферным раствором (ФБР) с последующим электротермическим атомно-абсорбционным определением. Предел обнаружения растворимых форм свинца составляет 0,03 мкг/г. Относительное стандартное отклонение при определении более 0,1 мкг/г не превышает 0,2.

Ключевые слова: биологические образцы, свинец, фосфатные буферные растворы, электротермическая атомно-абсорбционная спектрометрия.

Введение

Необходимость определения свинца связана с его токсическим действием, проявляющимся в нарушении обменных процессов в живых системах.

Формы нахождения свинца с точки зрения возможности их извлечения водными или буферными растворами из биологического материала разделяются на растворимые и нерастворимые. К растворимым формам свинца относятся свободная (не связанная с другими ионами) форма, ионизированная неорганическая фосфорно-кислая форма, находящаяся в межклеточной жидкости, а также формы свинца, связанные с биологическими молекулами. Растворимые формы свинца с биологическими молекулами представлены соединениями свинца с альбуминами межклеточной жидкости печени и почек [1], металлотионеинами, синтезируемые печенью и почками [2], в которых свинец связан преимущественно с сульфгидрильными группами цистеиновых фрагментов белков. Растворимыми формами являются и соединения свинца с аминокислотами межклеточной жидкости: цистеином и гистидином, а также его соединения с другими биологическими молекулами, в которых свинец связан с аминными и карбоксильными группами [2].

При экстракции водными или буферными растворами и последующим центрифугированием растворимые формы свинца переходят из гомогенизированных образцов тканей печени и почек в супернатант, а в осадке остаются нерастворимые формы свинца, в которых свинец связан с мембранными белками клеток тканей, а также соединения свинца с нерастворимыми белками, например глобулинами [3].

Для определения низких концентраций свинца в биологических пробах широко используется метод электротермической атомно-абсорбционной спектрометрии (ЭТААС), характеризующийся высокой чувствительностью и селективностью [4-7]. В ЭТААС при наложении внешнего магнитного поля на атомизатор в случае интенсивного фонового сигнала возможен особый тип спектральных помех – перекомпенсация неселективного (фонового) поглощения (ПКНП) [8-10]. Эффект ПКНП проявляется в уменьшении сигнала атомного поглощения свинца за счет возникновения в фоновом сигнале дополнительной компоненты, связанной с расщеплением спектра некоторых молекул, отсутствующей на стадии регистрации полного абсорбционного сигнала. При определении свинца такие помехи возникают от молекул РО, образующихся в атомизаторе, при содержании в анализируемой пробе фосфатов [8]. Проблема перекомпенсации фонового поглощения в присутствии фосфатов при электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца весьма актуальна, поскольку сами биологические образцы содержат их достаточное количество [11], фосфаты часто используют в качестве химических модификаторов [12, 13] и других дополнительных реагентов, в частности буферных растворов.

Цель настоящей работы – разработка методики электротермического атомно-абсорбционного определения растворимых форм свинца, выделенных экстракцией фосфатным буферным раствором из тканей почки и печени лабораторных крыс при их интоксикации свинцом.

Экспериментальная часть

Оборудование и аппаратурные параметры атомно-абсорбционных измерений.

Атомно-абсорбционное определение свинца проводили на атомно-абсорбционном спектрометре AAnalyst 600 (Perkin-Elmer, США) с зеемановской коррекцией фона в графитовой печи поперечного нагрева THGA на длине волны 283,3 нм и ширине щели монохроматора 0,2 нм с использованием в качестве источника излучения высокочастотной безэлектродной лампы (ток 400 мА). Дозирование пробы (20 мкл) в графитовую кювету с концевыми крышками и интегрированной платформой Львова (End Caps) осуществляли при помощи автосамплера. В качестве инертного газа применяли аргон высокой степени чистоты. Величину абсорбционного сигнала определяли по площади пика при времени интегрирования 4 с.

Взвешивание образцов проводили на аналитических весах Mettler-Toledo XP 205 (Швейцария). Деионизованную воду с удельным сопротивлением 18,3 МΩсм⁻¹ получали на установке E-pure D 4642-33 (Barnstead International, США).

Растворы и материалы. Рабочие стандартные растворы свинца 5, 10, 20 мкг/л готовили разбавлением стандартного раствора свинца с концентрацией 1,0 мг/мл (ГСО № 7778) 0,1%-ным раствором азотной кислоты.

В качестве химического модификатора использовали раствор нитрата палладия (II) с концентрацией 10 г/л (Perkin-Elmer, США) в 15%-ной азотной кислоте.

Азотную кислоту квалификации ос.ч. 27-5 дополнительно очищали в установке для перегонки кислот distillacid™BSB-939-IR (BERGHOF, Германия).

Фосфатный буферный раствор pH 7,44 готовили смешиванием 40,4 мл 1/15M раствора Na₂HPO₄ и 9,6 мл 1/15M раствора KH₂PO₄ [14].

Объекты анализа и методика эксперимента. Исследования проводили на тканях почки и печени лабораторных крыс, которым был введен свинец в качестве токсиканта (50 мкг свинца 1 г массы живого веса).

Гомогенизированную навеску образца массой 0,15 г помещали в градуированную пластиковую пробирку вместимостью 15 мл, добавляли 4 мл фосфатного буферного раствора, закрывали крышкой и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Твердые частицы отделяли от раствора центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. При помощи микродозатора отбирали надосадочную жидкость, помещали в пластиковую пробирку вместимостью 15 мл, добавляли 5 мкл концентрированной азотной кислоты, перемешивали и определяли содержание свинца методом электротермической атомной абсорбции.

Результаты и обсуждение

В качестве объектов анализа были выбраны образцы тканей почки и печени, так как в организме свинец в основном локализуется в тканях этих органов [7, 15], являющихся биомишенями для многих токсических веществ, в том числе свинца.

Для экстрагирования растворимых форм свинца из межклеточной среды и клеток тканей использовали фосфатный буферный раствор с pH 7,44. Совместно с карбонатной, белковой и другими буферными системами фосфатная буферная система поддерживает значение pH на уровне 7,35-7,47 и составляет 1-5 % буферной емкости крови. В других тканях организма она является одной из основных, обеспечивая буферную емкость внутриклеточной жидкости, содержащей растворимые формы элементов [16].

В электротермических атомизаторах происходит разложение компонентов буферных систем до простых неорганических соединений, среди которых наибольшее влияние на определение свинца оказывают труднолетучие фосфорсодержащие соединения.

Для биологических образцов при электротермическом атомно-абсорбционном определении летучих элементов, в том числе свинца, в качестве наиболее эффективного модификатора используется нитрат палладия (II) [6, 8, 17], который позволяет не только стабилизировать свинец на стадии пиролиза, но и способствует более эффективному окислению органической матрицы биологических образцов. Поэтому при определении свинца в анализируемые пробы добавляли раствор нитрата палладия (II) – 2 мкл модификатора на 1 мл раствора. При ЭТААС-определении свинца в фосфатных буферных экстрактах с использованием температурно-временной программы нагрева печи (ТВП) (табл. 1) наблюдается значительное, более чем в 100 раз, увеличение интенсивности фонового сигнала (рис. 1а, б) по сравнению с фоновым сигналом свинца в азотнокислых растворах.

Фоновый сигнал имеет «двугорбую» форму (рис. 1а), а у аналитического сигнала появляется отрицательная компонента (рис. 1б), что осложняет проведение зеемановской коррекции фона при интегрировании сигнала атомного поглощения по площади пика и приводит к ошибочным результатам. Увеличение сигнала неселективного поглощения свидетельствует о влиянии матрицы пробы на процессы, происходящие в газовой фазе атомизатора. Основной вклад вносит труднолетучая неорганическая фосфорсодержащая составляющая ФБР-экстрактов, которую не удалось разложить и удалить из аналитической зоны атомизатора до стадии регистрации сигнала при использовании данной ТВП. Деформация формы пика связана со спектраль-

Таблица 1. Температурно-временная программа нагрева печи при электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца в азотнокислых растворах

Стадия ТВП	Температура, °C	Время нагрева, с	Время выдержки, с	Поток аргона, мл/мин
Сушка 1	100	15	30	250
Сушка 2	130	15	20	250
Пиролиз	900	5	20	250
Атомизация	2100	0	4	0
Очистка	2450	1	3	250

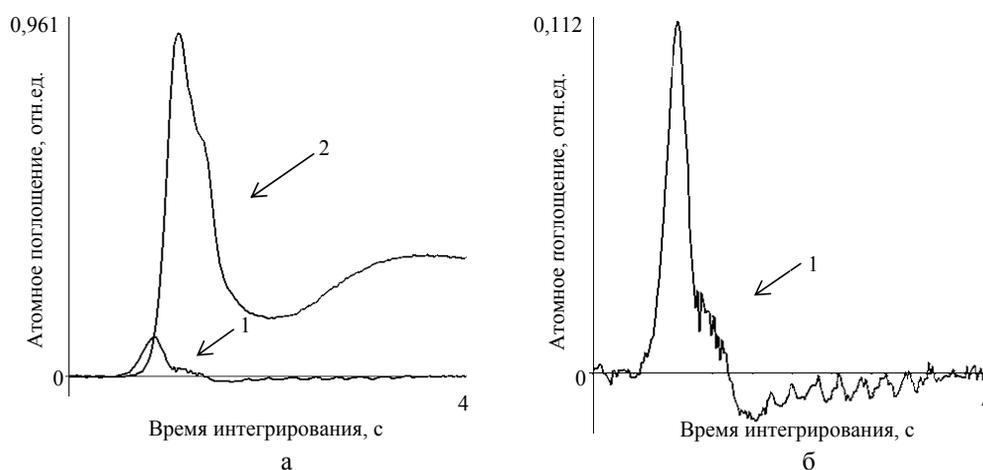


Рис. 1. Сигналы атомного (1) и фонового поглощения (2) в фосфатных буферных экстрактах для пробы почки лабораторной крысы с добавкой 11 мкг/л свинца на линии 283,3 нм (а, б)

ными помехами, возникающими при разложении матрицы фосфатных буферных экстрактов. При определении свинца на длине волны 283,3 нм и зеемановской коррекции фона возникают спектральные помехи от молекулярной полосы РО. Спектральные помехи от молекул РО при наложении магнитного поля на атомизатор наблюдаются и для других элементов, в частности для кадмия, серебра, меди, никеля, железа [10]. Это свидетельствует о неполной аппаратной коррекции фонового сигнала матрицы при реализации данной температурно-временной программы и наличии эффекта перекомпенсации фонового поглощения [8, 10]. Кроме того, при многократных циклах измерений наблюдалось явление «эффекта памяти» печи за счет накопления остатков фосфорсодержащей матрицы на платформе печи при 2450 °C в течение времени выдержки.

Использование спектральной линии свинца 217,0 нм позволило бы избежать спектральных помех от РО [8]. Однако электротермическое атомно-абсорбционное определение свинца на этой малоинтенсивной линии характеризуется худшим соотношением сигнал-шум при зеемановской коррекции неселективного поглощения, более узким диапазоном линейности градуировочной зависимости. При определении свинца на линии 217,0 нм явление перекомпенсации

фонового поглощения проявилось еще значительнее (рис. 2). В этом случае сигнал атомного поглощения свинца уходит в более отрицательную область, чем на линии 283,3 нм.

Одним из способов устранения эффекта перекомпенсации фонового поглощения выступает увеличение температуры атомизации [8, 18], что для данной аналитической системы неприемлемо, поскольку свинец – легкоатомизируемый, а фосфорсодержащая матрица – трудноатомизируемый компонент.

Как видно на рис. 3, при температурах атомизации ≤ 1600 °С фоновые сигналы имеют меньшую пиковую интенсивность, «размыты» по оси абсцисс и обладает затянутым «хвостом памяти», не позволяющим интегрировать их за выбранное время, равное 4 с. Повышение температуры атомизации приводит к «сужению» профилей фонового и аналитического сигнала свинца и увеличению его интенсивности. При 1700 °С регистрируются сигналы правильной формы, свободные от проявления указанных выше эффектов и пригодные для интегрирования в оптимальном для измерения диапазоне с максимальной чувствительностью определения свинца.

При температуре ≥ 1800 °С интенсивность фонового сигнала значительно возрастает, на ниспадающей ветви фонового сигнала возникает «ступень», вероятно, обусловленная процессами молекулярного рассеяния фона, проявляется эффект перекомпенсации фонового поглощения, измерение сигнала атомного поглощения свинца осложняется из-за появления в аналитическом сигнале отрицательной компоненты.

На основании проведенных исследований для определения свинца в фосфатных буферных экстрактах предложена многостадийная температурно-временная программа нагрева печи (табл. 2), учитывающая различие в летучести аналита и матрицы и позволяющая провести атомизацию свинца при минимально возможной температуре до стадии полного разложения фосфатной матрицы и поступления продуктов ее распада в аналитическую зону. Основная часть матричных компонентов из аналитической зоны удаляется на стадии очистки печи.

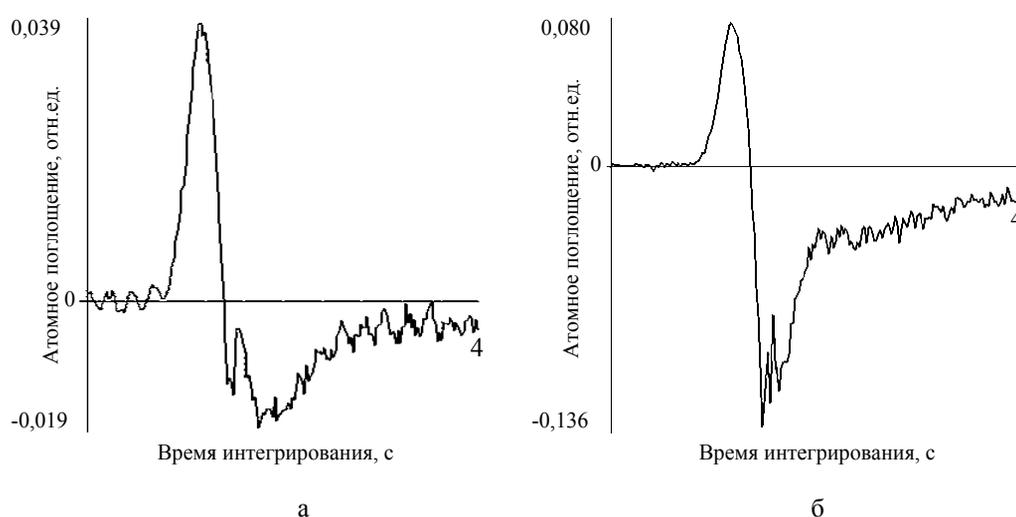


Рис. 2. Сигналы атомного поглощения для стандартного раствора свинца 5,8 мкг/л на фоне фосфатной буферной системы на линиях 283,3 (а) и 217,0 нм (б)

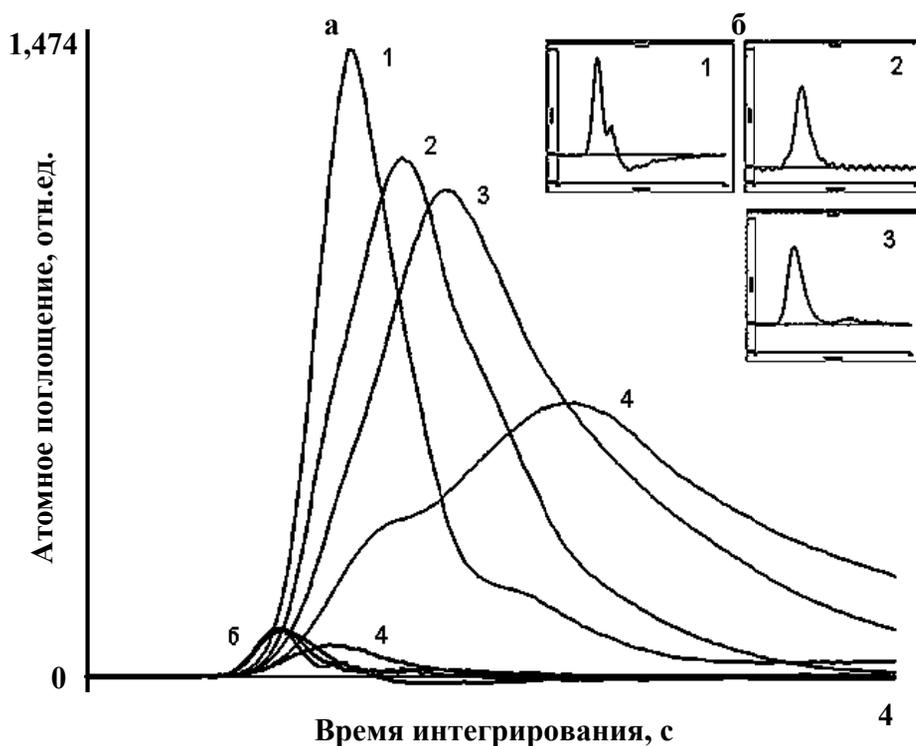


Рис. 3. Сигналы фонового (а) и атомного поглощения (б) в фосфатных буферных экстрактах для пробы почки лабораторной крысы с добавкой 11 мкг/л свинца при температуре атомизации 1800 °С (1), 1700 °С (2), 1600 °С (3), 1500 °С (4) на линии 283,3 нм

Таблица 2. Температурно-временная программа нагрева печи при электротермическом атомно-абсорбционном определении свинца в фосфатных буферных экстрактах

Стадия ТВП	Температура, °С	Время нагрева, с	Время выдержки, с	Поток аргона, мл/мин
Сушка 1	110	18	30	200
Сушка 2	200	18	20	200
Пиролиз 1	800	4	20	200
Пиролиз 2	1000	1	1	0 (Gas stop!)
Атомизация	1700	0	4	0 (Gas stop!)
Очистка 1	1800	1	3	250
Очистка 2	2500	1	3	250

В ТВП (табл. 2) включена дополнительная стадия пиролиза при 1000 °С, позволяющая реализовать полноту выхода анализируемых атомов в аналитическую зону. Свинец, будучи легколетучим компонентом пробы, испаряется в первые моменты атомизации, режим «Gas stop!» исключает возможные его потери и улучшает пространственную однородность формируемого поглощающего слоя в поперечном сечении атомизатора.

Таблица 3. Результаты электротермического атомно-абсорбционного определения растворимых форм свинца в образцах печени и почки лабораторных крыс (n=3; P=0,95)

Номер	Образец	Введено, мкг/г	Найдено, мкг/г
1	печень	- 0,06	<0,03 0,06±0,03
2	почка	- 0,16	0,08±0,04 0,24±0,03

Ввиду износа графитовой кюветы на стадии ее очистки при максимально возможной температуре не рекомендуется проведение очистки графитовой кюветы в течение длительного времени (более 5 с). Поэтому наряду со стадией очистки при 2500 °С введена дополнительная стадия очистки при 1800 °С, необходимая для дополнительного разложения фосфорсодержащей матрицы. При 1600–2000 °С на поверхности графита происходит термическое разложение фосфатов, фосфидов и других соединений до PO, P₄, P₂ и др. При температуре ≥2400 °С фосфор атомизируется, полностью удаляется из аналитической зоны атомизатора потоком аргона и происходит полная очистка печи за один цикл. При использовании разработанной температурно-временной программы нагрева печи (табл. 2) эффект перекомпенсации фонового поглощения не наблюдается.

Результаты определения растворимых форм свинца в образцах почки и печени лабораторных крыс приведены в табл. 3. Правильность полученных результатов подтверждена методом «введено-найденно».

Разработанная методика позволяет определять растворимые формы свинца в фосфатном буферном растворе с пределом обнаружения 0,03 мкг/г с относительным стандартным отклонением, не превышающим 0,2.

Список литературы

1. Корбакова А.И., Соркина Н.С., Молодкина Н.Н., Ермоленко А.Е., Веселовская К.А. Свинец и его действия на организм (обзор литературы). *Медицина труда и промышленная экология* 2001. № 5. С. 29-34. [Korbakova A. I., Sorkina N. S., Molodkina N.N., Ermolenko A. E., Veselovskaya K. A. Lead and its actions on an organism (the review of literature). *Medicine of work and production ecology* 2001. N.5, P. 29-34. (In Russ.)]
2. Крамаренко В.Ф. *Токсикологическая химия*. М.: Книга по Требованию, 2013. 445 с. [Kramarenko V.F. *Toxicological Chemistry*. Moscow: Book on demand, 2013. 445 p. (In Russ.)]
3. *Биохимия* / под ред. Е.С. Северина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 779 с. [Biochemistry. Under Ed. Severina E.S. Moscow: GEHOTAR-MED, 2003. 779 p. (In Russ.)]
4. Чмиленко Ф.А., Саевич О.В. Современные тенденции развития многоэлементного анализа биологических проб. *Вопросы химии и ихимической технологии*. 2013. № 3. С. 152-157. [Chmilenko F.A., Saevich O.V. Modern trends in multi-element analysis of biological samples. *Questions in chemistry and chemical technology* 2013. N. 3, P. 152-157. (In Russ.)]
5. Ivanenko N.B., Ganeev A.A., Solovyev N.D., Moskvin L.N. Determination of trace elements in biological fluids. *Journal of Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 66. № 9. P. 784-799.

6. Иваненко Н.Б., Иваненко А.А., Соловьев Н.Д., Наволоцкий Д.В., Павлова О.В., Ганеев А.А. Определение Al, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Se и Tl в цельной крови без предварительного разложения методом атомно-абсорбционной спектрометрии. *Биомедицинская химия*. 2014. Т. 60(3). С. 378-388. [Ivanenko N.B., Ivanenko A.A., Solovyev N.D., Navolotskii D.V., Pavlova O.V., Ganeev A.A. Determination of Al, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Se and Tl in whole blood by atomic absorption spectrometry without preliminary sample digestion. *Biomedical chemistry* 2014. Vol. 60(3), P. 378-388. (In Russ.)]

7. Лосев В.Н., Мазняк Н.В., Верхотурова А.П., Кутяков В.А., Салмина А.Б. Атомно-абсорбционное определение цинка и свинца в биологических материалах при химико-токсикологических исследованиях. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2016. Т.82(4). С.12-17. [Losev V.N., Maznyak N.V., Verkhoturova A.P., Kutyaakov V.A., Salmina A.B. Atomic Absorbtion Determination of Zinc and Lead in Biological Samples in Chemical and Toxicological Inquiries. *IndustrialLaboratory* 2016. Vol. 82(4), P. 12-17. (In Russ.)]

8. Пупышев А.А. *Атомно-абсорбционный спектральный анализ*. М.: Техносфера, 2009. 784 с. [Pupyshev A.A. Atomicabsorption spectroscopica nalysis. Moscow:Technosphere Publ., 2009. 784 p. (In Russ.)]

9. Захаров Ю.А., Кокорина О.Б., Хасанова С.И., Ирисов Д.С., Хайбуллин Р.Р. Прямое атомно-абсорбционное определение свинца и кадмия в питьевых молочных продуктах с помощью двухстадийной зондовой атомизации в графитовой печи. *Аналитика и контроль* 2013. Т. 17(3). С. 275-280. [Zakharov Y.A., Kokorina O.B., Hasanova S.I., Irisov D.S., Haibullin R.R. Direct atomic absorption determination of lead and cadmium in the liquid milk foods using double-stage probe atomization in the graphite furnace. *Analysis and control* 2013. Vol. 17(3), P. 275-280. (In Russ.)]

10. Zong Y.Y., Parsons P.J., Slavin W. Background overcorrection problems for lead in the presence of phosphate with various metals in Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta* 1994. V. 49B. № 12-14, P. 1667-1680.

11. Скальный А.В. *Химические элементы в физиологии и экологии человека*. М.: Мир, 2004. 216 с. [A.V. Chemical elements in human physiology and ecology. Moscow: World Publ., 2004. 216 p. (In Russ.)]

12. Dahl K, Hald A, Jørgensen P, Martinsen I, Thomassen Y. Short and long term stability of the elemental composition of human body fluid reference materials and their use as master lots. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1990. Vol. 338. P. 526-529.

13. White M.A., Panayi A. Simultaneous Multielement AAS Determination of Trace Elements in Human Body Fluids to Establish Reference Values for European Populations. *Atomic Spectroscopy* 1998. V. 19(3). P. 89-94.

14. Лурье Ю.Ю. *Справочник по аналитической химии*. М.: Химия, 1989. 448 с. [Lurie Y.Y. Analytical Chemistry Handbook. Moscow: Chemistry, 1989. 448 p. (In Russ.)]

15. Новикова М.А., Пушкарев Б.Г., Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Гольдберг О.А., Явербаум П.М. Влияние хронической свинцовой интоксикации на организм человека. *Сибирский медицинский журнал*. 2013. Т. 117(2). С. 13-16. [Novikova M.A., Pushkarev B.G., Sudakov N.P., Nikiforov S.B., Goldberg O.A., Yaverbaum P.M. The effect of persistent lead intoxication on human organism. *Siberian Journal of Medicine* 2013. Vol. 117(2), P. 13-16. (In Russ.)]

16. Lehninger A., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of biochemistry. W. H. Freeman Publ., 2004. 1121 p.

17. Соловьев Н.Д., Иваненко Н.Б., Иваненко А.А., Кашуро В.А. Определение микроэлементов в биологических жидкостях методом ААС-ЭТА с зеемановской коррекцией фона. *Вестник ОГУ 2011. №15 (134). С. 127-130.* [Solovyov N.D., Ivanenko N.B., Ivanenko A.A., Khashuro V.A. Trace elements determination in biological fluids using the ETA-AAS with Zeeman background correction. *Vestnik of OGU 2011. № 15(134), P. 127-130.* (In Russ.)]

18. Zong Y.Y., Parsons P.J., Slavin W. Background correction errors for lead in the presence of phosphate with Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 1998. Vol. 53. N. 6-8. P. 1031-1039.*