

УДК 543.51

МАТРИЧНЫЕ ПОМЕХИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭЛЕМЕНТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

© 2019 г. И. Ф. Серегина^{1, *}, К. Осипов², М. А. Большов^{1,3}, Д. Г. Филатова¹, С. Ю. Ланская¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет
119991 Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Московский физико-технический институт
141701 Россия, Московская обл., Долгопрудный, Институтский переулок, 9

³Институт спектроскопии Российской академии наук
108840 Россия, Москва, Троицк, ул. Физическая, 5

*E-mail: sereginairinaf@mail.ru

Поступила в редакцию 06.03.2018 г.

После доработки 09.08.2018 г.

Принята к публикации 09.08.2018 г.

Обсуждены проблемы выявления и учета спектральных и неспектральных помех, возникающих при определении широкого круга элементов в биологических и фармацевтических образцах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Авторами изучены особенности влияния матричных компонентов на правильность результатов анализа биологических жидкостей и лекарственных средств с использованием квадрупольного масс-спектрометра. Установлены процессы, оказывающие наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала при его измерении на квадрупольном спектрометре Agilent 7500с. Определены основные операционные параметры, ответственные за минимизацию исследуемых неспектральных помех. Изучены различные варианты метода внутреннего стандарта, позволяющего снижать влияние состава образца на результаты определения. Установлена прямая взаимосвязь между различными режимами работы прибора и критериями выбора внутреннего стандарта. Предложены комбинированные подходы к полному устранению неспектральных помех при использовании внешней градуировки. Предложен метод снижения кислотности анализируемого раствора путем сорбционного разделения определяемых элементов и кислоты.

Ключевые слова: матричные помехи, пробоподготовка, внутренний стандарт, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, биологические и фармацевтические образцы.

DOI: 10.1134/S0044450219020117

Современная медицина проявляет все больший интерес к роли химических элементов в жизнедеятельности человека. Основное внимание в настоящее время уделяется их комплексному влиянию на функции организма. Так, на протяжении многих лет клиницисты и экологи активно ведут исследования по определению риска воздействия окружающей среды на здоровье населения. В ходе крупномасштабных мониторингов пытаются не просто выявить присутствие в биологических образцах неорганических экотоксикантов, но и проследить изменение содержания токсичных и эссенциальных элементов в зависимости от внешних факторов. Помимо этого терапевты, хирурги и реаниматологи стремятся установить корреляцию между уровнями концентраций химических элементов и риском возникновения или степенью тяжести заболевания. Успешное ре-

шение этой задачи будет способствовать активному развитию методов медицинской диагностики. Нельзя не отметить и быстро развивающуюся область клинической практики, связанную с разработкой новых лекарственных средств на основе координационных соединений металлов. Большинство из них создается для лечения опухолевых заболеваний разной этиологии. При анализе в целях клинической диагностики и разработки новых препаратов таких сложных образцов, как цельная кровь, сыворотка, моча, волосы, костная ткань ключевым вопросом является правильность определения широкого набора химических элементов. Оптимальным решением проблемы является применение масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП).

Масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой достаточно давно начали использовать в

Таблица 1. Стандартные параметры масс-спектрометра Agilent 7500с

| Параметр | Настройка |
|-----------------------------|--------------------|
| Плазма | |
| Мощность генератора, Вт | 1400–1500 |
| Скорость потока газа, л/мин | |
| Плазмообразующий газ | 15–16 |
| Вспомогательный газ | 0.89 |
| Скорость подачи пробы | 1–1.2 |
| Масс-спектрометр | |
| Разрешение, а.е.м. | 0.7 |
| Вакуум без плазмы, торр | 4×10^{-5} |
| Вакуум с плазмой, торр | 4×10^{-4} |
| Динамическая ячейка | |
| Газ | Гелий |
| Скорость потока, мл/мин | 2–10 |
| Параметры измерения | |
| Время измерения на точке, с | 0.1–0.5 |
| Количество точек на пик | 3 |

клинических лабораториях, занимающихся анализом биологических объектов и разработкой новых фармакологических препаратов на основе координационных соединений металлов. При этом массовое использование этого метода было ограничено высокой стоимостью и сложностью оборудования. Только в 2007 г. было сделано предположение, что МС-ИСП сможет постепенно заменить плазменную и электротермическую атомную абсорбционную спектроскопию (ААС) – в то время основной метод в клинической практике. На сегодняшний день МС-ИСП уже занимает лидирующие позиции в этой области [1, 2], благодаря существенному прогрессу инструментальной базы. Это привело к существенному снижению стоимости МС-ИСП-спектрометров при сохранении несомненных преимуществ: рекордно низких пределов обнаружения химических элементов и изотопов (уровни нг/л и иногда даже пг/л); возможности многоэлементного анализа; широкого (до 10 порядков) динамического диапазона линейности градуировочной характеристики; низкого уровня инструментального измерительного фона (0–10 имп/с); относительной простоты спектров и интерпретации получаемых данных; низкого расхода анализируемого вещества и возможности выполнения анализа образцов минимального объема (~0.1 мл) и массы (~0.1 мг).

Однако, как и любой другой инструментальный метод, МС-ИСП имеет свои недостатки, важнейшими из которых являются так называемые “матричные помехи” – спектральные и не-спектральные. Их влияние на результаты опреде-

ления и методы борьбы с этим влиянием зависят как от типа образца и способа пробоподготовки, так и от класса прибора и его конструкции.

Данный обзор посвящен краткому изложению результатов исследований нашей группы по развитию МС-ИСП-метода анализа биоматериалов и фармакологических препаратов, выполненных в последние 5–7 лет. Обсуждены конкретные методики анализа биоматериалов и фармобъектов различных типов, уделено внимание проблемам проявления матричных эффектов и методам их учета с целью получения правильных результатов определения широкого круга аналитов в биологических образцах и фармакологических препаратах.

Оборудование. Измерения проводили на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500с (Agilent Technologies, США) в режиме непрерывного ввода (для водных растворов) и в режиме измерения нестационарных сигналов (для растворов на основе этилового спирта).

Масс-спектрометр снабжен распылителем Бабингтона (или концентрическим распылителем) и распылительной камерой Скотта, охлаждаемой элементом Пельтье (до 2°С), платиновыми сэмплером и скиммером. Для управления прибором и обработки результатов применяли программное обеспечение ICP-MS ChemStation (версия G1834В). Для формирования стационарной плазмы атмосферного давления использовали аргон высокой чистоты (99.993%; производитель Логика, Россия). Основные параметры прибора приведены в табл. 1. В зависимости от объекта исследований и конкретной аналитической задачи разрабатывали методики МС-ИСП-определения различных наборов аналитов.

Способы устранения матричных помех. Уровни содержания в биологических жидкостях различных элементов – жизненно важных, условно важных, токсичных, а также входящих в состав действующих веществ потенциальных противоопухолевых лекарственных средств – в ходе течения заболевания или лечения представляют большой интерес для современных клиницистов. Однако методики МС-ИСП-анализа достаточно сложны из-за необходимости учета и снижения влияния состава анализируемого образца на результаты определения аналитов. Мы подробно исследовали возможности более простых способов устранения матричных помех за счет выбора оптимальной схемы пробоподготовки, варьирования инструментальных настроек масс-спектрометра, оптимизации методики измерения и обработки аналитических сигналов. В качестве аналитов изучали Р, Мn, Со, Сu, Zn, Ga, As, Se, Cd, Pt и Pb – элементы, выбор которых определялся конкретными

задачами, поставленными клиницистами и разработчиками лекарственных препаратов.

Известно, что основным ограничением возможностей МС-ИСП являются спектральные и неспектральные (матричные) помехи. Влияние последних на результаты определения обычно удается нивелировать, применяя градуировку с подбором матрицы градуировочных растворов, внутренние стандарты (ВС) или сразу оба варианта [3, 4]. Введение ВС – наиболее популярный подход, при этом для этой цели используют различные элементы. Следует отметить, что до начала наших исследований не были выработаны общие критерии выбора ВС. Обычно разные авторы выбирают внутренний стандарт либо по близости атомных масс ВС и аналита, либо по близости их потенциалов ионизации (ПИ). Во многих исследованиях используют несколько ВС для коррекции аналитических сигналов широкого набора определяемых элементов [5]. Важно отметить, что ВС, применяемые в случае прямого разбавления, отличаются от ВС, используемых при кислотной минерализации цельной крови.

Разбавление пробы. Ввиду высокого содержания органической и солевой составляющей биологических образцов, их непрерывный ввод в плазму МС-ИСП-спектрометра невозможен. Перед анализом необходима стадия пробоподготовки, которая является наиболее важной стадией любой методики МС-ИСП-анализа. Различные способы подготовки биологических материалов к МС-ИСП-анализу подробно рассмотрены в обзоре [6]. В настоящее время широко используют два способа пробоподготовки биологических образцов: 1) прямое (простое) разбавление различными реактивами и 2) кислотное разложение. Очевидными преимуществами разбавления являются простота, экспрессность и минимальный риск дополнительного загрязнения пробы. Однако простое разбавление не может быть использовано для перевода в раствор твердых объектов, например тканей, костей и зубов. В этом случае прибегают к кислотной минерализации.

Цельная кровь представляет собой наиболее сложную по составу биологическую жидкость с высоким содержанием как неорганических, так и органических веществ. В качестве пробоподготовки цельной крови для МС-ИСП-анализа можно использовать простое разбавление. Обычно цельную кровь напрямую разбавляют в 10, 20, иногда 50 раз с помощью различных смесей водных растворов Triton X-100, *n*-бутанола, ЭДТА, аммиака или азотной кислоты. На сегодняшний день не существует общепринятой методики выбора того или иного состава разбавителя. В работах [7, 8] исследованы 8 различных вариантов смесей указанных компонентов. Каждый компонент этой смеси играет специфическую роль. Tri-

ton X-100 предохраняет от засорения инжектор горелки, ЭДТА предотвращает осаждение и адсорбцию металлов на стенках пробирки, аммиак разрушает эритроциты, *n*-бутанол способствует удалению аргоновых интерференций на селене, а азотная кислота стабилизирует формы элементов в растворе. Показано, что однозначный выбор разбавителя невозможен. Дело в том, что некоторые компоненты таких смесей негативно влияют на сигналы определенных аналитов. Так, присутствие в растворе 1-бутанола приводит к завышению сигналов Р, As и Se практически в 2 раза за счет переноса заряда с иона углерода. К тому же в аммиачных растворах происходит подавление сигнала платины также в 2 раза, что, вероятнее всего, связано с частичным осаждением этого элемента в щелочной среде. Показано, что при разбавлении смесями, содержащими азотную кислоту, в пробах пациентов с различного рода воспалительными процессами происходит выпадение белков, приводящее к потере до 15–20% всех определяемых элементов. Для пробоподготовки образцов практически здоровых добровольцев рекомендованы смеси Тритон X-100–HNO₃ и Тритон X-100–ЭДТА–HNO₃ (для всех биологических жидкостей) и разбавленная азотная кислота (для мочи). Смесей Тритон X-100–NH₃ и Тритон X-100–ЭДТА–NH₃ подходят для разбавления проб пациентов, если платина не является определяемым элементом [7].

Кислотная минерализация – еще один способ уменьшения влияния органической матрицы. Такой вид пробоподготовки востребован, несмотря на его недостатки: относительную сложность, временные и материальные затраты, повышенный риск дополнительного загрязнения пробы. Обычно для разложения используют конц. HNO₃ и пероксид водорода. Микроволновое излучение часто применяют для интенсификации процесса разложения, при этом для решения каждой конкретной аналитической задачи необходима оптимизация способа программирования температуры и мощности печи. В наших экспериментах использованы микроволновое разложение в автоклаве для уменьшения риска загрязнения исходных образцов и реактивы только марки Suprapur (Merck).

Оптимальные условия окислительной минерализации биологических жидкостей в микроволновом поле выбирали варьированием соотношения реагентов (азотной кислоты и пероксида водорода) и времени выдерживания при максимальной температуре. Кроме этого, для оценки полноты окисления органических веществ использовали дополнительную обработку смеси хлорной кислотой. Установлено, что найденные концентрации аналитов совпадают между собой независимо от условий окислительной минерализации.

Таблица 2. Результаты (мкг/л) определения элементов в цельной крови и моче практически здорового добровольца после разных способов пробоподготовки ($n = 3$, $P = 0.95$)

| Элемент | Кровь | | Моча | |
|---------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | разбавление | минерализация | разбавление | минерализация |
| P* | 450 ± 10 | 340 ± 15 | 1100 ± 30 | 1000 ± 40 |
| Mn | 7.2 ± 0.2 | 7.5 ± 0.3 | <0.1 | <0.1 |
| Co | 0.9 ± 0.1 | 1.0 ± 0.1 | 0.65 ± 0.05 | 0.6 ± 0.1 |
| Cu | 950 ± 10 | 920 ± 20 | 15.0 ± 0.5 | 15.1 ± 0.8 |
| Zn | 5300 ± 100 | 4100 ± 50 | 890 ± 20 | 715 ± 20 |
| Ga | 101 ± 3 | 98 ± 4 | 101 ± 2 | 100 ± 4 |
| As | 9.0 ± 0.3 | 6.7 ± 0.2 | 11.6 ± 0.5 | 8.6 ± 0.6 |
| Se | 110 ± 5 | 80 ± 5 | 37 ± 3 | 29 ± 2 |
| Cd | <0.03 | <0.04 | <0.02 | <0.06 |
| Pt | 97 ± 3 | 78 ± 5 | 86 ± 2 | 70 ± 3 |
| Pb | 10 ± 1 | 9 ± 1 | 1.2 ± 0.1 | 1.0 ± 0.1 |

* Концентрации даны в мг/л.

Сравнение результатов анализа цельной крови и мочи после разных способов пробоподготовки показало несоответствие полученных результатов для элементов P, Zn, As, Se, Pt с относительно высоким первым ПИ ~9.5 эВ (табл. 2). В среднем при окислительной минерализации проб результаты определения этих аналитов занижены на 20–25% по сравнению с полученными при прямом разбавлении. Наши исследования показали, что в зависимости от образца (особенно при анализе цельной крови и мочи пациентов в тяжелом состоянии) это различие может достигать 30–40%.

Очевидно, что в обоих вариантах пробоподготовки и измерения происходит дифференциация исследуемых элементов по ПИ, что приводит к невозможности получения правильных результатов для всего набора аналитов.

Выбор инструментальных параметров. Существенное расхождение результатов при различных способах пробоподготовки связано в основном с так называемым “кислотным эффектом” (acid effect). Действительно, остаточное содержание HNO_3 в растворах после минерализации составляет 7–12%, в то время как кислотность стандартных растворов, используемых для градуировки спектрометра и для его настройки составляет 1–2% HNO_3 . Проявление кислотного эффекта можно объяснить тем фактом, что аэрозоль, образующийся из раствора с высоким содержанием кислоты, может охлаждать плазму, так как полная энергия диссоциации молекулы HNO_3 почти в 2 раза больше, чем молекулы H_2O . Возможное понижение температуры плазмы вызывает падение эффективности ионизации элементов с высоким ПИ, что мы и наблюдали. Расхождение результатов определения наиболее заметно для эле-

ментов с относительно высоким ПИ (Zn – 9.39 эВ и Se – 9.75 эВ) при использовании в качестве внутреннего стандарта элемента с относительно низким ПИ (Rh – 7.46 эВ).

Существует несколько способов устранения кислотного эффекта. Наиболее простым является подбор матрицы градуировочных растворов, аналогичной по кислотности матрице анализируемых образцов. Такой прием неудобен при рутинном анализе большого числа проб различного состава – в каждом конкретном случае необходимо оценивать кислотность раствора аналита и готовить градуировочные растворы с тем же содержанием кислоты. Выпаривание растворов после минерализации до сухого остатка и последующее его растворение, также часто используемое для решения этой проблемы, может приводить к дополнительному загрязнению пробы или потере легколетучих элементов.

Другой способ нивелирования кислотного эффекта – оптимизация мощности генератора и скорости потока газа-носителя при анализе образцов повышенной кислотности (поиск так называемых “эффективных условий”) и выбор подходящего внутреннего стандарта [6]. Этот подход предложен в работах [7, 8] и является наиболее универсальным и простым для рутинного анализа биологических образцов различного состава.

В повседневной аналитической практике перед выполнением цикла экспериментов оператор настраивает спектрометр в режиме “Autotune”. При такой настройке стандартная программа варьирует основные параметры прибора с целью получения максимальной чувствительности во всем диапазоне атомных масс (от Li до U).

Таблица 3. Результаты (мкг/л) анализа стандартных образцов сравнения цельной крови “Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 2” и мочи “Seronorm Trace Elements Urine, Level 2” после применения различных способов пробоподготовки ($n = 3$, $P = 0.95$)

| Элемент | Цельная кровь | | | Моча | | |
|---------|---------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | найдено | | аттестовано | найдено | | аттестовано |
| | разбавление | минерализация | | разбавление | минерализация | |
| P* | 190 ± 10 | 195 ± 15 | 191 | 530 ± 15 | 550 ± 20 | 543 |
| Mn | 30 ± 1 | 26 ± 1 | 29.9 | 11.2 ± 0.5 | 11.1 ± 0.4 | 10.9 |
| Co | 5.9 ± 0.3 | 5 ± 1 | 5.8 | 11 ± 1 | 11 ± 2 | 10.6 |
| Cu | 1450 ± 50 | 1480 ± 90 | 1330 | 23 ± 1 | 23 ± 2 | 22 |
| Zn | 6400 ± 200 | 6750 ± 350 | 6500 | 1270 ± 30 | 1260 ± 50 | 1338 |
| Ga** | 101 ± 3 | 99 ± 4 | 100 | 99 ± 3 | 100 ± 3 | 100 |
| As | 16 ± 2 | 16 ± 3 | 14.3 | 185 ± 10 | 185 ± 15 | 184 |
| Se | 120 ± 5 | 100 ± 10 | 112 | 75 ± 6 | 70 ± 6 | 70.1 |
| Cd | 5.5 ± 0.2 | 5.4 ± 0.6 | 5.8 | 5.0 ± 0.4 | 5 ± 1 | 4.9 |
| Pt** | 99 ± 3 | 100 ± 4 | 100 | 100 ± 3 | 100 ± 3 | 100 |
| Pb | 330 ± 10 | 320 ± 15 | 310 | 89 ± 4 | 90 ± 5 | 90.7 |

* Концентрации даны в мг/л.

** Добавка элемента, эквивалентная 100 мкг/л.

Нами показано, что такая настройка не является оптимальной для снижения влияния кислотного эффекта [9, 10]. Установлено, что выбор так называемых “устойчивых параметров” (мощность генератора и скорость подачи анализируемого раствора газом носителем) позволит существенно снизить влияние кислотности раствора. Обнаружено, что основное значение при подавлении кислотного эффекта имеет выбор скорости потока газа-носителя. При мощности генератора плазмы 1450 Вт интенсивность сигнала анализа существенно увеличивается при понижении скорости потока от 1.2 до 1.0 л/мин. Дальнейшее уменьшение скорости до 0.8 л/мин не приводит к заметному росту интенсивности, однако воспроизводимость сигналов практически всех элементов при этом заметно ухудшается. Очевидно, при увеличении времени нахождения аэрозоля в плазме при низких скоростях эффективность атомизации элементов повышается, а, следовательно, увеличивается поток ионов в масс-спектрометр. Отмечено, что изменение параметров масс-спектрометра влияет на интенсивность сигналов элементов с низкими и высокими ПИ по-разному, однако полностью устранить кислотный эффект только лишь подбором эффективных условий работы прибора не удастся. Тем не менее, обнаружено, что при пониженной скорости потока газа-носителя выбор ВС становится не критичным. В этом случае можно использовать любой и, что наиболее важно, один единственный внутренний стандарт.

Таким образом, установлено [9, 10], что в “стандартном” режиме работы масс-спектрометра с использованием градуировки без подбора матрицы после разбавления и окислительной минерализации биологических жидкостей правильные результаты определения всех аналитов из одного раствора можно получить только в случае применения нескольких ВС, подобранных, исходя из близости ПИ ВС и аналитов. Также показано, что в режиме “устойчивых” параметров природа элемента – внутреннего стандарта, не принципиальна, а значит, можно использовать один любой ВС.

Правильность определения элементов с помощью предлагаемого подхода оценили [10] с использованием образцов сравнения цельной крови “Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 2”, PT-WB1 и IAEA-A-13, а также мочи “Seronorm Trace Elements Urine, Level 2” и “Urine Control lyophilized for Trace Elements Level II”. Найденные после применения различных способов пробоподготовки и аттестованные значения содержания всех элементов совпадают в рамках погрешности измерения (табл. 3).

Снижение кислотности анализируемых растворов. Выше отмечено, что существенной проблемой метода МС-ИСП являются достаточно жесткие ограничения на состав вводимых в плазму растворов. В частности, при введении в плазму растворов с концентрацией кислоты >3 мас. % уменьшается чувствительность определения. Для снижения концентрации кислоты обычно либо разбавляют анализируемый раствор, либо упари-

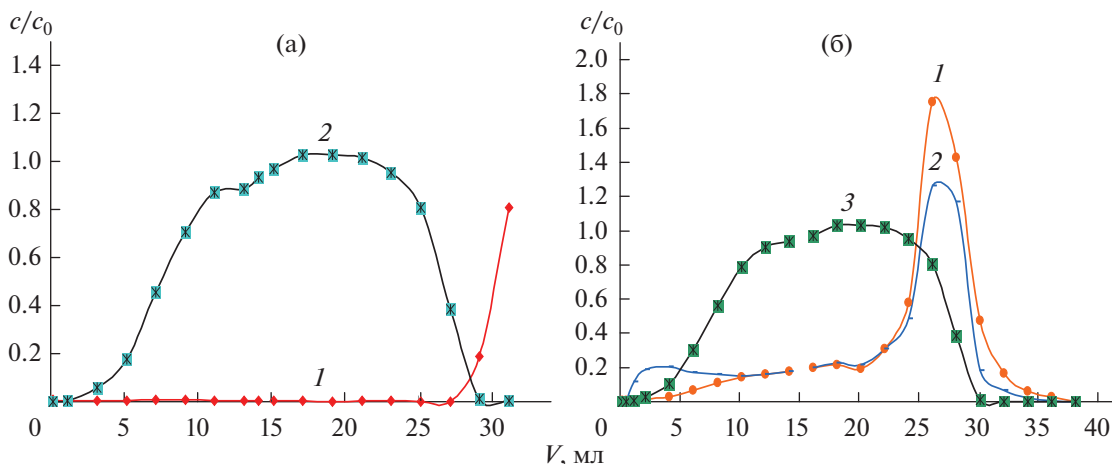


Рис. 1. Выходные кривые Ag (1) и HNO_3 (2) (а); Th (1), U (2) и HNO_3 (3) (б) при сорбции на анионите АВ-17 в NO_3^- -форме и регенерации с анионита деионированной водой. Концентрация элементов – 100 мкг/л.

вают его и сухой остаток растворяют в кислоте нужной концентрации. Оба приема имеют недостатки – при разбавлении пробы повышаются пределы обнаружения элементов; при упаривании возможны загрязнение пробы или потери определяемых элементов. В работе [11] предложено использовать метод разделения кислоты и аналитов при пропускании сильноокислого раствора через сорбенты различной природы. Этот прием успешно используют для решения некоторых технологических задач – извлечения редкоземельных элементов из экстракционной фосфорной кислоты [12] и получения глинозема из растворов кислотной переработки нефелина [13]. Ранее показана [14, 15] принципиальная возможность использования этого метода для определения элементов в костной ткани методом МС-ИСП. Мы провели систематическое исследование разделения азотной кислоты и 39 ионов металлов на анионите АВ-17 и сверхшитом полистироле Стиросорб 584. Определяли Li, Be, Na, Al, K, Ca, Sc, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Y, Zr, Nb, Mo, Ag, Cd, Sb, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Pb, Bi, Th, U. Установлено, что при пропускании раствора с начальной концентрацией 4 М HNO_3 большинство элементов количественно элюируются из колонки с анионитом при пропускании 2–4 мл анализируемого раствора. При этом концентрация HNO_3 в этой аликвоте раствора снижается в 20 раз. Сравнили разделение кислоты и РЗЭ на анионообменном и нейтральном сорбентах. Установлено, что разделение РЗЭ и HNO_3 на нейтральном Стиросорбе 584 происходит более эффективно. Обнаружено аномальное поведение Ag, Pb, Th, U на анионите АВ-17. Эти элементы отсутствуют в элюатах, в которых находятся большинство элементов и кислота. Ag,

Pb, Th, U элюируются только после пропускания четырех колоночных объемов деионированной воды. Рис. 1 иллюстрирует аномальное поведение Ag, Th и U. Найдено, что Na, K, Fe, Al, Li при их содержании в анализируемом растворе 50–1000 мг/л не влияют на степень извлечения РЗЭ. Показана возможность использования способа “замедления кислоты” при определении примесей в HNO_3 х. ч. и металлическом серебре методом МС-ИСП с прямым вводом проб в плазму без разбавления и связанного с этим повышением пределов определения. В то же время метод замедления кислоты не позволяет анализировать сильноокислые растворы с высоким содержанием матричных элементов, таких как Li, Na, Ca, поскольку не происходит разделения матричных и микрокомпонентов. При высоком содержании матричных компонентов метод замедления кислоты следует комбинировать с другими методами разделения.

Анализ проб различного состава. Ниже рассмотрены примеры снижения и/или устранения влияния состава основы на результаты определения аналитов методом МС-ИСП в реальных объектах.

Кровь и моча грудных детей. Совместно с сотрудниками РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Кафедра детских болезней № 2) анализировали кровь и мочу недоношенных детей в возрасте от нескольких дней до 2 мес., страдающих почечной недостаточностью. Также определяли клинически значимые элементы в исходных растворах для диализа и в растворах, полученных после проведения диализа у нескольких пациентов [16, 17]. Анализ микроэлементного состава диализата может быть информативен для оценки микроэлементного статуса организма пациентов в целом. Изучали два способа снижения влияния органических компонентов анализируемых растворов

на результаты определения элементов – микроволновое разложение и простое разбавление 1%-ной HNO_3 в деионированной воде. Показано, что подобные растворы можно анализировать после простого разбавления, избегая длительную стадию микроволнового разложения [16, 17].

Моча, как и жидкость для диализа, также представляет собой высококонцентрированный солевой раствор с заметным содержанием солей органических кислот. Изучали необходимость минерализации и разбавления пробы при анализе мочи. Показано, что мочу можно анализировать без минерализации после разбавления пробы деионированной водой в 10 раз. Для изучения возможных влияний полиатомных ионов на определение элементов методом ионной хроматографии определили содержание сульфат-, хлорид- и нитрат-ионов в моче детей. Отмечено высокое содержание хлоридов и сульфатов, что может мешать определению ^{51}V , ^{53}Cr , ^{75}As , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{66}Zn . В работе [16] показано, что при содержании мышьяка в пробе на уровне n мкг/л хлорид-ионы в концентрации не более 0.01 М не влияют на результат определения мышьяка. Напротив, на правильность результатов определения хрома и ванадия влияет содержание хлорид-ионов уже на уровне 10^{-4} – 10^{-3} М. Сульфат при концентрации не более 0.05 М не мешает определению меди и цинка.

Один из вариантов устранения матричных помех в МС-ИСП – использование динамической реакционной ячейки. Сравнили результаты определения As, Cr и V с использованием динамической ячейки и без нее. Обнаружили, что при содержании мышьяка в моче >10 мкг/л прямой метод определения дает тот же результат, что и метод с использованием динамической ячейки. Вместе с тем реальное содержание хрома и ванадия в моче существенно ниже – меньше 10 мкг/л. Применение динамической ячейки позволило получить правильные результаты определения таких низких содержаний этих элементов в моче.

В работах [16, 17] изучали влияние высоких концентраций матричных элементов на результаты определения ряда элементов в крови, моче и волосах. В моче матричные элементы – это натрий и органические кислоты; в крови – это элементы гомеостаза (натрий, калий, хлорид); в волосах присутствуют высокие концентрации кальция и, особенно, серы (до 5%). Высокие концентрации компонентов матрицы могут быть причиной изменения условий ионизации элементов в плазме и соответственно кривой чувствительности. В связи с этим, помимо влияния полиатомных хлоридсодержащих ионов, мы изучали влияние натрия и калия (до 150 мг/л), кальция и магния (до 50 мг/л), серы (до 500 мг/л) на величину аналитического сигнала определяемых элементов. Калий и магний незначительно завышают сигналы на

массах до ^{53}Cr . На массы тяжелее ^{53}Cr калий и магний не влияют. Кальций при концентрации 50 мг/л и натрий при концентрации 150 мг/л завышают сигналы легких изотопов (Li, Be, B, Al, V) на 20–30%. Наиболее заметно влияет сера, причем по-разному в зависимости от диапазона масс. При концентрации 500 мг/л сера снижает сигналы широкого круга элементов (от Li до Ba) в среднем на 30%.

Правильность определения элементов в волосах проверяли анализом стандартных образцов состава [16, 17]. Поскольку выявлено негативное влияние серы на интенсивность аналитических сигналов элементов, также изучали возможность учета этого влияния с помощью внутреннего стандарта. В качестве внутренних стандартов использовали Sc, Y, Tl. Ни один из указанных элементов не позволил учесть столь заметное влияние серы. При анализе волос только при введении 500 мг/л серы в градуировочные растворы полученные содержания элементов оказались близкими к аттестованным значениям (рис. 2).

В данном случае измерения проводили в стандартном режиме настройки прибора. Выше отмечено, что при таком режиме работы прибора недостаточно одного ВС, необходимо использование градуировочных растворов, близких по матричному составу к анализируемым образцам. Рис. 2 подтверждает этот вывод – введение серы в градуировочные растворы позволило получить правильные результаты анализа.

Биологически активные соединения. Предложенный выше подход позволил расширить возможности метода МС-ИСП и определять химические элементы в органических соединениях. Так, в работе [18] определяли Cu, Zn, Pd, Ag, Pt и Au в синтезированных биологически активных соединениях с целью доказательства отсутствия каталитического эффекта указанных элементов в используемых схемах синтеза замещенных индолов. Масса навески вещества составила 1–2 мг. Кроме того, с помощью метода МС-ИСП изучали распределение мелиттина, меченного рутением, в тканях мышей [19]. Пептиды, меченные рутением с помощью $[(\text{C}_5\text{H}_5)\text{Ru}]^+$, легко идентифицируются масс-спектрометрическим методом. Эта метка меньше по размеру и более устойчива, чем обычно используемые радиоактивные или флуоресцентные метки. Измеряя сигнал на массе ^{99}Ru , изучали биологическое распределение мелиттина в органах и крови мышей.

Выше указано, что предложенный нами подход удобен для рутинного анализа, поскольку позволяет без подбора матрицы градуировочных образцов анализировать различные биологические жидкости. В работе [20] разрабатывали системы доставки Pt-содержащих противоопухолевых препаратов в клетки глиомы. Эффективность

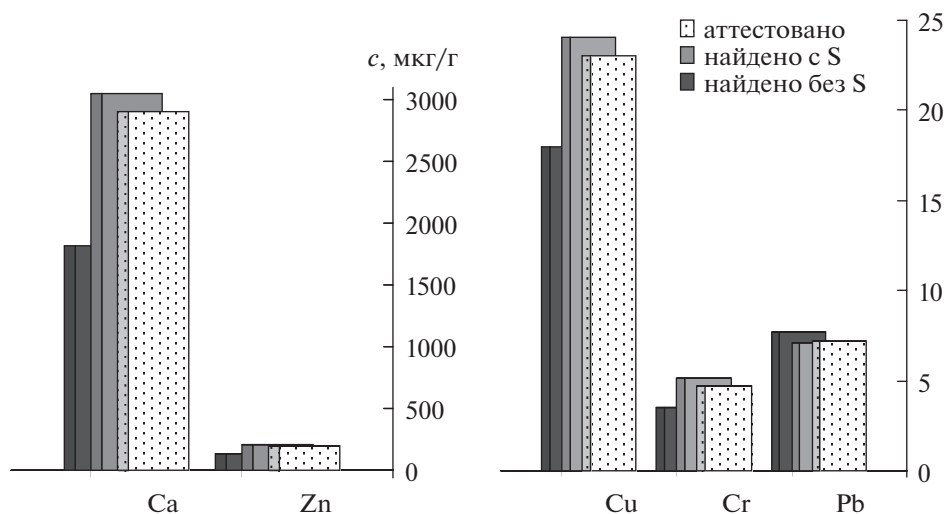


Рис. 2. Результаты определения элементов в стандартных образцах волос с разными способами учета влияния матрицы.

различных транспортных белков, а также сохранность и доступность лекарства контролировали, определяя платину в образцах крови крыс, больных глиомой. Для верификации разработанной схемы доставки лекарства в клетку проанализировали свыше 300 образцов крови. Простое разбавление образцов кров, использование внешней градуировки и работа в режиме “устойчивых параметров” позволили существенно сократить продолжительность анализа.

Галлий и платина в фармпрепаратах. В последние годы все большее внимание уделяют разработке и внедрению металлсодержащих противоопухолевых препаратов, альтернативных платиновым химиотерапевтическим средствам. Эти препараты синтезируют, как правило, с использованием соединений металлов, отсутствующих в организме человека, в частности галлия(III). Важнейшими этапами клинического внедрения перспективного препарата галлия на основе комплекса с 8-оксихинолином является изучение его устойчивости в биологических средах, токсичности, метаболизма, фармакокинетики, путей выведения из организма и т.д. Необходимое для этой цели определение содержания галлия в биологических жидкостях требует применения высокочувствительных методов для надежного клинического контроля. В рамках доклинического исследования нового противоракового препарата на основе 8-гидроксихинолината галлия, поставлена задача разработки подхода к определению галлия в моче, сыворотке крови, модельном секрете тонкого кишечника (фосфатный буферный раствор с добавлением панкреатина) методом МС-ИСП. Такая методика обеспечит клинический контроль содержания металла, соответствующих различным терапевтическим дозам препарата.

На аналитические сигналы ^{69}Ga и ^{71}Ga влияют в основном полиатомные комплексы серы, хлора, фосфора, т.е. элементов, концентрация которых достаточно высока в биологических жидкостях человека. Разработана методика определения галлия в моче, сыворотке крови и соке тонкого кишечника с использованием квадрупольной МС-ИСП. Пределы обнаружения ($c_{\text{мин}}$) Ga, рассчитанные по критерию 3σ , составили 60 нг/л для мочи, 32 нг/л для модельного раствора сока тонкого кишечника и 50 нг/л для сыворотки. Правильность разработанной методики подтверждена методом введено—найдено [21, 22].

Важное значение имеет вопрос о природе фонового сигнала, определяющего величину c_n . Разрешение по массам квадрупольной МС-ИСП не позволяет сделать заключение о том, какой из факторов ограничивает величину c_n : фоновое содержание галлия в биологических растворах или влияние макрокомпонентов реактивов на величину сигналов изотопов галлия. Для решения этой проблемы использовали масс-спектрометр высокого разрешения Element 2. Фоновый сигнал вблизи масс 69 и 71 зарегистрированный на приборе Element 2, приведен на рис. 3.

Сигналы стандартного водного раствора с содержанием галлия, существенно превышающем фоновый (1 мкг/л), расположены на массах 68.926 и 70.925. При определении фоновых сигналов в высокочистой воде, в разбавленной в 50 раз моче и в физиологическом буферном растворе структура фоновых сигналов существенно отличается — они локализованы на массах 68.956 и 70.937. Таким образом, ясно, что фоновые сигналы в анализируемых биологических жидкостях определяются не содержанием галлия, а поли-

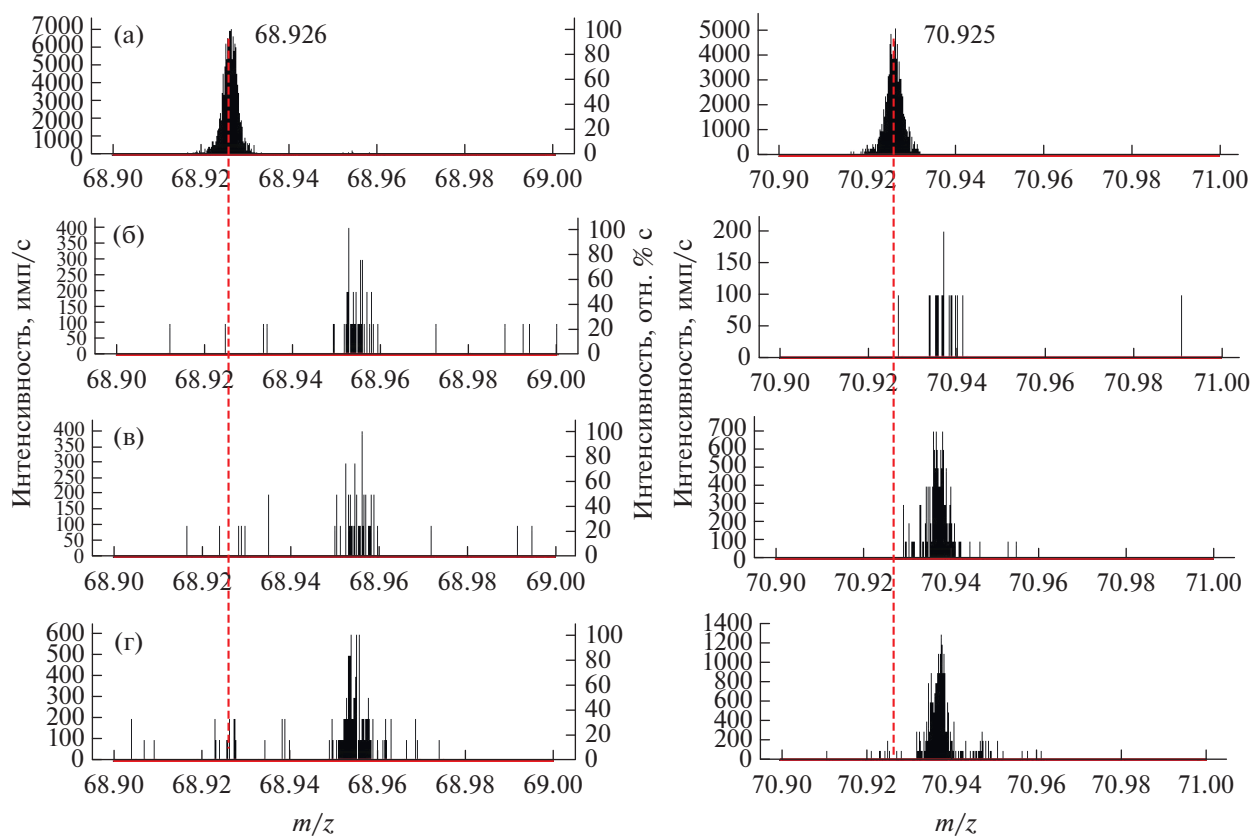


Рис. 3. Спектры высокого разрешения вблизи масс 69 и 71, снятые на приборе Element 2: (а) – раствор сравнения (1 мкг/л Ga); (б) – высокочистая вода; (в) – моча, разбавленная в 50 раз; (г) – фосфатный буферный раствор, разбавленный в 50 раз.

атомными молекулами макрокомпонентов образцов. Расшифровка спектров показала, что сигнал на массе 69 обусловлен присутствием двухзарядных ионов Ba^{2+} , La^{2+} и Ce^{2+} . Учитывая существенно меньшие концентрации церия и лантана по сравнению с барием в биологических жидкостях, можно предположить, что основной вклад вносит именно барий. Показано, что содержание бария 150 мкг/л вносит вклад в сигнал на массе 69, соответствующий 9 мкг/л галлия. Дополнительным подтверждением основного вклада бария в фоновый сигнал на массе 69 является линейная зависимость уровня фона от концентрации бария в растворе. Показано, что фоновый сигнал не определяется такими двухатомными ионами, как $^{33}S^{36}Ar^{+}$, $^{31}P^{38}Ar^{+}$, $^{29}Si^{40}Ar^{+}$, $^{51}V^{18}O^{+}$, $^{52}Cr^{17}O^{+}$ или $^{53}Cr^{16}O^{+}$.

Сигнал фона вблизи массы 71 может быть обусловлен ионами $^{40}Ar^{31}P^{+}$ и $^{35}Cl^{36}Ar^{+}$. Разница масс этих комплексов столь мала, что даже на приборе высокого разрешения невозможно определить долю каждого в общем фоновом сигнале на массе 71. С другой стороны, ионы $^{142}Nd^{2+}$, $^{142}Ce^{2+}$, $^{55}Mn^{16}O^{+}$, $^{53}Cr^{18}O^{+}$, $^{40}Ar^{15}N^{16}O^{+}$ и $^{40}Ar^{14}N^{17}O^{+}$ исключены из числа возможных мешающих ионов

на массе 71. Согласно полученным данным именно полиатомный комплекс $^{31}P^{40}Ar^{+}$ является основным источником фона на массе 71. Таким образом, при использовании квадрупольного масс-спектрометра предел обнаружения галлия в исследуемых биологических жидкостях определяется не содержанием галлия в объектах или используемых реактивах, а мешающим влиянием полиатомных ионов, образованных матричными компонентами проб.

Для изучения биодоступности лекарственного средства и оценки скорости его выведения из организма определена растворимость препарата галлия в растворе, моделирующем сок тонкого кишечника и в моче. Найденные концентрации галлия варьируются от 0.35–0.50 до 1.3–1.5 мкг/л для активного компонента и лекарственной формы соответственно. Нами показано, что извлечение галлия в обе биологические жидкости возрастает в 3 раза при переходе от комплекса к лекарственной форме, т.е. кинетика растворения препарата зависит от его формы.

Связывание металлосодержащих противораковых веществ с белками крови влияет на биодоступность и фармакокинетические свойства пре-

паратов [23]. Отмечено, что связывание и транспорт препарата на основе галлия происходят с помощью трансферрина и альбумина, однако зависимость образования аддуктов от времени и константы связывания не были изучены. Нами исследованы клинические аспекты применения препарата на основе 8-гидроксихинолината галлия [24]. Изучали его связывание с белками сыворотки крови — трансферрином (в апо-форме) и альбумином методом МС-ИСП. При исследовании индивидуальных белков и сыворотки крови установлено, что накопление препарата галлия альбумином и сывороткой происходит быстро (менее чем за 0.5 мин). Трансферрином быстро связывается только 35% галлия и дальнейшее накопление продолжается 48 ч, что обусловлено ступенчатым процессом или образованием различных форм аддуктов металла. Альбумином связывается 10% галлия, трансферрином — 50%, при этом в сыворотке после ультрафильтрации найдено 94% введенного металла. Другие белки сыворотки также участвуют в транспорте препарата. По результатам определений рассчитаны константы связывания аддукта белок—лекарственный препарат: $(1.7 \pm 0.2) \times 10^4$ для трансферрина и $(1.9 \pm 0.8) \times 10^3$ для альбумина, что подтверждает наши данные о том, что доставка лекарственного средства на основе галлия к клеткам опухоли происходит в большей степени с помощью трансферрина, чем других белков крови [24].

В отличие от препаратов на основе галлия, платиновые комплексы преимущественно связываются с альбумином. С помощью метода МС-ИСП после ультрафильтрации белковых фракций определены важные для клинических исследований характеристики этих препаратов, такие как константы связывания с транспортным белком крови, распределение в сыворотке и липофильность [25]. Рассчитанные по результатам измерений константы образования аддукта альбумин—лекарственный препарат составили для различных платиновых комплексов от 10^4 до 10^6 . Показано, что сродство к белку меняется в зависимости от галогенида, входящего в состав комплекса. Так для *цис*-изомеров константа связывания уменьшается в ряду $I^- - Br^- - Cl^-$, для *транс*-изомеров такой закономерности не наблюдали. Выбор препарата, наиболее полно связывающегося с транспортным белком, поможет предотвратить выведение активного компонента из организма. Для разработки препаратов нового поколения необходимо понимание процесса переноса платиновых комплексов через липидный слой клетки. Исходя из полученных значений концентраций платины в органической и водной фазах, сделан вывод о липофильности изученных соединений, при этом *цис*-изомеры обладают большей гидрофильностью, чем соответствующие *транс*-фор-

мы. Показано, что 98% комплекса платины связано с альбумином и лишь незначительные количества препарата находятся в липидной фазе [25]. Таким образом, сочетание разработанных методик МС-ИСП-определения металлов в составе комплексных противораковых препаратов с простой процедурой фильтрации белковых фракций позволяет создать высокопроизводительный инструмент для доклинических исследований новых лекарственных средств.

* * *

Обсуждены проблемы влияния состава пробы на результаты определения широкого набора аналитов в биологических и фармацевтических образцах методом МС-ИСП. Исследованы основные механизмы влияния и предложены методы учета и снижения этого влияния при использовании квадрупольного масс-спектрометра Agilent 7500 с. Установлены основные операционные параметры, ответственные за минимизацию исследуемых неспектральных помех. Изучены различные варианты метода внутреннего стандарта, позволяющего снижать влияние состава образца на результаты определения. Предложены комбинированные подходы к полному устранению неспектральных помех при использовании внешней градуировки. Предложен метод снижения кислотности анализируемого раствора путем сорбционного разделения определяемых элементов и кислоты. Приведены примеры решения конкретных аналитических задач — анализ крови и мочи грудных недоношенных детей, анализ лекарственных противоопухолевых препаратов и механизмов транспорта активных препаратов в клетку, анализ биологически активных соединений.

Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке в рамках программ Президиума РАН 2010–2015 гг. “Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов” и 2015–2017 гг. “Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы” и грантов РФФИ № 12-03-00804 и № 16-03-00428.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Agatemor Ch., Beauchemin D.* Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 706. № 1. P. 66.
2. *Timerbaev A.R.* Recent progress of ICP-MS in the development of metal-based drugs and diagnostic agents // *J. Anal. At. Spectrom.* 2014. V. 29. № 6. P. 1058.
3. *Pei K.L., Kinniburgh D.W., Butlin L., Faris P., Lee D., Marshall D.A., Oliver M.C., Parker R., Powell J.N., Railton P., Smith J.* ORS-ICP-MS method for monitoring trace levels of cobalt and chromium in whole blood samples from hip arthroplasty patients with metal-on-

- metal prostheses // Clin. Biochem. 2012. V. 45. № 10–11. P. 806.
4. *Gajek R., Barley F., She J.* Determination of essential and toxic metals in blood by ICP-MS with calibration in synthetic matrix // Anal. Methods. 2013. V. 5. P. 2193.
 5. *Batista B.L., Rodrigues J.L., Nunes J.A., Oliveira Souza V.C., Barbosa Jr.F.* Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 639. № 1–2. P. 13.
 6. *Ossipov K., Seregina I.F., Bolshov M.A.* Inductively coupled plasma mass spectrometry in the analysis of biological samples and pharmaceutical drugs // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 4. P. 335.
 7. *Tromp J.W., Pomares M., Alvarez-Prieto M., Cole A., Ying H., Salin E.D.* Exploration of robust operating conditions in inductively coupled plasma mass spectrometry // Spectrochim. Acta B. 2003. V. 58. № 11. P. 1927.
 8. *Agatemor Ch., Beauchemin D.* Towards the reduction of matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry without compromising detection limits: The use of argon–nitrogen mixed-gas plasma // Spectrochim. Acta B. 2011. V. 66. № 1. P. 11.
 9. *Осинов К.Б., Серегина И.Ф., Большов М.А.* Устранение матричных неспектральных помех при элементном анализе биологических жидкостей на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 2. С. 1.
 10. *Осинов К.* Исследование и устранение неспектральных помех при анализе биологических жидкостей и лекарственных средств методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Автореферат дис. ... канд. хим. наук. М. МГУ, 2015. 25 с.
 11. *Seregina I.F., Perevoznik O.A., Bolshov M.A.* Acid retardation method in ICP-MS analysis of strongly acidic solutions // Talanta. 2016. V. 159. P. 387.
 12. *Хамизов Р.Х., Крачак А.Н., Груздева А.Н., Болотоков А.А., Хамизов С.Х., Смирнов А.Н., Жижулева Т.И.* Сорбционное концентрирование и выделение РЗЭ из экстракционной фосфорной кислоты // Сорбц. хроматогр. процессы. 2012. № 1. С. 29.
 13. *Хамизов Р.Х.* Сорбционный метод “удерживания кислоты”. Некоторые технологические возможности по разделению электролитов // Сорбц. хроматогр. процессы. 2013. № 5. С. 600.
 14. *Подгорная Е.Б., Крачак А.Н., Хамизов Р.Х.* Использование сорбционного способа разделения растворов кислот и их солей в системах с двумя жидкими фазами для решения проблем пробоподготовки в анализе // Сорбц. хроматогр. процессы. 2011. Т. 11. № 1. С. 99.
 15. *Подгорная Е.Б., Бурова О.И., Радилов А.С.* Использование сорбционного способа удерживания кислоты в системах с двумя жидкими фазами для решения проблем пробоподготовки в элементном анализе методом ИСП-МС. // Сорбц. хроматогр. процессы. 2013. № 5. С. 618.
 16. *Серегина И.Ф., Ланская С.Ю., Окина О.И., Большов М.А., Ляпунов С.М., Чугунова О.Л., Фоктова А.С.* Определение химических элементов в биологических жидкостях и диагностических субстратах детей методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой // Журн. аналит. химии. 2010. Т. 65. № 9. С. 986.
 17. *Seregina I.F., Lanskaya S.Yu., Bolshov M.A.* Detection of the essential and toxic elements in child biological substrates by ICP-MS technique // Trace Elements in Medicine. 2010. V. 11. № 2. P. 14.
 18. *Andreev I.A., Ratmanova N.K., Novoselov A.M., Belov D.S., Seregina I.F., Kurkin A.V.* oxidative dearomatization of 4,5,6,7-tetrahydro-1h-indoles obtained by metal- and solvent-free thermal 5-endo-dig cyclization: The route to Erythrina and Lycorine alkaloids // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. № 21. P. 7262.
 19. *Perekalin D.S., Novikov V.V., Pavlov A.A., Ivanov I.A., Anisimova N.Yu., Kopylov A.N., Volkov D.S., Seregina I.F., Bolshov M.A., Kudinov A.R.* Selective Ruthenium Labeling of the Tryptophan Residue in the Bee Venom Peptide Melittin // Chem. Eur. J. 2015. V. 21. № 13. P. 4923.
 20. *Shein S.A., Kuznetsov I.I., Abakumova T.O., Chelushkin P.S., Melnikov P.A., Korchagina A.A., Bychkov D.A., Seregina I.F., Bolshov M.A., Kabanov A.V., Chekhonin V.P., Nukolova N.V.* VEGF- and VEGFR2-targeted liposomes for cisplatin delivery to glioma cells // Mol. Pharm. 2016. V. 13. № 11. P. 3712.
 21. *Filatova D.G., Seregina I.F., Foteeva L.S., Pukhov V.V., Timerbaev A.R., Bolshov M.A.* Determination of gallium originated from a gallium-based anticancer drug in human urine using ICP-MS // Anal. Bioanal. Chem. 2011. V. 400. P. 709.
 22. *Филатова Д.Г., Серегина И.Ф., Осинов К.Б., Фотеева Л.С., Пухов В.В., Тимербаев А.Р., Большов М.А.* Определение галлия в биологических жидкостях методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. № 2. С. 119.
 23. *Timerbaev A.R., Pawlak K., Gabbiani C., Messori L.* Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics // Trends Anal. Chem. 2011. V. 30. № 7. P. 1120.
 24. *Ossipov K., Foteeva L.S., Seregina I.F., Perevalov S.A., Timerbaev A.R., Bolshov M.A.* Metallomics for drug development: Serum protein binding and analysis of an anticancer tris(8-quinolinolato)gallium(III) drug using inductively coupled plasma mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 785. P. 22.
 25. *Ossipov K., Scaffidi-Domianello Y.Y., Seregina I.F., Galanski M., Keppler B.K., Timerbaev A.R., Bolshov M.A.* Inductively coupled plasma mass spectrometry for metallodrug development: Albumin binding and serum distribution of cytotoxic cis- and trans-isomeric platinum(II) complexes // J. Inorg. Biochem. 2014. V. 137. P. 40.