

УДК 543.05, 543.51
©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОНЦИЯ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И МОЧЕ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

Т.С. Уланова, О.В. Гилева, Е.В. Стенно, Г.А. Вейхман, А.В. Недоштова*

¹Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82; эл. почта: veikhman_ga@mail.ru

Приведены параметры масс-спектрометрического определения стронция в цельной крови и моче детей, проживающих вблизи месторождения целестиновых руд, содержащих до 20% сульфата стронция. Среднегрупповое содержание стронция в цельной крови двух групп детей составило $109,52 \pm 11,07$ мкг/л и $131,62 \pm 12,95$ мкг/л, что значительно выше уровня группы сравнения $44,2 \pm 4,24$ мкг/л. Среднегрупповое содержание стронция в моче составило $1252,3 \pm 332,2$ мкг/л и $1341,5 \pm 241,8$ мкг/л, что значительно превышает уровень группы сравнения $296,4 \pm 61,5$ мкг/л. Оптимизированы условия подготовки проб крови и мочи, позволяющие снизить погрешность измерения и определять стронций на уровне референтных концентраций. Правильность результатов подтверждена анализом стандартных образцов Seronorm™ Whole Blood L1, L2, L3 и Seronorm™ urine.

Ключевые слова: метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), октопольная реакционно/столкновительная ячейка, внутренний стандарт, стронций, цельная кровь, моча

DOI: 10.18097/PBMC20156105613

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения воздействия стронция на человека обусловлена наличием на территории Российской Федерации и Пермского края крупных месторождений, обуславливающих высокое содержание этого элемента в природных источниках водоснабжения, почвах и растениях. На юго-востоке Пермского края в 50 км от города Кунгур в верховьях реки Сытва находится Мазуевское месторождение целестиновых руд, обеспечивающее стронциевыми концентратами металлургические, химические, электротехнические и другие предприятия Урала.

Известно, что накопление стронция в организме приводит к дистрофическим изменениям костно-суставной системы особенно в период роста и развития организма (формируется симметричный деформирующий остеопороз из-за торможения роста костей со стороны метаэпифизарных хрящей [1]. С учётом известных данных о повышенной распространённости заболеваний костно-мышечной системы и соединительной ткани у детей г. Кунгур целью данного исследования было точное и достоверное количественное определение содержания стронция в крови и моче методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) для диагностики и оценки риска здоровью детей.

МЕТОДИКА

Количественное определение стронция в образцах крови и мочи осуществляли на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7500cx (США) с октопольной реакционной ячейкой. Мощность генератора плазмы 1550 Вт. Для введения проб использовалась двухканальная распылительная камера Скотта. Температура распылительной камеры $2,0^{\circ}\text{C}$. Скорость подачи образца в распылительную камеру составляла 0,4 мл/мин. В качестве газа-реактанта использовали гелий высокой чистоты 99,99% (ТУ-0271-135-31323949). Скорость работы детектора была ≤ 100 мкс на 1 ион. Для настройки использовали раствор ${}^7\text{Li}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{89}\text{Y}$ и ${}^{205}\text{Tl}$ в 2% азотной кислоте с концентрацией 1 мкг/л для каждого элемента ("Tuning Solution", США). Соотношения ${}^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / {}^{140}\text{Ce}^+$ составляли $< 1\%$, а для ${}^{140}\text{Ce}^{2+} / {}^{140}\text{Ce}^+$ $< 3\%$. Использовался жидкий аргон высокой чистоты 99,99% (ТУ-2114-005-00204760-99). Максимальная скорость потока аргона составляла 20 л/мин, давление в канале подводки газа 700 ± 20 кПа, $T_{\text{плазмы}} = 8000-10000$ К. В качестве основного стандартного раствора использовали раствор, содержащий 27 элементов с концентрацией 10 мг/л в 5% водном растворе азотной кислоты (Multi-Element Calibration Standard-2A, США). Для приготовления

* - адресат для переписки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОНЦИЯ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И МОЧЕ

градуировочных растворов и подготовки проб использовали особо чистую HNO_3 (“Sigma-Aldrich”, США). Концентрации градуировочных растворов для определения стронция составляли 0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0 мкг/л. Для приготовления растворов внутреннего стандарта (ВС) использовали комплексный стандартный раствор ^{209}Bi , ^{73}Ge , ^{115}In , ^6Li , ^{48}Sc , ^{159}Tb , ^{89}Y с концентрацией 10 мг/л в 5% водном растворе азотной кислоты (“Internal Standard Mix”, США).

Все растворы разбавляли деионизированной водой с удельным сопротивлением 18,2 Мом·см, очищенной в системе Milli-Q Integral (“Millipore SAS”, Франция). Холостую пробу готовили аналогично рабочей. Для подготовки к анализу лабораторной посуды из стекла, тефлона, полипропилена использовали ультразвуковую мойку Elmasonic S 100H (Германия). Посуду выдерживали 20 мин в бидистиллированной воде при 55°C, далее 20 мин в водном растворе азотной кислоты (1:5) при 55°C, далее 20 мин в деионизированной воде при 55°C. Отбор проб крови осуществлялся из вены в вакуумные пробирки из полипропилена с напылением лития гепарина (“PUTH”, Китай). Отбор проб утренней мочи производили в стерильные полипропиленовые контейнеры на 125 мл с винтовой крышкой (“F.L.Medical S.r.l.”, Италия).

Определение содержания стронция в образцах цельной крови и мочи осуществляли на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500сх с октопольной ячейкой в реакционном режиме. Использование реакционной/столкновительной ячейки (ORS) позволяет избавиться от влияния полиатомных ионов за счёт их столкновений или реакций с атомами газа, заполняющими ячейку. В качестве газа-реактанта нами использовался гелий. Измерение аналитического сигнала осуществляли при скорости потока гелия 5,0 мл/мин, что позволяет значительно снизить полиатомные наложения при сохранении высокого уровня чувствительности.

Как сообщалось ранее [2], при использовании МУК 4.1.1483-03 [3] при анализе биосред мы столкнулись с некоторыми сложностями. Возникла необходимость детализировать подготовку биоматериала к анализу, поскольку из-за высокого содержания углерода в матрице, он не полностью сгорает в плазме и осаждается на горелке, распылителе и на деталях ионной оптики. Микроволновый способ пробоподготовки крови позволяет радикально устранить влияние матрицы, но значительно увеличивает время анализа, поэтому в настоящее время нами используется следующий метод: к пробе крови объёмом 0,1-0,2 мл добавляли

0,1 мл комплексного раствора ВС и 0,2-0,4 мл концентрированной HNO_3 плотностью 1,40 г/см³. Пробирку с содержимым взбалтывали и оставляли на 2-3 ч до гомогенизации. Затем доводили содержимое пробирки до 10 мл деионизированной водой и центрифугировали 10 мин при 2700-3000 об/мин на центрифуге ЦИМН-Р10-01-“Элекон” (Россия). Данный способ кислотного растворения позволяет значительно сократить время, затрачиваемое на подготовку проб крови для анализа и приготовить одному оператору 60-70 проб.

Для анализа мочу разбавляли в 10 раз: к 0,5 мл мочи добавляли 4,45 мл 1% водного раствора HNO_3 и 0,05 мл раствора внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта для определения ^{88}Sr использовали ^{73}Ge , входящий в Internal Standard Mix.

Оптимальный комплекс параметров настройки масс-спектрометра Agilent 7500сх с октопольной ячейкой, способ подготовки проб крови и мочи, выбор внутреннего стандарта позволяет определять Sr в крови в диапазоне 10-1000 мкг/л и в моче в диапазоне 50-1500 мкг/л с относительной погрешностью при $p=0,95$ от 12 до 20%. Разработанная нами методика измерения массовых концентраций 12 химических элементов в биосредах (кровь, моча) методом ИСП-МС зарегистрирована в Федеральном информационном фонде и внесена в ФР.1.31.2014.17064.

Для контроля результатов анализа использовали стандартные образцы крови SERONORM L1-L3 (“Sero AS”, Норвегия) и мочи SeronormTM urine (LOT 0511545, “Sero AS”). Результаты приведены в таблице 1.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о допустимом % погрешности между найденными и аттестованными значениями.

Обследовано 110 детей (47% девочек и 53% мальчиков) двух детских дошкольных учреждений (ДДУ №8 и 23) г. Кунгур (группы наблюдения 1 и 2) и 54 ребенка (51% девочек и 49% мальчиков), постоянно проживающих на условно чистой территории п. Сива Пермского края (группа сравнения). В подавляющем большинстве случаев (95% в основной группе и 77,6% в группе сравнения) семьи использовали для питья водопроводную воду без предварительной очистки. Возраст обследованных детей составил 3-7 лет.

Биомедицинские исследования выполняли в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических

Таблица 1. Аттестованные и найденные средние значения содержания стронция в стандартных образцах крови и мочи SeronormTM, мкг/л.

Уровень	Аттестованное значение/ среднее, мкг/л	Найденное среднее значение, мкг/л	Погрешность от среднего, %
Seronorm TM urine(n=3)	106-110/108	109,13	0,9
Seronorm TM blood L1(n=5)	25,7-27,9/26,8	23,13	13,7
Seronorm TM blood L2(n=5)	25,1-27,7/26,4	28,5	8,1
Seronorm TM blood L3(n=5)	27-29/28	26,1	6,8

Таблица 2. Сравнительная оценка содержания стронция в крови и моче (мкг/л) детей групп наблюдения и сравнения.

Показатель	Группа наблюдения 1 (n=60)	Группа наблюдения 2 (n=50)	Группа сравнения (n=54)	Германия, 2006	Референтный уровень
Стронций (кровь)	109,52±11,07	131,62±12,95	44,2±4,24	20 (10-77)	12 (7-25)
Стронций (моча)	1252,3±332,2	1341,5±241,8	296,4±61,5	154 (9-560)	115 (27-220)

исследований, изложенных в Хельсинской Декларации 1975 года с дополнениями 1983 года и национальным стандартом РФ ГОСТ-Р 52379-2005. От каждого законного представителя ребенка, включенного в выборку, получено письменное информированное согласие на добровольное участие в биомедицинском исследовании, выполненном специалистами ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения на базе мобильного консультативно-диагностического отделения и клиники в период 2012–2013 гг. Общее число обследованных детей составляет 164.

Результаты определения содержания стронция в крови и моче детей представляли как среднее арифметическое ± ошибка средней в мкг/л. Статистическую достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$ (таблица 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В крови детей групп наблюдения 1 и 2 г. Кунгур зарегистрированы превышения содержания стронция относительно группы сравнения п. Сива в 2,5 и 3 раза ($p_1=0,002$ и $p_2=0,001$), а в моче установлены превышения в 4,2 и 4,5 раза ($p_{1,2}=0,0001$). Следует заметить, что не обнаружено достоверных отличий между содержанием стронция в моче детей групп наблюдения 1 и 2 г. Кунгура ($p=0,657$), в то время как наблюдается достоверное отличие в содержании стронция в крови ($p=0,012$). В таблице 2 приведены референтные уровни содержания стронция по данным компании ALS Scandinavia и результаты биомониторинга детей Германии [4]. Содержание стронция в крови и моче детей групп наблюдения превышены почти в 10 раз.

Родители детей групп наблюдения достоверно чаще указывали на наличие у детей болей в суставах и костях (12,9% против 3,5% группы сравнения, $p=0,01$). У детей из групп наблюдения в 3,1 раза чаще, чем в группе сравнения диагностировались случаи высокорослости (21,5%),

в 1,5 раза дисгармоничного физического развития (33,6%). Нарушения опорно-двигательного аппарата встречались в 3 раза чаще, чем в группе сравнения (62,9% против 21% соответственно, $p=0,001$) и были представлены нарушением осанки (84,6% против 33,3% в группе сравнения, $p=0,012$), ускоренным созреванием костей (27% и 7% соответственно). Таким образом, детское население г. Кунгур, проживающее вблизи стронциевых месторождений и использующих воду из наземных источников, подвержено риску различных заболеваний костно-мышечной системы.

ВЫВОДЫ

1. Предложены максимально простые варианты пробоподготовки биосред, подобраны оптимальные режимы работы масс-спектрометра Agilent 7500сх с октопольной ячейкой для рутинного анализа образцов крови и мочи.

2. Обнаружено достоверное превышение концентраций стронция в крови и моче детей г. Кунгур по отношению к группе сравнения и референтным уровням.

ЛИТЕРАТУРА

1. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов /Под ред. Калетиной Н.И. (2008), М: Геотар-Медиа, 1016 с.
2. Уланова Т.С., Гилева О.В., Стенно Е.В., Вейхман Г.А. (2014) Биомед. химия, **60**, 109-114.
3. Методы контроля. Химические факторы. (2003) Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной аргонной плазмой. МУК 4.1.1483-03. М.
4. Heitland P., Koster H.D. (2006) Clinika Chimika Acta, **365**, 310-318.

Поступила: 24. 09. 2014.

DETERMINATION OF STRONTIUM CONTENT IN WHOLE BLOOD AND URINE BY ICP-MS

T.S. Ulanova, O.V. Gileva, E.V. Stenno, G.A. Veikhman, A.V. Nedochitova

Federal Scientific Center for Medical and Prophylactic Health Risk Management Technologies,
82 Monastyrskaya str., Perm, 614045 Russia; e-mail: veikhman_ga@mail.ru

Parameters of strontium determination in the whole blood and urine of children living near ore deposits containing up to 20% strontium sulfate have been determined.

The average strontium content in the whole blood of two children groups of 109.52 ± 11.07 $\mu\text{g/L}$ and 131.62 ± 12.95 $\mu\text{g/L}$, significantly exceeded the level in the comparison group 44.2 ± 4.24 $\mu\text{g/L}$. The average strontium contents of two groups of children in urine were 1252.3 ± 332.2 $\mu\text{g/L}$ and 1341.5 ± 241.8 $\mu\text{g/L}$, these values were 4.2 and 4.5 times higher than in the comparison group 296.4 ± 61.5 $\mu\text{g/L}$. The conditions for blood and urine sample preparation were optimized to reduce measure errors and to determine strontium at the reference concentration level. The accuracy of the results has been confirmed by analysis of the standard samples SeronormTM Whole Blood L1, L2, L3 and SeronormTM Urine.

Key words: mass spectrometry, inductively coupled plasma, reaction/collision cell, internal standard, strontium, whole blood, urine