

На правах рукописи



Осипов Константин

**ИССЛЕДОВАНИЕ И УСТРАНЕНИЕ НЕСПЕКТРАЛЬНЫХ ПОМЕХ ПРИ
АНАЛИЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО
СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ имени М.В.Ломоносова).

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Большов Михаил Александрович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Плетенева Татьяна Вадимовна
Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии

кандидат химических наук
Карандашев Василий Константинович
ФГБУН «Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов Российской академии наук» (ИПТМ РАН), заведующий лабораторией ядерно-физических и масс-спектральных методов анализа

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО «Кубанский государственный университет»**

Защита состоится «13» мая 2015 г. в 16 ч. 30 мин. в ауд. 446 на заседании диссертационного совета Д 501.001.88 по химическим наукам при МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В.Ломоносова, Химический факультет.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В.Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (<http://www.chem.msu.ru>). Текст автореферата размещен на сайте ВАК при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.88,
кандидат химических наук



Моногорова О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современная медицина проявляет всё 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 клиницистами и экологами активно проводятся исследования по определению риска воздействия окружающей среды на здоровье населения. В ходе крупномасштабных мониторингов пытаются выявить не только присутствие в биологических образцах неорганических экотоксикантов, но и проследить изменение содержания жизненно важных элементов в зависимости от внешних факторов, а также обнаружить взаимно однозначные соответствия между содержанием химических элементов в организме и риском возникновения или степенью тяжести заболевания. В случае успеха последнее обстоятельство способствует развитию методов медицинской диагностики и лечения (т.н. элементная диагностика). Нельзя не отметить и быстро развивающуюся область клинической практики, касающейся разработки новых лекарственных средств на основе координационных соединений металлов. Большая их часть создается для лечения опухолевых заболеваний разной этиологии.

Безусловно, во всех отмеченных выше случаях возникает необходимость правильного определения широкого набора химических элементов в сложных и разнообразных по составу биосубстратах: цельной крови, сыворотке и плазме крови, моче, волосах, тканях. Оптимальным решением данной проблемы является применение масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП). Высокая чувствительность, возможность проведения многоэлементного анализа в широком диапазоне концентраций, использование для измерения малого количества исследуемого материала предопределили лидерство МС-ИСП в данной области. Тем не менее, основным ограничением метода являются матричные помехи – спектральные и неспектральные.

Не смотря на то, что за последние 20 – 30 лет накоплен большой опыт определения элементов в биологических образцах методом МС-ИСП, а также разработаны конкретные способы борьбы со спектральными наложениями, для учета неспектральных помех предложены и широко используются лишь неуниверсальные, трудоемкие и времязатратные приемы (дополнительное разбавление, метод добавок, подбор матрицы градуировочных растворов). Недооцененными в аналитической практике остаются инструментальные способы их устранения. Применение метода внутреннего стандарта осложнено отсутствием четких критериев выбора элемента на эту роль. Положение еще больше усугубляется за счет того, что каждый тип масс-спектрометров (отличающийся по конфигурации или по конструкции) обладает своими специфическими особенностями и требует разработки собственной стратегии получения правильных результатов. Именно поэтому на сегодняшний день отсутствуют конкретные методики анализа любых биологических матриц на любом приборе.

В связи с вышесказанным, особенно важной и перспективной представляется разработка универсальных подходов к устранению неспектральных помех для наиболее простых и дешевых приборов с квадрупольным масс-фильтром. Именно такие масс-спектрометры чаще всего используют в современной клинической практике.

Цель работы состояла в исследовании неспектральных матричных помех, возникающих при элементном анализе биологических жидкостей и биологически активных комплексов галлия и платины с помощью квадрупольного масс-спектрометра, и разработке подхода к их учету и устранению для обеспечения максимально простой процедуры массовых анализов проб различного состава.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих **задач**:

- предварительно оценить вклад спектральных помех в аналитический сигнал при анализе растворов на спектрометре с квадрупольным масс-фильтром;
- количественно оценить уровни неспектральных помех при разбавлении и окислительной минерализации биологических жидкостей;
- исследовать возможность полного устранения неспектральных помех за счет изменения режимов работы прибора;
- установить критерии выбора внутреннего стандарта (ВС) для учета неспектральных помех в разных режимах работы масс-спектрометра;
- оценить возможность применения единственного элемента в качестве внутреннего стандарта;
- проверить применимость разрабатываемых подходов при анализе реальных клинически значимых матриц.

Научная новизна. Впервые систематически изучены особенности формирования неспектральных помех при анализе растворов биологических жидкостей и лекарственных средств с использованием квадрупольного масс-спектрометра в стандартной комплектации.

Установлены процессы, оказывающие наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала при его измерении на приборе Agilent 7500с: процессы, протекающие при подаче пробы (поступление образца в распылитель, образование и транспортировка аэрозоля), а также процессы, происходящие непосредственно в плазме (испарение, атомизация, ионизация). Предположено, что процессы экстракции ионов из плазмы, формирования первичного ионного пучка и его изменения в интерфейсе и высоковакуумной части не играют существенной роли ввиду конструкционных особенностей ионной оптики данного масс-спектрометра.

Определены основные операционные параметры (мощность генератора и скорость потока аргона через распылитель), ответственные за минимизацию исследуемых неспектральных помех. Показана ключевая роль потенциала на линзе-экстракторе в компенсации частичного падения чувствительности определения при уменьшении скорости потока аргона через распылитель.

Впервые установлена прямая взаимосвязь между различными режимами работы прибора и критериями выбора внутреннего стандарта.

Предложено два равнозначных комбинированных подхода к полному устранению исследуемых неспектральных помех при использовании градуировочных растворов, приготовленных в 1 об.% HNO_3 : 1) измерение в «стандартном» режиме работы прибора (после автоматической настройки на максимальную чувствительность) с использованием ВС, подобранных исходя из близости первых потенциалов ионизации (ПИ) элемента и аналита, или 2) анализ в режиме «устойчивых» параметров с применением в качестве ВС одного единственного элемента независимо от его атомной массы и ПИ.

Практическая значимость работы. Разработаны универсальные подходы к устранению неспектральных помех, возникающих при определении элементов в подготовленных разными способами биологических жидкостях, обеспечивающие максимально простую процедуру массовых анализов образцов данного вида вне зависимости от их конкретного состава и происхождения. Установлена возможность и определены границы применимости данных подходов при анализе других клинически значимых матриц (волос, специализированного лечебного питания, солянокислых и октанол-этанольных растворов платины). Правильность определения элементов во всех случаях подтверждена с помощью анализа стандартных образцов сравнения или методом «введено-найдено». Эффективность предлагаемых подходов для рутинного анализа биологических образцов на квадрупольном масс-спектрометре доказана при проведении исследования биологических жидкостей пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма, а также изучения свойств некоторых координационных соединений галлия и платины, предложенных в качестве действующих веществ новых противоопухолевых лекарственных средств.

На защиту выносятся:

- вклады основных видов неспектральных помех в искажение результатов анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки;
- результаты изучения влияния операционных параметров работы масс-спектрометра и конструкции распылителя на устранение неспектральных помех;
- критерии выбора внутреннего стандарта в двух исследуемых режимах работы прибора;
- оптимальные условия анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки, пригодные для осуществления простой процедуры массового анализа;
- оптимальные условия пробоподготовки биологических жидкостей (как разбавления, так и окислительной минерализации), способствующие минимальному влиянию матрицы анализируемых растворов на результаты определения;
- результаты исследования применимости предлагаемых подходов к устранению неспектральных помех при анализе клинически значимых матриц;

– результаты применения разработанных подходов в клинической практике при исследовании реальных образцов биологических жидкостей пациентов и установлении некоторых свойств действующих веществ новых противоопухолевых лекарственных средств.

Апробация результатов. Основные результаты исследований доложены на XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2012, Москва, Россия), Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием (2012, Краснодар-Туапсе, Россия), IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой (2013, Уфа-Абзаково, Россия), Международной конференции «XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale» (2013, Тромсе, Норвегия).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав экспериментальной части, выводов и списка литературы (193 библиографические ссылки). Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков и 28 таблиц.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезиса докладов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **Главе 1** представлен обзор литературы, первый раздел которого посвящен применению масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в клинической практике. В разделе рассмотрены конкретные примеры использования метода в анализе биологических жидкостей и разработке лекарственных средств на основе координационных соединений металлов. При этом дана критическая оценка не только условий пробоподготовки, но и подходов к устранению неспектральных матричных помех, являющихся одним из главных недостатков МС-ИСП. Отмечено, что предлагаемые в статьях способы решения этой важной проблемы не систематизированы, а четкие рекомендации, касающиеся критерия выбора внутреннего стандарта исходя из близости его атомной массы и/или ПИ, отсутствуют.

В связи с этим в следующем разделе подробно описаны три основных причины возникновения неспектральных помех: влияния кислоты, сопутствующих элементов и органических веществ. Уделено внимание природе их возникновения, подчеркнуты сложность и многообразие механизмов их проявления, а также представлены альтернативные варианты их минимизации преимущественно инструментальными способами. Сделан вывод о малой вероятности полного устранения данных помех только за счет оптимизации работы масс-спектрометра (поиска вместо «стандартных» значений операционных параметров так называемых «устойчивых» значений этих величин – англ. *robust conditions*).

Поэтому в последней части обзора более подробно разобран метод внутреннего стандарта, часто применяемый в качестве дополнительного способа нивелирования

влияния матричных компонентов. Еще раз установлено, что рекомендации, касающиеся критерия выбора внутреннего стандарта исходя из близости его атомной массы и/или ПИ, как и мнения о возможности применения одного единственного элемента в качестве ВС без дополнительного использования математического аппарата очень противоречивы.

Содержание **Главы 2** составляет описание применяемых в работе реагентов, материалов, оборудования и методик экспериментов.

В качестве объектов исследования выступали пробы биологических жидкостей практически здоровых добровольцев и пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма, стандартные образцы сравнения цельной крови «Serorm Trace Elements Whole Blood» (Level 2, Serorm, Норвегия), PT-WB1 (Jožef Stefan Institute, Словения) и IAEA-A-13 (AQCS, Австрия), стандартные образцы сравнения мочи «Serorm Trace Elements Urine» (Level 2, Serorm, Норвегия) и «Urine Control lyophilized for Trace Elements» (Level II, ClinChek, Германия), стандартный образец сравнения волос GBW07601 (National Research Centre for Certified Reference Materials, Китай), специализированное лечебное питание для восстановления после операций «Nutrison» (Nutricia Advanced Medical Nutrition, Danone, Нидерланды), а также металлокомплексы: 8-гидроксихинолилат галлия(III) (Faustus Translational Drug Development AG, Австрия), цисплатин (Sigma-Aldrich, США) и синтезированные в Институте неорганической химии Венского университета (Австрия) (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропаноноксими-κN)платины(II).

Для надлежащей пробоподготовки биологических объектов или исследования свойств координационных соединений металлов использовали концентрированные азотную (65%, «for analysis», Merck, Германия) и соляную (30%, «Suprapur», Merck, Германия) кислоты, пероксид водорода (30%, «Suprapur», Merck, Германия), гидроксид тетраметиламмония, ТМАОН (25%, «ос.ч», Sigma-Aldrich, США), 4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил)фенилполиэтиленгликоль, Тритон X-100 («SigmaUltra», Sigma-Aldrich, США), 1-бутанол («LiChrosolv», Merck, Германия), динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, Na₂ЭДТА («for analysis», Merck, Германия), раствор аммиака (>25%, «for analysis», Sigma-Aldrich, США), 1-октанол (≥99%, «Chromasolv for HPLC», Sigma-Aldrich, США), «технический» этиловый спирт, лиофилизированные человеческие сывороточные альбумин и трансферрин (холо- и апо-формы), а также сыворотку крови человека «Sera human S2257» (все Sigma-Aldrich, США).

С целью изучения спектральных помех моделирование элементного состава биологических жидкостей осуществляли с помощью стандартных одноэлементных растворов 1 г/л Na, K, Mg, Ca, Ba, Mo, P и S (High-Purity Standards, США), а также растворов глюкозы («ос.ч», Sigma-Aldrich, США), азотной, соляной и плавиковой кислот (все «for analysis», Merck, Германия). Для имитирования солевой и органической матрицы биологических жидкостей при изучении их влияния на сигналы определяемых элементов использовали раствор Рингера (Эском, Россия), искусственную по солевому составу мочу (смесь солей NaCl, KCl, Na₃C₆H₅O₇, Na₂SO₄,

NH_4Cl , NaH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, все «ос.ч», Sigma-Aldrich, США), а также растворы глицина и карбамида/мочевины (все «ос.ч», Sigma-Aldrich, США).

С целью интенсификации окислительной минерализации образцов использовали микроволновую систему Ethos Microwave Labstation (Milestone, Италия). Ультразвуковую (УЗ) экстракцию и растворение координационных соединений металлов осуществляли с помощью УЗ ванны Sonorex RK 100H (Bandelin, Германия).

МС-ИСП измерения проводили с использованием квадрупольного масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500c (Agilent Technologies, США) в двух режимах: в режиме непрерывного ввода (для водных растворов) и в режиме измерения нестационарных сигналов (для растворов на основе этилового спирта). Масс-спектрометр был снабжен распылителем Бабингтона (или концентрическим распылителем) и распылительной камерой Скотта, охлаждаемой элементом Пельтье (до 2°C), платиновыми саплером и скиммером. Природу фонового сигнала галлия исследовали на масс-спектрометре высокого разрешения Element 2 (Thermo Scientific, США). Подачу растворов на основе этилового спирта в масс-спектрометр осуществляли с помощью проточно-инжекционной системы, состоящей из ручного инжектора Rheodyne 9740 (США), дозирующей РЕЕК петли на 20 мкл (Agilent Technologies, США) и насоса для высокоэффективной жидкостной хроматографии серии I (Аквилон, Россия). В качестве раствора-носителя использовали 1 об.% HNO_3 .

Представленные в данной **Главе** методики экспериментов представляли собой детальное описание процессов приготовления растворов внутреннего стандарта, градуировочных растворов и растворов, моделирующих матричный состав для изучения несектральных помех, хранения и пробоподготовки исследуемых образцов несколькими способами, исследования свойств металлокомплексов.

Глава 3 посвящена разработке наиболее простых с точки зрения исполнения подходов к устранению несектральных помех для обеспечения массовых МС-ИСП анализов биологических жидкостей и координационных соединений металлов. Стратегия работы предполагала разработку таких подходов сначала на примере анализа биологических жидкостей, а затем распространение их применения на другие клинически значимые матрицы. В качестве аналитов выступали жизненно важные (P, Mn, Co, Cu, Zn и Se), условно важные (As), токсичные (Cd и Pb), а также входящие в состав потенциальных противоопухолевых лекарственных средств (Ga и Pt) элементы, выбор которых обусловлен конкретными задачами, поставленными медиками и разработчиками лекарственных средств.

В первом разделе этой **Главы** представлены основные результаты предварительных экспериментов. В рамках этих экспериментов оценивали вклады возможных спектральных помех в аналитический сигнал, выбирали подходящие условия разбавления и окислительной минерализации биологических жидкостей, сравнивали результаты определения исследуемых элементов после различной пробоподготовки, а также выявляли основные источники обнаруженных

несоответствий. Все наблюдаемые и описанные закономерности получали с применением распылителя Бабингтона при непрерывным вводе пробы после автоматической настройки масс-спектрометра на максимальную чувствительность, т.е. в «стандартном» режиме работы (мощность генератора – 1450 Вт, скорость потока аргона через распылитель – 1,20 л/мин, глубина отбора пробы – 8 мм, потенциал на линзе-экстракторе – 3 В), при использовании Rh в качестве ВС и градуировочных растворов, приготовленных в 1 об.% HNO₃.

В ходе оценки максимально возможных спектральных наложений, обусловленных присутствующими в растворах матричными компонентами, было показано, что использование ⁶³Cu, ⁶⁹Ga и ⁷⁷Se при работе на квадрупольном масс-спектрометре без столкновительной или реакционной ячейки нецелесообразно из-за заметного вклада в их сигналы наложений ⁴⁰Ar²³Na⁺, ¹³⁸Ba²⁺ и ⁴⁰Ar³⁷Cl⁺, соответственно. При выборе других изотопов необходимо количественно учитывать вклад, создаваемый мешающими компонентами матрицы. В качестве определяемых изотопов были использованы ³¹P, ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁶⁵Cu, ⁶⁸Zn, ⁷¹Ga, ⁷⁵As, ⁸²Se, ¹¹¹Cd, ¹¹⁴Cd, ¹⁹⁴Pt, ¹⁹⁵Pt, ¹⁹⁶Pt, ²⁰⁶Pb и ²⁰⁸Pb.

При исследовании влияния состава разбавителей биологических жидкостей на результаты определения рассматривали восемь различных вариантов смесей Тритона X-100, 1-бутанола и ЭДТА в аммиачной или азотнокислой среде. Показано, что однозначный выбор разбавителя осуществить не удастся из-за негативного влияния некоторых компонентов таких смесей на сигналы определенных аналитов. Так, установлено, что присутствие в растворе 1-бутанола приводит к завышению сигналов P, As и Se практически в 2 раза за счет увеличения степени ионизации данных аналитов, причиной которого может являться перенос заряда с иона углерода. Также обнаружено, что в аммиачных растворах наблюдается двукратное подавление сигнала платины, что, вероятнее всего, связано с частичным осаждением этого элемента в основной среде. Помимо этого, доказано, что разбавление проб крови и мочи пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма смесями, содержащими азотную кислоту, приводит к потере до 15 – 20% всех определяемых элементов за счет осаждения белков. Таким образом, рекомендованными для использования в случае пробоподготовки образцов практически здоровых добровольцев могут быть смеси Тритон X-100 – HNO₃ и Тритон X-100 – ЭДТА – HNO₃ (для всех биологических жидкостей) и 1 об.% HNO₃ (для мочи). Смесей Тритон X-100 – NH₃ и Тритон X-100 – ЭДТА – NH₃ подходят для разбавления проб пациентов, если платина не является аналитом.

Для поиска оптимальных условий окислительной минерализации биологических жидкостей под действием микроволнового излучения варьировали соотношение используемых реагентов (азотной кислоты и пероксида водорода) и время выдерживания при максимальной температуре. Кроме этого, для оценки полноты окисления органических веществ была использована дополнительная обработка разлагаемой смеси хлорной кислотой. Установлено, что измеряемые концентрации аналитов совпадают между собой в широком диапазоне условий окислительной

минерализации, поэтому исследуемые биологические образцы было решено переводить в раствор в первоначально предложенных условиях.

Сравнение результатов анализа цельной крови и мочи практически здорового добровольца после различной пробоподготовки выявило несоответствие полученных содержаний для элементов с относительно высоким первым потенциалом ионизации (ПИ Р, Zn, As, Se, Pt $\geq 9,0$ эВ, табл. 1). Действительно, в среднем при окислительной минерализации проб результаты определения этих аналитов занижены на 20 – 25% относительно тех, что получены при разбавлении. Дополнительное изучение образцов биологических жидкостей пациентов с разного рода воспалениями показало, что подобное расхождение может достигать и 30 – 40% в зависимости от пробы. Обращает на себя внимание также тот факт, что при определении фосфора в моче обнаруженное различие проявляется в меньшей степени (занижение всего на 10%), что, безусловно, связано с дополнительным разбавлением проб перед измерением концентрации этого элемента. Помимо этого, результаты определения платины в моче однозначно указывают на наличие неспектральных матричных помех как при разбавлении, так и при минерализации. В обоих случаях установленные концентрации ниже введенного значения 100 мкг/л, что может свидетельствовать об отсутствии завышения сигналов элементов с высоким ПИ за счет переноса заряда при анализе растворов с повышенным содержанием углерода. Тем не менее, проверка данного факта для остальных аналитов все же необходима, так как ПИ платины самый низкий в этой группе элементов.

Таблица 1. Результаты определения элементов в цельной крови и моче практически здорового добровольца после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	ПИ, эВ	Концентрация, мкг/л			
		Кровь		Моча	
		разбавление	минерализация	разбавление	минерализация
P*	10,5	450 ± 20	340 ± 25	1100 ± 30	1000 ± 40
Mn	7,4	7,2 ± 0,2	7,5 ± 0,3	<0,1	<0,1
Co	7,9	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,65 ± 0,05	0,6 ± 0,1
Cu	7,7	950 ± 30	920 ± 50	15,0 ± 0,7	15 ± 1
Zn	9,4	5300 ± 200	4100 ± 250	890 ± 20	715 ± 30
Ga**	6,0	101 ± 3	98 ± 4	101 ± 2	100 ± 4
As	9,8	9 ± 1	6 ± 1	11,6 ± 0,6	8,6 ± 0,7
Se	9,8	110 ± 5	80 ± 5	37 ± 3	29 ± 3
Cd	9,0	<0,03	<0,04	<0,02	<0,06
Pt**	9,0	97 ± 3	78 ± 5	86 ± 2	70 ± 3
Pb	7,4	10,0 ± 0,3	9,5 ± 0,4	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1

* – концентрации в мг/л

** – добавка элемента, эквивалентная 100 мкг/л

Очевидно, что в выбранных условиях пробоподготовки и измерения за счет различного влияния матрицы исследуемых растворов на сигналы аналитов происходит их дифференциация по ПИ. Это приводит к невозможности получения правильных результатов для всего набора определяемых элементов.

Наиболее вероятными мешающими компонентами, оказывающими такое воздействие, могут быть неорганические соли и органические соединения (прежде всего, общий углерод) цельной крови и мочи, а также искусственно вводимая при окислительной минерализации азотная кислота. Для оценки вкладов всех трех возможных источников помех были рассчитаны или определены максимальные содержания этих компонентов и приготовлены адекватные синтетические растворы, имитирующие соответственно солевой, органический и кислотный составы цельной крови и мочи после различной пробоподготовки (**табл. 2**). При этом, количественно влияние каждой конкретной матрицы было охарактеризовано с помощью величины ΔR^* ($\Delta R^* = ([I(M)/I(BC)]_x / [I(M)/I(BC)]_{1\%} - 1) \cdot 100\%$). Она показывает, насколько относительный сигнал в исследуемой матрице x по сравнению с 1 об.% HNO_3 отличается от 100%. Очевидно, что чем сильнее влияние матрицы на сигнал, тем больше эта разница. В **табл. 2** приведены значения величины $-\Delta R^*$ для всех возможных вариантов матриц, образующихся после используемых в работе способов пробоподготовки (растворы 1-11).

Таблица 2. Значения величины $-\Delta R^*$ для элементов с ПИ $\geq 9,0$ эВ в модельных растворах ($n = 3, P = 0,95$)

Модельные растворы		$-\Delta R^*, \%$					
№	Состав	P	Zn	As	Se	Cd	Pt
1	раствор Рингера* (1:10)	5±2	7±2	5±1	5±1	6±1	5±1
2	раствор Рингера (1:30)	2±1	3±1	1±1	2±1	1±1	1±1
3	смесь солей** (1:5)	10±3	11±2	10±1	9±2	9±2	11±1
4	смесь солей (1:10)	4±1	5±2	4±2	5±1	6±1	5±1
5	глицин 8 г/л	1±1	2±1	1±1	1±1	2±1	1±1
6	карбамид 9 г/л	4±1	5±2	5±2	6±1	5±1	4±1
7	15 об.% HNO_3	25±2	25±3	27±2	25±2	24±2	23±2
8	2+7	27±2	28±2	28±2	30±4	24±2	24±3
9	4+7	33±3	32±2	31±2	32±2	33±3	30±4
10	1+5	6±3	7±2	6±2	7±2	5±1	7±1
11	3+6	14±2	15±1	15±2	14±3	15±2	13±2

* – раствор Рингера содержит, г/л: NaCl – 8,6; KCl – 0,3; CaCl₂ – 0,25

** – смесь солей содержит, мМ: Na₃C₆H₅O₇ – 1,3; NaCl – 3,2; KCl – 2,2; NH₄Cl – 0,8; CaCl₂ – 0,3; MgSO₄ – 0,25; NaHCO₃ – 0,15; Na₂SO₄ – 1,3; NaH₂PO₄ – 0,4; Na₂HPO₄ – 0,1

Согласно данным **табл. 2**, действительно при использовании обоих способов пробоподготовки имеет место занижение результатов определения элементов, что было ранее явно установлено на примере определения платины в моче (**табл. 1**). При этом в разбавленных растворах подавление сигналов аналитов слабее по сравнению с минерализованными пробами. Величина $-\Delta R^*$ составляет в среднем 5 – 15% в случае разбавления (растворы **10** и **11**) по сравнению с 24 – 33% при минерализации (растворы **8** и **9**). Доминирующим в первом случае оказывается влияние солей (сравнить величины $-\Delta R^*$ для растворов **1, 5** и **10** или **3, 6** и **11**). В то время как на определяемые в минерализованных пробах концентрации наибольшее воздействие оказывает кислота (сравнить величины $-\Delta R^*$ для растворов **2, 7** и **8** или **4, 7** и **9**). Однако недооценивать вклад других веществ, составляющих основу образца, при определении элементов в моче также нельзя: присутствие мочевины в растворах **6** и **11** или относительно высокое содержание солей в случае **4** и **9** в меньшей степени, но все же способствуют искажению результатов. Особо следует отметить и тот факт, что все рассматриваемые влияния, а точнее их проявления, имеют аддитивный характер (сравнить величины $-\Delta R^*$ для растворов **2, 7** и **8**; **4, 7** и **9**; **1, 5** и **10** или **3, 6** и **11**). Это приводит к усугублению ситуации при совместном присутствии различных компонентов матрицы. Кроме того, различие в результатах анализа между двумя видами пробоподготовки составляет 17 – 23%, что вполне соответствует выводам, сделанным из данных **табл. 1**. Подтверждение находит и факт отсутствия переноса заряда с иона C^+ на все эти элементы: значения величин ΔR^* для всех растворов отрицательны.

Одним из приемов борьбы с рассматриваемыми эффектами является дополнительное разбавление. Такой подход, однако, нецелесообразно использовать при анализе диагностических проб, так как в этом случае невозможно одновременное определение элементов с различным их содержанием (0,2 – 9000 мкг/л).

Наблюдения, сделанные на основе результатов предварительных экспериментов, позволяют четко сформулировать проблему, возникающую при клинических исследованиях. В установленных автоматически программой масс-спектрометра условиях измерения с применением одного ВС даже при учете всех возможных спектральных интерференций, используя градуировку без подбора матрицы, после различной пробоподготовки биологических жидкостей невозможно правильное определение всего исследуемого набора элементов из одного раствора.

В связи с этим, в следующем разделе этой **Главы** основное внимание уделяли собственно разработке подходов к устранению неспектральных помех. Она включала в себя исследование их минимизации за счет подбора инструментальных настроек прибора или замены распылителя и выработку четкой рекомендации, касающейся критерия выбора внутреннего стандарта исходя из близости его атомной массы и/или ПИ с изучением возможности применения одного единственного ВС.

Оптимизацию операционных параметров работы масс-спектрометра (поиск «устойчивых» их значений) осуществляли путем варьирования мощности генератора, скорости потока аргона через распылитель, глубины отбора пробы и потенциала на

линзе-экстракторе при фиксированной практически минимальной скорости подачи пробы в распылитель, равной 0,10 оборот/с. В качестве модельных применяли растворы исследуемых элементов в 4 матрицах: 0,4% NaCl, 8 г/л глицина, 9 г/л карбамида и 15 об.% HNO₃ без использования ВС, чтобы оценить абсолютный вклад в минимизацию рассматриваемых помех только инструментальной настройки прибора. При этом как и прежде, была обнаружена дифференциация аналитов по ПИ. Для удобства они были условно разделены на две группы: элементы с относительно низким, меньшим 9,0 эВ (Mn, Co, Cu, Ga и Pb) и с относительно высоким, приблизительно равным или большим 9,0 эВ (P, Zn, As, Se, Cd и Pt) первым потенциалом ионизации. Внутри каждой такой группы величины относительного занижения сигнала аналита в исследуемой матрице по сравнению с 1 об.% HNO₃ – **R** ($R = I(M)_x / I(M)_{1\%} \cdot 100 \%$), используемого в качестве основного критерия выбора «устойчивых» значений операционных параметров, не различались более чем на 5%, поэтому на всех графиках, представленных ниже, по оси ординат отложены их усредненные значения. Ввиду того, что зависимости для различных матриц имеют схожий вид (кроме глицина в некоторых случаях), на **рис. 1** они приведены только для 15 об.% HNO₃.

Как видно из **рис. 1а**, максимальные значения величина **R** приобретает при высоких мощностях, которые способствуют помимо увеличения температуры плазмы и более эффективному переносу энергии внутри нее от периферии к центральному каналу. Так как заметной разницы в минимизации влияния сопутствующих компонентов, а также чувствительности определения в интервале мощностей 1450 – 1550 Вт нет, и учитывая факт увеличения доли двукратно заряженных ионов при повышенных мощностях в качестве «устойчивой» была оставлена исходная мощность – 1450 Вт.

К нивелированию неспектральных помех также приводит уменьшение скорости потока аргона через распылитель (**рис. 1б**). Несмотря на то, что полностью, как и в случае оптимизации мощности генератора, устранить эти эффекты для всех изотопов не удастся, для каждой конкретной матрицы существует такое значение этого параметра, при котором разделение элементов на группы по ПИ исчезает. Такой величиной для раствора 15 об.% HNO₃ (как и для остальных матриц, за исключением глицина) является скорость 1,00 л/мин (а не стандартная 1,20 л/мин). Объяснением этому наблюдению могут быть повышение температуры плазмы за счет меньшей ее загрузки компонентами матрицы и увеличение времени нахождения пробы в высокотемпературной зоне за счет ее смещения в сторону инжектора горелки. Все это способствует не только более эффективной ионизации элементов с относительно высоким ПИ при анализе растворов сложного состава, но и подавлению ион-электронной рекомбинации таких аналитов в присутствии легко ионизируемых элементов. Тем не менее, ввиду того, что чувствительность определения с уменьшением рассматриваемого параметра падает, в качестве «устойчивой» была выбрана пограничная скорость потока аргона через распылитель, при которой для всех матриц уже отсутствует дифференциация элементов (1,00 л/мин). Интенсивности

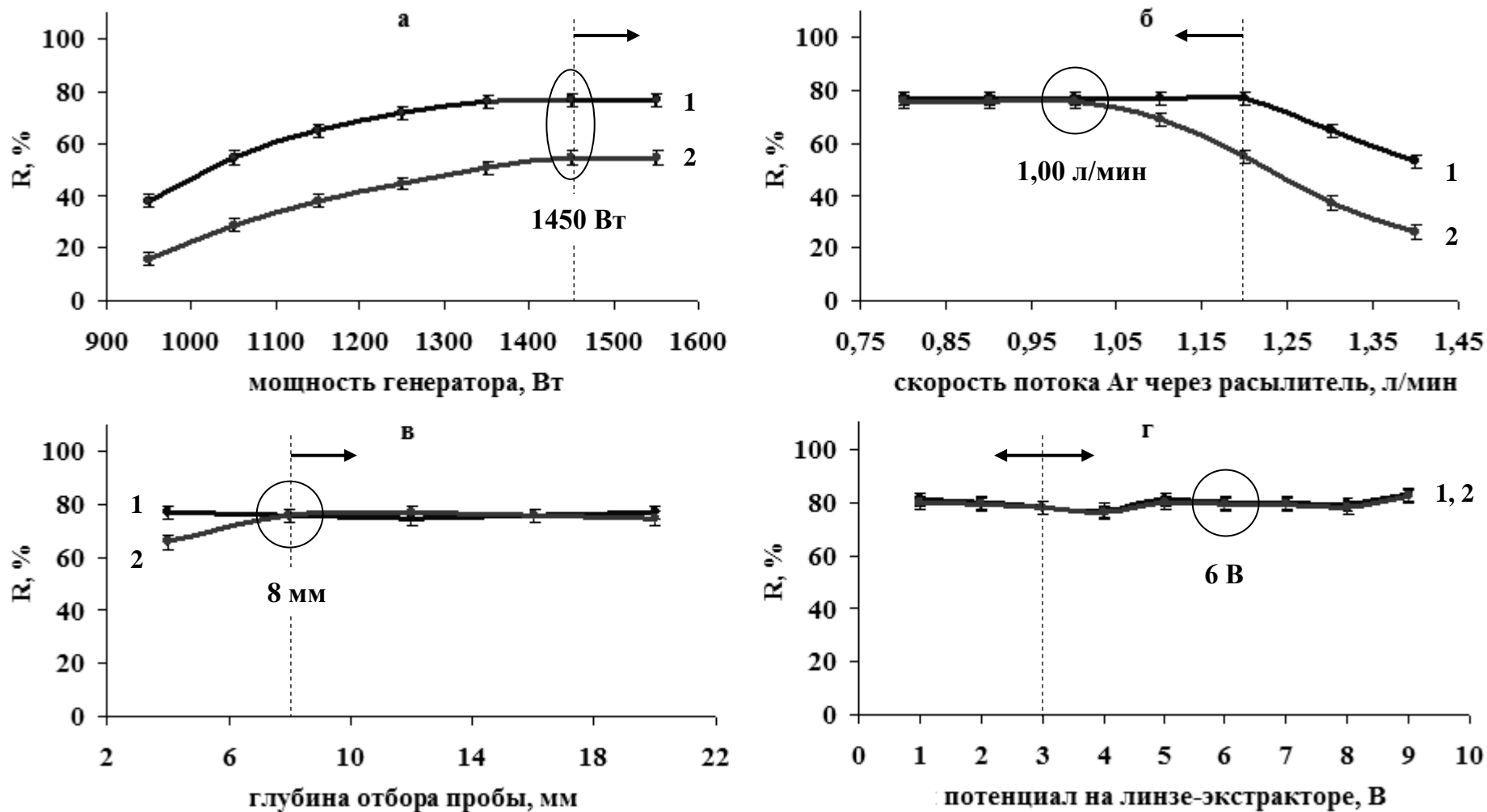


Рис. 1. Зависимость величины **R** для элементов с ПИ < 9,0 эВ (цифра 1) и ≥ 9,0 эВ (цифра 2) от мощности генератора (а), скорости потока аргона через распылитель (б), глубины отбора пробы (в) и потенциала на линзе-экстраторе (г) в 15 об.% HNO₃ (n = 3, P = 0,95)

линиями отмечены: пунктирной – «стандартные», замкнутой – «устойчивые» значения операционных параметров

сигналов аналитов в этом случае уменьшаются всего в 2 – 3 раза, что заметно меньше для некоторых изотопов, чем при 0,8 л/мин (4 – 15 раз).

Недостатком ранее выбранных условий является низкая чувствительность. Ее увеличение возможно за счет уменьшения глубины отбора пробы. Однако при расстояниях между катушкой и сэмплером менее 8 мм значения величины **R** для элементов с относительно высоким ПИ падают на несколько процентов (до 10% при 4 мм, **рис. 1в**). Возможно, это происходит за счет того, что при уменьшении расстояния между сэмплером и срезом горелки отбор ионов происходит из области плазмы с меньшей температурой, что сказывается на степени ионизации элементов с высоким ПИ. Таким образом, исходя из необходимости сохранения одинакового поведения всех аналитов, было принято решение не изменять установленное автоматически значение глубины отбора (8 мм).

Варьирование потенциала на линзе-экстракторе во всем исследуемом диапазоне (задание отрицательных значений не осуществлялось ввиду существенного падения чувствительности) никаким образом не влияет на значения величины **R** для всех рассматриваемых элементов (**рис. 1г**). Однако при этом наблюдается значительный (в сторону более положительных потенциалов с 3 до 6 В) сдвиг максимума зависимости интенсивности абсолютного сигнала. В качестве примера на **рис. 2** приведен подобный график для селена (элемента с высоким ПИ) в растворе 15 об.% HNO₃. В случае остальных аналитов в этой же или других матрицах обнаруженные закономерности схожи. Таким образом, становится очевидным, что с целью повышения чувствительности определения элементов (в среднем в 1,5 – 2 раза), следует дополнительно проводить оптимизацию потенциала на линзе-экстракторе. В связи с этим, в качестве оптимального потенциала было выбрано его значение, равное 6 В.

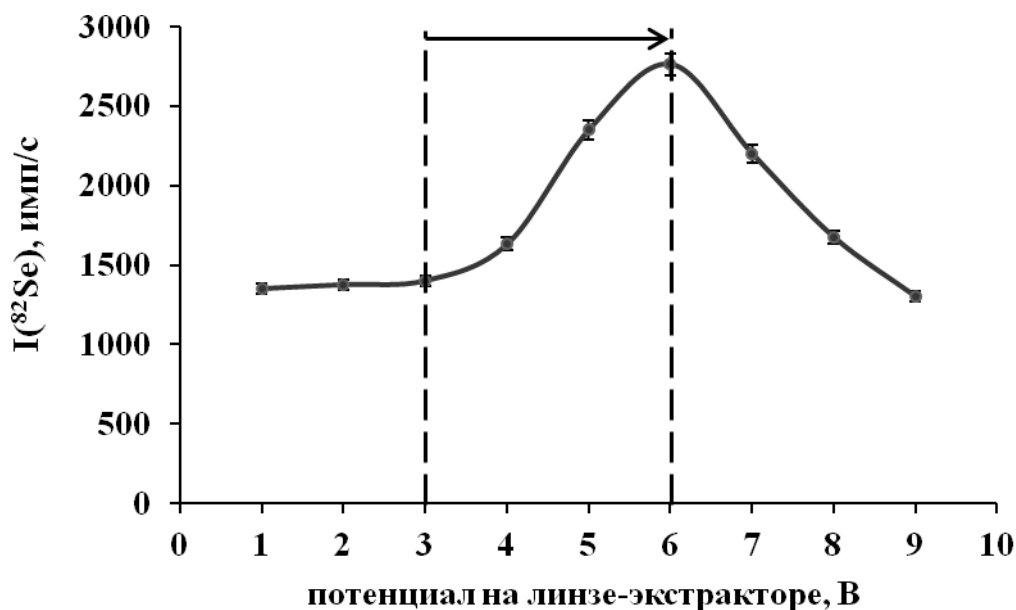


Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала ⁸²Se от потенциала на линзе-экстракторе при «устойчивых» параметрах работы прибора в 15 об.% HNO₃ (n = 3, P = 0,95)

Результаты проведенной аналогичным образом оптимизации параметров работы прибора во всех четырех матрицах с применением концентрического распылителя подтверждают все исследуемые выше закономерности, полученные с использованием распылителя Бабингтона. Установлено, что операционные настройки масс-спектрометра отличаются в обоих режимах измерения для двух распылителей только по скоростям потока аргона через распылитель, и то незначительно (на 0,05 л/мин). При этом использование концентрического распылителя позволяет более эффективно (на 10 – 15%), но также не полностью минимизировать неспектральные матричные помехи (рис. 3). Такое поведение может быть обусловлено меньшей в силу конструкционных особенностей концентрического распылителя загрузкой плазмы компонентами матрицы раствора и, как следствие, также меньшим их влиянием на распределение температуры по оси плазмы и ее максимальное значение. Если бы с практической точки зрения этот распылитель не имел ограничений, его применение было бы предпочтительнее.

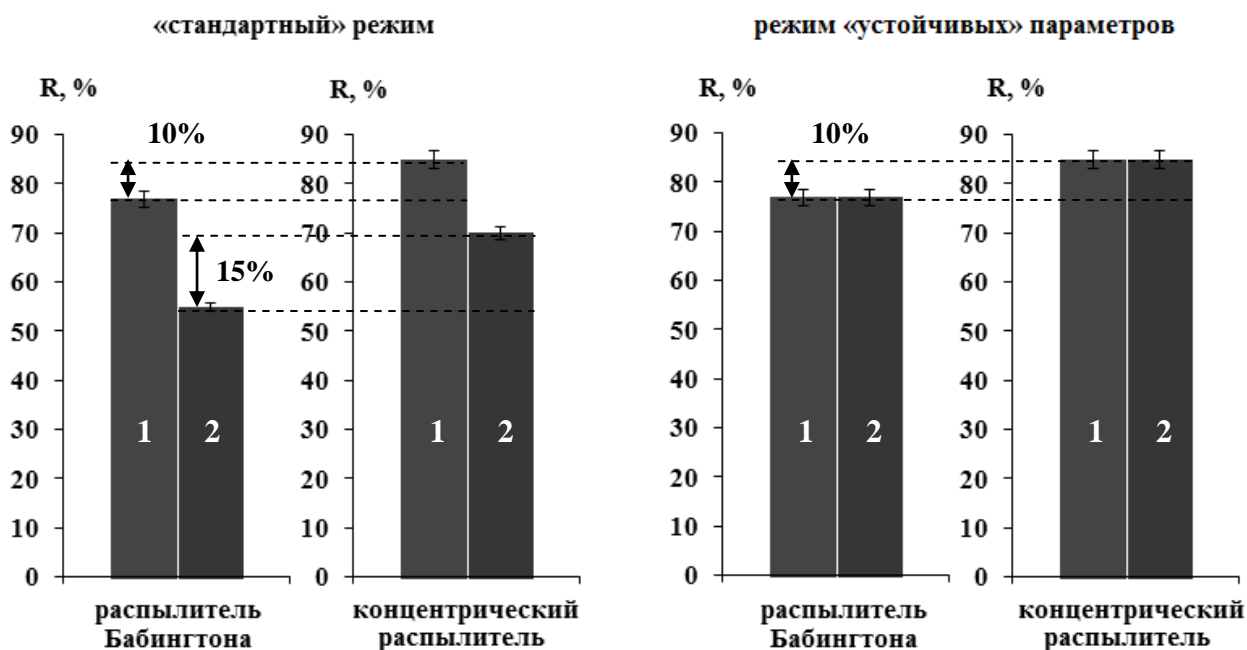


Рис. 3. Сравнение возможностей устранения влияния 15 об.% HNO_3 для элементов с ПИ < 9,0 эВ (цифра 1) и $\geq 9,0$ эВ (цифра 2) при использовании различных распылителей в двух режимах ($n = 3$, $P = 0,95$)

Суммируя результаты предварительных экспериментов и подбора «устойчивых» значений операционных параметров, можно сделать несколько важных выводов. Во-первых, в «стандартном» режиме работы прибора при использовании Rh в качестве ВС удастся полностью учесть влияние компонентов раствора только для аналитов с относительно низким, меньшим 9,0 эВ и близким к ПИ самого ВС, потенциалом ионизации. Во-вторых, переход к «устойчивым» значениям параметров в отсутствие ВС способствует лишь частичной минимизации неспектральных помех, но полному устранению дифференциации аналитов по ПИ. Резонно и в том и другом случае возникает вопрос о рекомендациях, касающихся критерия выбора внутреннего

стандарта исходя из близости его атомной массы и/или ПИ, а также гипотеза о возможности применения одного единственного ВС при измерении в режиме «устойчивых» параметров.

Как следует из обзора литературы, наиболее часто в качестве ВС выбирают элементы с близкими аналиту атомными массами и/или ПИ (при соблюдении прочих общих требований). Однако исследователи расходятся в своих мнениях по этому вопросу. В связи с этим, в данной работе изучали моноизотопные элементы во всем исследуемом диапазоне масс (от 9 до 209) с различными ПИ: Be, Co, As, Rh и Bi. Из данных, представленных в **табл. 3**, следует, что при работе в «стандартном» режиме значение атомной массы ВС не может являться критерием выбора внутреннего стандарта. В то же время полное устранение влияния компонентов матрицы осуществимо за счет подбора ВС, исходя из значений ПИ. Действительно, минимальные и несущественно отличающиеся от 0 значения величина ΔR^* принимает только в случае близости потенциалов ионизации аналита и ВС (обозначено закрашенными ячейками). При переходе же к режиму «устойчивых» параметров критерий выбора внутреннего стандарта совсем упрощается. В этом случае в качестве ВС может выступать один единственный элемент независимо от его атомной массы и ПИ.

Таблица 3. Значения величин ΔR^* для исследуемых элементов в 15 об.% HNO_3 при использовании различных ВС ($s_r \leq 5\%$ при $n = 3$, $P = 0,95$)

«стандартный» режим						режим «устойчивых» параметров					
	ΔR^* , %						ΔR^* , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi		Be	Co	As	Rh	Bi
P	-3	-30	3	-26	-32	P	3	-2	1	2	-1
Mn	35	2	40	3	-3	Mn	2	1	2	3	1
Co	37	–	42	1	-2	Co	3	–	1	3	-2
Cu	33	-2	40	-1	2	Cu	-1	0	1	2	0
Zn	-3	-30	-5	-27	-37	Zn	3	-3	-2	-1	-3
Ga	35	0	42	0	0	Ga	0	0	-1	0	1
As	-2	-27	–	-25	-30	As	3	-1	–	1	2
Se	2	-33	-3	-23	-33	Se	1	1	1	2	-2
Cd	1	-25	4	-26	-31	Cd	2	-3	1	-1	1
Pt	0	-27	1	-25	-30	Pt	0	2	-1	2	0
Pb	35	1	44	1	3	Pb	1	-1	0	2	1

Вероятнее всего, влияние компонентов матрицы на результаты определения необходимо рассматривать с двух сторон, учитывая как процессы, протекающие при подаче пробы (поступление образца в распылитель, образование и транспортировка аэрозолей), так и процессы, происходящие непосредственно в плазме (испарение, атомизация, ионизация). Так как первые напрямую зависят только от физических

свойств анализируемых растворов (вязкости, поверхностного натяжения, плотности и летучести), но не от физико-химических свойств самих аналитов, для устранения такого влияния в качестве ВС может быть применен единственный элемент вне зависимости от его природы (атомной массы и ПИ). Для нивелирования воздействия, обусловленного вторыми процессами, необходимо либо использование ВС с близкими аналиту ионизационными свойствами (ПИ ВС и аналита должны быть близки), либо применение специальных «устойчивых» значений операционных параметров. Вклады обоих процессов, безусловно, зависят от исследуемой матрицы, но в первом приближении, как видно из диаграмм, представленных на **рис. 4**, они вполне соизмеримы или даже равнозначны.

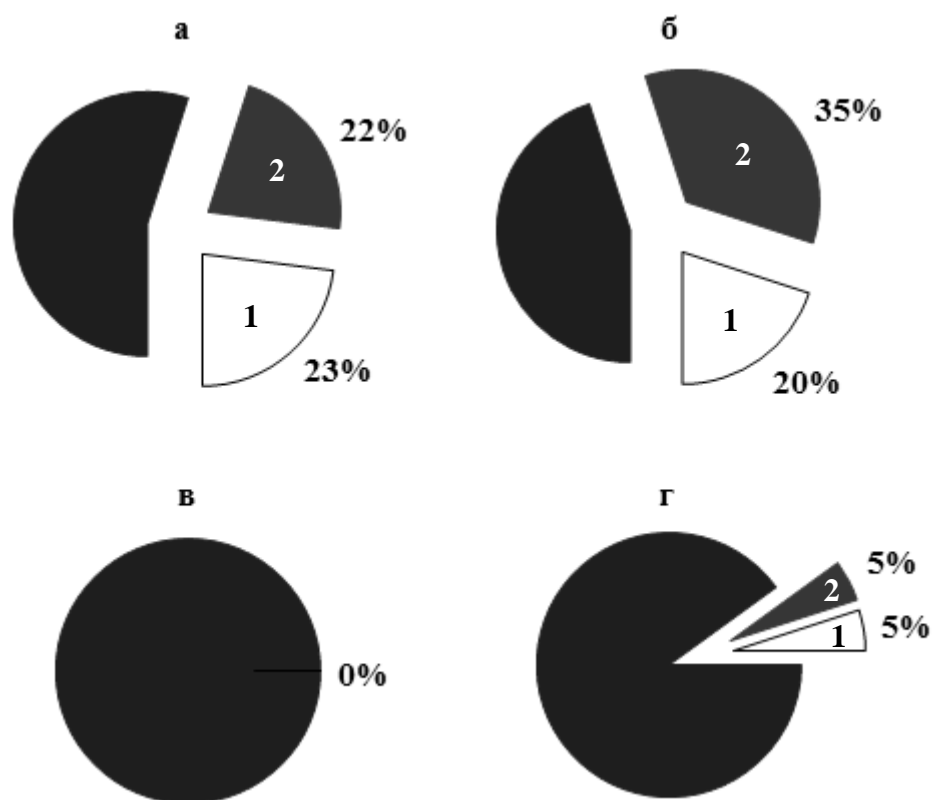


Рис. 4. Распределение вкладов в занижение сигнала по природе происхождения: подавление за счет процессов, происходящих в системе ввода пробы (цифра **1**) и непосредственно в плазме (цифра **2**) – в растворах 15 об.% HNO₃ (**а**), 0,4% NaCl (**б**), 8 г/л глицина (**в**) и 9 г/л карбамида (**г**) ($s_r \leq 5\%$ при $n = 3$, $P = 0,95$)

При этом предположено, что еще один вид процессов, связанных с экстракцией ионов из плазмы, формированием первичного ионного пучка и его изменением в интерфейсе и высоковакуумной части, не играет существенной роли ввиду конструктивных особенностей ионной оптики используемого масс-спектрометра.

Таким образом, в ходе данного исследования было установлено, что в «стандартном» режиме работы масс-спектрометра, используя градуировку без подбора матрицы, после разбавления и окислительной минерализации биологических жидкостей правильное определение всех аналитов из одного раствора возможно

только в случае применения нескольких ВС, подобранных исходя из близости их ПИ к ПИ аналитов. Также показано, что в режиме «устойчивых» параметров природа элемента (атомная масса и ПИ), выступающего в роли внутреннего стандарта не принципиальна, а значит, возможно сокращение набора применяемых ВС до одного единственного. Последний подход универсален и особенно прост в исполнении, что важно для клинической практики. Поэтому именно он в дальнейшем был рекомендован для анализа реальных образцов. При этом для продления срока службы систем интерфейса без дополнительной их очистки применяли распылитель Бабингтона и осуществляли 2% добавку кислорода в основной поток аргона в случае определения элементов в разбавленных пробах.

Проверка правильности определения элементов с помощью предлагаемых равнозначных подходов была осуществлена на примере анализа стандартных образцов сравнения цельной крови «Seronom Trace Elements Whole Blood, Level 2», PT-WB1 и IAEA-A-13, а также мочи «Seronom Trace Elements Urine, Level 2» и «Urine Control lyophilized for Trace Elements Level II». Было обнаружено хорошее совпадение между найденными после различной пробоподготовки и аттестованными значениями содержаний всех элементов в рамках погрешности измерения (некоторые результаты представлены в **табл. 4**). При этом пределы обнаружения при обоих видах пробоподготовки биологических жидкостей варьировались в диапазоне 0,01 мкг/л (Ga и Pt) – 2,5 мкг/л (Se) и 0,03 – 0,04 мг/л для Р. Относительные стандартные отклонения (s_r) получаемых результатов не превышали 1 – 8% в зависимости от значения измеряемой концентрации аналита.

Дополнительно была изучена возможность применения разработанных подходов для анализа твердых образцов, также представляющих интерес для медицинских исследований: волос и лечебного питания. Волосы переводили в раствор щелочным гидролизом с помощью ТМАОН и кислотной минерализацией с использованием ультразвукового или микроволнового поля. Смесь для лечебного питания разбавляли или проводили их кислотную минерализацию. Принимая во внимание некоторые особенности данных матриц, можно утверждать, что предлагаемые подходы могут быть использованы и для их анализа, что, несомненно, повышает их ценность.

Особое внимание было уделено актуальности использования рассматриваемых подходов для изучения некоторых свойств биологически активных комплексов галлия и платины. Применение достаточно простого, на первый взгляд, способа изучения связывания белков с лекарственным препаратом (каким является ультрафильтрация) сопряжено с задачей определения элементов в обеих фазах – как в фильтрате, так и в не прошедшем через концентратор растворе. Это необходимо, прежде всего, для получения правильных значений величины степени (**В**) и константы (**К**) связывания, когда концентрация элемента в фильтрате принимает значения, близкие к нулю или начальной введенной концентрации. Трудность такого анализа связана с уменьшением кратности разбавления растворов, а значит, и с более ярким проявлением неспектральных помех. Так как в рассматриваемых случаях определяется всего один аналит (либо галлий, либо платина), равнозначным является

Таблица 4. Результаты анализа стандартных образцов сравнения цельной крови «Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 2» и мочи «Seronorm Trace Elements Urine, Level 2» после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Цельная кровь			Моча		
	Найдено, мкг/л		Аттестовано, мкг/л	Найдено, мкг/л		Аттестовано, мкг/л
	после разбавления	после минерализации		после разбавления	после минерализации	
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 в мг/л

** – добавка элемента, эквивалентная 100 мкг/л

использование любого из вариантов разработанных подходов. Дополнительно было исследовано и влияние других клинически значимых матриц, образуемых при установлении липофильных свойств Pt-содержащих препаратов – солянокислые и октанол-этанольные растворы.

Установлено, что возможное занижение сигналов платины в солянокислых растворах обусловлено только процессами, происходящими при подаче и транспортировке анализируемого раствора, но никак не в самой плазме. Поэтому ее правильное определение возможно с применением любого ВС в обоих режимах. В то же время, показано, что при анализе октанол-этанольных растворов с помощью проточно-инжекционной системы стоит использовать ВС с относительно низкими ПИ вне зависимости от режима работы прибора.

В **Главе 4** представлены основные результаты применения подходов к устранению неспектральных помех для решения конкретных клинических задач, поставленных медиками и разработчиками лекарственных средств на основе координационных соединений металлов.

В ходе комплексного исследования около 300 проб биологических жидкостей пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма из всего набора изучаемых аналитов (P, Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd и Pb) были выбраны диагностически значимые элементы. Так, было показано, что в 70 и 85% случаев уровни содержания Cu и Zn, соответственно, в цельной крови ниже, чем в пробах практически здоровых добровольцев, в то же самое время у 50 – 60% пациентов наблюдается атипичное (сверх нормы) выведение этих элементов с мочой. При этом наибольшую диагностическую ценность представляет оценка содержания Cu. Было установлено, что тяжесть воспалительного процесса влияет на концентрацию этого элемента в цельной крови: в ряду заболеваний гнойные раны мягких тканей – панкреонекроз – перитонит (степень тяжести патологии увеличивается слева направо) содержание Cu снижается. Кроме этого, при выделении с мочой более чем 70 мкг/л этого элемента смертельный исход наблюдается в 75% случаев, в то время как при меньших концентрациях исход всегда положителен.

Подробное изучение связывания 8-оксихинолината галлия (III) с белками сыворотки крови показало большее сродство этого соединения по отношению к трансферрину (в сравнении с альбумином), что дает возможность говорить о его главенствующей роли при транспортировке действующего вещества в клетки опухоли. Действительно, рассчитанные значения констант связывания составляют $(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^3$ и $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$ для альбумина и трансферрина, соответственно. При этом также было показано, что приблизительно на 35% 8-оксихинолинат галлия (III) связывается с другими содержащимися в сыворотке крови белками, атомная масса которых превышает 30 кДа.

Исследование связывания цис- и транс-[дигалогенобис(2-пропаноноксимов)]-платины(II) с сывороткой крови человека подтвердило предположение о доминирующей роли альбумина в этих процессах. Так, было установлено, что от 85 до 100% всего связанного белками сыворотки количества комплексов приходится

именно на альбумин. Константы связывания этих соединений варьируются в пределах от $8,8 \cdot 10^4$ до $2,1 \cdot 10^6$ (табл. 5). При этом сродство по отношению к данному белку меньше у цис-изомеров (за исключением йодидных комплексов). Помимо этого, только для них наблюдается и следующая тенденция: йод-содержащий препарат связывается с альбумином сильнее, чем бром-производное, аддукт которого, в свою очередь, более стабилен, чем в случае хлорокомплекса. Все вышесказанное свидетельствует о том, что конфигурация молекулы играет в связывании большую роль, нежели природа уходящей группы. Результаты же определения логарифмов коэффициентов распределения (табл. 5) позволили установить, что для каждой галоген-производной пары цис-изомер более гидрофилен, чем аналогичный транс-комплекс. Более того, внутри каждой группы (по конфигурации) доля вещества, находящегося в равновесии в водной фазе, уменьшается по мере увеличения размера заместителя в ряду Cl – Br – I. Это достаточно просто объясняется тем, что более объемные атомы сильнее нарушают структуру воды, поэтому их присутствие в этой фазе менее желательно. В целом, учитывая все полученные результаты, среди исследуемых веществ наиболее перспективным для дальнейшего изучения является транс-[дибромобис(2-пропаноноксим)]платины(II), константа связывания которого с альбумином максимальна, а липофильность относительно высока. Такие характеристики должны, с одной стороны, способствовать предотвращению выведения препарата с мочой, а с другой, большей его проникающей способности через мембрану раковой клетки.

Таблица 5. Константы связывания* и логарифмы коэффициентов распределения исследуемых комплексов платины (n = 3, P = 0,95)

Комплекс	K, (моль/л) ⁻¹	log P
цис-Cl	$(8,8 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$-0,35 \pm 0,01$
транс-Cl	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$0,29 \pm 0,05$
цис-Br	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$-0,03 \pm 0,01$
транс-Br	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$1,24 \pm 0,08$
цис-I	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$1,66 \pm 0,05$
транс-I	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$2,31 \pm 0,08$

* – рассчитаны при соотношении «действующее вещество:альбумин», равном 1:10

ВЫВОДЫ

1. Исследованы и количественно оценены вклады основных неспектральных помех в искажение результатов анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки. Показано, что влияние солевой, органической и кислотной матриц носит аддитивный характер. Установлено, что присутствие солей и азотной кислоты оказывает наибольшее воздействие на подавление сигналов при анализе разбавленных и минерализованных проб, соответственно.
2. Изучена возможность устранения рассматриваемых неспектральных помех только за счет настройки операционных параметров работы прибора и/или замены распылителя. Обнаружено, что основной вклад в нивелирование помех вносят повышение мощности генератора и снижение скорости потока аргона через распылитель. Установлено, что за счет дополнительной оптимизации потенциала на линзе-экстракторе удастся повысить чувствительность определения элементов. В целом, показана несостоятельность применения только инструментального способа в достижении поставленной цели.
3. Установлена прямая взаимосвязь между различными режимами работы прибора и критериями выбора внутреннего стандарта. На основании этого предложено два равнозначных комбинированных подхода к полному устранению исследуемых неспектральных помех: 1) измерение в «стандартном» режиме работы прибора с использованием внутреннего стандарта, подобранного исходя из близости первых потенциалов ионизации элемента и аналита, или 2) анализ в режиме «устойчивых» параметров с применением в качестве ВС одного единственного элемента независимо от его атомной массы и ПИ.
4. Установлены процессы, оказывающие наибольшее влияние на подавление аналитического сигнала при его измерении на приборе Agilent 7500с: процессы, протекающие при подаче пробы (поступление образца в распылитель, образование и транспортировка аэрозоля), а также процессы, происходящие непосредственно в плазме (испарение, атомизация, ионизация). Предположено, что процессы экстракции ионов из плазмы, формирования первичного ионного пучка и его изменения в интерфейсе и высоковакуумной части не играют существенной роли ввиду конструкционных особенностей ионной оптики данного масс-спектрометра.
5. Эффективность предлагаемых подходов проверена при анализе крови, мочи, волос, лечебного питания и лекартсвенных препаратов. Пределы обнаружения варьируются в диапазоне 0,01 мкг/л (для Ga и Pt) – 2,5 мкг/л (для Se) и 0,03 – 0,04 мг/л для Р. Относительные стандартные отклонения не превышают 1 – 8% в зависимости от значения измеряемой концентрации аналита. В ходе систематического исследования биологических жидкостей пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма получены диагностически значимые результаты. Определены константы связывания координационных соединений галлия и платины с белками сыворотки крови, количественно охарактеризованы их липофильные свойства.

Основное содержание диссертации изложено в работах:

1. Филатова Д.Г., Серегина И.Ф., Осипов 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. 119-124.
2. 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. 22-26.
3. 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. 40-45.
4. Осипов 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. 150-163.
5. Осипов К.Б. Определение галлия в биологических жидкостях методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. / Тез. докл. XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» – Секция «Химия». Москва, 2012. С. 51.
6. Филатова Д.Г., Серегина И.Ф., Осипов К.Б., Фотеева Л.С., Пухов В.В., Тимербаев А.Р., Большов М.А. Исследование природы фонового сигнала при разработке методики определения галлия в биологических жидкостях методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. / Тез. докл. Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием. Краснодар, 2012. С. 133.
7. Осипов К., Серегина И.Ф., Большов М.А., Ягубян Р.С., Свиридов С.В. Сравнение методик ИСП-МС определения Cu и Zn в цельной крови. / Тез. докл. IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной научной школой. Уфа, 2013. С. 100.
8. Ossipov K., Seregina I.F., Bolshov M.A. Some procedures of reducing matrix effects in ICP-MS analysis of biological samples. Тез. докл. Международной конференции XXXVIII Colloquium Spectroscopicum Internationale. Тромсе, Норвегия, 2013. С. 83.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.ф.-м.н., проф. Большову М.А., а также к.х.н. Серegiной И.Ф., д.х.н. Тимербаеву А.Р. за постоянное внимание, помощь в работе и обсуждении результатов.