

**Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова**

**Химический факультет**

**Кафедра аналитической химии**

*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**

**Диссертация на соискание ученой степени**

**кандидата химических наук**

**Научный руководитель:**

**д.ф.-м.н., проф. Большов М.А.**

**Москва 2015**

## Оглавление

<b>Список используемых сокращений .....</b>	<b>5</b>
<b>Введение .....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>	<b>11</b>
1.1. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в клинической практике .....	11
1.1.1. МС-ИСП анализ биологических жидкостей.....	13
1.1.1.1. МС-ИСП анализ биологических жидкостей после разбавления.....	13
1.1.1.2. МС-ИСП анализ биологических жидкостей после минерализации .....	22
1.1.2. Применение МС-ИСП в разработке лекарственных средств .....	31
1.2. Неспектральные матричные помехи в МС-ИСП.....	38
1.2.1. Влияние кислоты .....	38
1.2.2. Влияние сопутствующих элементов .....	44
1.2.3. Влияние органических веществ .....	50
1.3. Выбор внутреннего стандарта в МС-ИСП .....	54
1.4. Выводы к Главе 1 .....	57
<b>Глава 2. Реагенты, материалы, оборудование, методики эксперимента .....</b>	<b>59</b>
2.1. Газы, реактивы, растворы и материалы.....	59
2.2. Вспомогательное оборудование и средства измерения.....	61
2.3. Методики исследования.....	64
2.3.1. Хранение и подготовка проб исследуемых образцов .....	64
2.3.2. Приготовление растворов ВС и градуировочных растворов.....	65
2.3.3. Методики пробоподготовки исследуемых образцов .....	65
2.3.3.1. Разбавление биологических жидкостей.....	65
2.3.3.2. Перевод в раствор порошков лечебного питания и волос .....	66
2.3.3.3. Окислительная МВ минерализация исследуемых объектов .....	67
2.3.4. Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических жидкостях..	68
2.3.5. Исследование связывания 8-гидроксихинолината галлия(III) с альбумином, трансферрином и сывороткой крови человека.....	68

2.3.6. Определение коэффициентов распределения (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагено-бис(2-пропаноноксимов-кN)платины(II) .....	69
2.3.7. Исследование связывания (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропанон-оксимов-кN)платины(II) с альбумином и сывороткой крови человека .....	70
2.3.8. Приготовление модельных растворов для изучения неспектральных помех .....	71
<b>Глава 3. Устранение неспектральных матричных помех при МС-ИСП элементном анализе биологических жидкостей и лекарственных средств.....</b>	<b>74</b>
3.1. Предварительные эксперименты и наблюдения.....	74
3.1.1. Оценка спектральных матричных помех .....	75
3.1.2. Обоснование выбора методик пробоподготовки биологических жидкостей .....	78
3.1.2.1. Выбор разбавителя.....	78
3.1.2.2. Оптимизация методики окислительной минерализации .....	82
3.1.2.3. Сравнение результатов анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки .....	83
3.1.2.4. Оценка роли основных видов неспектральных помех .....	85
3.2. Разработка подходов к устранению неспектральных помех .....	90
3.2.1. Исследование возможности нивелирования неспектральных помех за счет инструментальной настройки масс-спектрометра или замены распылителя .....	90
3.2.1.1. Варьирование мощности генератора .....	91
3.2.1.2. Варьирование скорости потока аргона через распылитель .....	93
3.2.1.3. Варьирование глубины отбора пробы .....	95
3.2.1.4. Варьирование потенциала на линзе-экстракторе.....	96
3.2.1.5. Исследование влияния добавки кислорода в основной поток аргона .....	99
3.2.1.6. Замена распылителя Бабингтона на концентрический распылитель .....	101
3.2.2. Выбор внутренних стандартов в двух режимах работы масс-спектрометра ....	103
3.2.3. Проверка эффективности разработанной стратегии для анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки .....	108
3.3. Исследование применимости подходов при анализе других матриц .....	113
3.3.1. Волосы, подвергшиеся обработке ТМАОН, УЗ или МВ минерализации .....	113
3.3.2. Разбавленное или минерализованное лечебное питание .....	114

3.3.3. Солянокислые растворы платины.....	115
3.3.4. Октанол-этанольные растворы платины.....	118
<b>Глава 4. Применение разработанных подходов в клинической практике .....</b>	<b>120</b>
4.1. Комплексное исследование цельной крови, сыворотки крови и мочи пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма .....	120
4.2. Изучение связывания действующих веществ лекарственных средств с белками крови человека .....	123
4.2.1. Исследование связывания 8-оксихинолината галлия(III) с альбумином, трансферрином и сывороткой крови человека.....	124
4.2.2. Исследование связывания (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропанон-оксимов-кN)платины(II)с альбумином и сывороткой крови человека.....	126
<b>Выводы .....</b>	<b>132</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>134</b>

## Список используемых сокращений

<b>АЭС-ИСП</b>	атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой
<b>ВС</b>	внутренний стандарт
<b>МВ</b>	микроволновое излучение
<b>МС-ИСП</b>	масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
<b>ПИ</b>	первый потенциал ионизации
<b>СВР</b>	синдром системной воспалительной реакции организма
<b>ТМАОН</b>	гидроксид тетраметиламмония
<b>Тритон X-100</b>	4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил)фенилполиэтиленгликоль
<b>УЗ</b>	ультразвук
<b>УФ</b>	ультрафиолетовое излучение
<b>ФБР</b>	физиологический буферный раствор
<b>ЭДТА</b>	динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

## Введение

**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 несектральных 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 несектральных 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 сектральных помех в аналитический сигнал при анализе растворов на спектрометре с квадрупольным масс-фильтром;
- количественно оценить уровни несектральных помех при разбавлении и окислительной минерализации биологических жидкостей;
- исследовать возможность полного устранения несектральных помех за счет изменения режимов работы прибора;
- установить критерии выбора внутреннего стандарта (ВС) для учета несектральных 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 несектральных 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). Предполагается, что процессы экстракции ионов из плазмы, формирования первичного ионного пучка и его изменения в интерфейсе и высоковакуумной части не играют существенной роли ввиду конструктивных 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.%  $\text{HNO}_3$ : 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.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой в клинической практике

Масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой достаточно давно начали использовать в клинических лабораториях, занимающихся анализом биологических объектов и разработкой новых фармакологических препаратов на основе координационных соединений металлов. При этом массовое использование этого метода было ограничено ввиду дороговизны и сложности оборудования. Только в 2007 году стали высказывать предположения о том, что МС-ИСП сможет постепенно заменить пламенную и электротермическую атомную абсорбционную спектроскопию (ААС) – главенствующий в клинической практике в то время метод [1]. На сегодняшний день масс-спектрометрия уже занимает лидирующие позиции в этой области. Последнее стало возможным благодаря существенно большей доступности и производительности современного оборудования при сохранении несомненных преимуществ [2]:

- рекордно низких пределов обнаружения химических элементов и изотопов (уровни нг/л и иногда даже пг/л), что требуется при определении аналитов с относительно низкими концентрациями в образце или контроле процессов выведения лекарства из организма в течение длительного времени (согласно данным **табл. 1**, таковыми элементами являются Mn, Co, Ni, Mo, Cd, Au и Tl);
- возможности проведения многоэлементного анализа (согласно данным **табл. 1**, большой круг аналитов, определяемых на коммерческой основе, включает в себя элементы от Al до Pb);
- широкого (до 10 порядков) динамического диапазона линейности градуировочной зависимости, что важно в биомониторинге или скрининге маркеров заболеваний ввиду необходимости определения из одной пробы элементов с разным содержанием (согласно данным **табл. 1**, таковыми аналитами являются Tl, Cd и Zn, P);
- 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), что также нередкость в клинической практике.

**Таблица 1.** Диапазоны содержаний элементов, определяемых с помощью МС-ИСП, в биологических жидкостях\*

Элемент	Концентрация, мкг/л		
	Кровь	Сыворотка крови	Моча
<b>Al</b>	–	–	0 – 40
<b>P**</b>	200 – 500	110 – 140	400 – 1300
<b>Mn</b>	7 – 15	1,5 – 4	0,75 – 3
<b>Fe</b>	–	–	5 – 300
<b>Co</b>	0,5 – 2,5	0,45 – 1	0,25 – 2
<b>Ni</b>	0 – 10	0 – 10	0 – 20
<b>Cu</b>	750 – 1500	750 – 1800	10-70
<b>Zn</b>	5500 – 9000	750 – 1500	200 – 1000
<b>As</b>	0 – 90	0 – 10	0 – 350
<b>Se</b>	75 – 200	70 – 120	15 – 60
<b>Mo</b>	–	0,4 – 1,5	–
<b>Cd</b>	0 – 5	0 – 0,15	0 – 1
<b>Au</b>	–	0 – 10	–
<b>Hg</b>	0 – 50	–	0 – 10
<b>Tl</b>	–	0 – 0,05	0 – 1
<b>Pb</b>	0 – 100	–	0 – 5

\* – данные, приведенные на сайте Независимой лаборатории ИНВИТРО

\*\* – концентрации в мг/л

Однако, как и любой другой инструментальный метод, масс-спектрометрия имеет и свои недостатки, важнейшими из которых являются так называемые матричные помехи – спектральные и неспектральные [2]. При этом их влияние на результаты определения и методы борьбы с этим влиянием зависят от типа образца и способа пробоподготовки, предшествующей анализу.

В рамках данной работы подробно рассмотрим проблемы использования МС-ИСП в элементном анализе биологических жидкостей и противоопухолевых лекарственных средств на основе координационных соединений платины.

### 1.1.1. МС-ИСП анализ биологических жидкостей

На сегодняшний день при масс-спектрометрическом определении элементов в биологических жидкостях используют в основном два способа пробоподготовки: прямое разбавление [3-40] или окислительную минерализацию [41-70].

#### 1.1.1.1. МС-ИСП анализ биологических жидкостей после разбавления

Безусловными преимуществами разбавления являются простота, экспрессность, дешевизна и минимальный риск дополнительного загрязнения пробы. К явным недостаткам следует отнести возможность выхода из строя шлангов для подачи пробы, блокировки и закупорки распылителя, инжектора горелки и даже отверстий сэмплера и скиммера, а также усугубление влияния спектральных и неспектральных матричных помех ввиду высокого содержания солей и органических веществ [71]. Однако, несмотря на указанные минусы, этот способ пробоподготовки довольно часто используют на практике [3-40].

Состав разбавителей при этом варьируется от методики к методике (табл. 2). Очевидным является факт применения более сложных смесей реагентов при пробоподготовке цельной крови [3-21]. Для ее разбавления в основном используют подкисленные азотной кислотой или аммиачные растворы 4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил)фенилполиэтиленгликоля (Тритона X-100) без добавления [4-8] или с добавлением динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [9-16, 20] и/или 1-бутанола [11, 12, 15, 16, 19]. В противовес этому сыворотку и мочу обычно разбавляют с помощью азотной кислоты (содержание которой составляет несколько об.%) [17, 22-34]. Каждый компонент таких смесей играет специфическую роль. Так, Тритон X-100 предохраняет от засорения распылитель и инжектор горелки, однако положительный эффект наблюдается, только если его концентрация превышает величину 0,01 об.% [5]. ЭДТА предотвращает выпадение осадка и адсорбцию элементов на стенках пробирки. 1-бутанол способствует устранению полиатомных аргонных наложений на изотопы Se за счет преимущественного образования иона  $AgC^+$  [11, 16, 19] и повышению общей чувствительности определения, как вообще добавление в анализируемый раствор любого другого органического вещества [13, 18, 35, 37]. Аммиак разрушает эритроциты, а азотная кислота стабилизирует формы элементов в

растворе, хотя при ее концентрации выше 0,5 об.% возможно осаждение белков [5]. В этом случае рекомендуют отцентрифугировать растворы перед анализом [12, 17, 19, 33]. Иногда для разрушения органической матрицы применяют и гидроксид тетраметиламмония (ТМАОН) [13, 21].

Кратность разбавления также существенно различается (табл. 2). При этом цельную кровь, биологическую жидкость наиболее сложного состава, как правило, разбавляют в большее число раз (от 10 до 50 раз). В целом, чаще всего пробы подвергают 10-кратному разбавлению [4, 8, 10, 12, 14, 17-19, 23, 24, 28-30, 34-37]. Большее разбавление (от 20 до 50 раз) используется для уменьшения загрузки системы ввода и интерфейса органическими веществами и солями, а также для нивелирования матричных эффектов. Очевидно, что именно при такой пробоподготовке возможно применение градуировочных растворов без подбора матрицы [3, 9, 21, 32, 34].

Помимо использования Тритон X-100 и более эффективного разбавления снизить негативное влияние компонентов матрицы биологических жидкостей на систему ввода масс-спектрометра помогает применение горелок с инжектором большего внутреннего диаметра (2,0 мм [5, 7, 16] или 2,5 мм [8, 9, 15, 26, 27] по сравнению с обычно используемыми 1,0 – 1,5 мм). С той же целью разбавленные пробы иногда подают в масс-спектрометр с помощью проточно-инжекционной системы [10, 14, 31]. Для предотвращения закупорки конусов интерфейса сажей, согласно рекомендациям производителей МС-ИСП [72], в основной поток аргона можно вводить и кислород.

Спектральные матричные помехи, возникающие при анализе разбавленных проб, удается учесть или устранить несколькими способами. В большинстве случаев для этого используют приборы, оснащенные столкновительными или реакционными ячейками [5, 6, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 26, 27, 39, 40]. Реже, в силу большей стоимости, применяют масс-спектрометры высокого разрешения [10, 20, 21, 32, 35]. Оценить вклад спектральных помех в правильность результатов определения можно и с помощью растворов, моделирующих состав анализируемых образцов.

Как уже было сказано выше, одним из способов борьбы с несектральными помехами является достаточное для нивелирования их влияния разбавление. Однако самый распространенный вариант – использование метода добавок [8, 15, 19, 26-28, 31, 33, 38] или подбор матрицы градуировочных растворов [4-7, 11-14, 16, 18, 20, 25, 29, 35, 37, 39, 40]. При этом для градуировки можно использовать не только биологические

жидкости людей [6, 12-14, 18, 29, 35, 39, 40], но и животных [5, 7, 16]. Как правило, содержание анализируемых элементов в них должно быть относительно мало. Иногда с этой же целью готовят искусственную матрицу, имитирующую солевой и/или органический состав пробы [4, 11, 25].

Тем не менее, независимо от того, каким образом приготовлены градуировочные растворы, дополнительно для устранения неспектральных помех применяют метод внутреннего стандарта. В качестве ВС может выступать как один [4, 8-11, 13, 16, 19-21, 26, 27, 31, 34, 35], так и целая группа элементов [3, 5-7, 14, 15, 17, 18, 22-25, 28-30, 32, 33, 36-40] (табл. 2). Один единственный внутренний стандарт используют в случае подбора матрицы градуировочных растворов или градуировки методом добавок [8, 11, 13, 19, 20, 26, 27, 31] и/или, что очевидно, при определении 1 – 2 элементов [4, 9, 16, 34, 35]. Если приготовление градуировочных растворов проводят без подбора матрицы, аналогичная ситуация возможна только при значительном (в 50 раз) разбавлении проб [9, 21] или их подаче в масс-спектрометр с помощью проточно-инжекционной системы [10]. Во всех остальных случаях [3, 17, 22-24, 30, 32, 33, 36] применяют сразу несколько внутренних стандартов. При этом не совсем логичным выглядит использование группы ВС при подборе матрицы или градуировке методом добавок [5-7, 14, 15, 18, 25, 28, 29, 37-40]. До конца неясными остаются и критерии выбора элемента внутреннего стандарта (см. 2 и 5 колонки табл. 2), хотя в некоторых случаях явно указано, что этот выбор осуществляется исходя из близости атомной массы [22, 25, 33] и/или первого потенциала ионизации [6, 13, 15, 24] ВС и аналита. Кроме того, авторы работы [25], подчеркивают, что не всегда предлагаемый критерий работает: так, при определении Li и Al в качестве внутреннего стандарта используется Rh, атомная масса которого существенно больше, чем атомная масса аналитов.

О возможностях нивелирования неспектральных матричных помех при анализе разбавленных биологических жидкостей инструментальным способом, а точнее за счет выбора так называемых «устойчивых» значений операционных параметров (англ. *robust conditions*), упомянуто только в нескольких работах [13, 16, 21, 22, 24, 29, 36]. Необходимость понижения скорости потока аргона через распылитель подчеркивается авторами [22, 24]. Применение повышенной мощности генератора для более эффективного разложения органической матрицы и ионизации элементов в плазме описывается в работах [13, 16]. Настройка всех параметров прибора по какому-либо

разбавленному образцу рекомендуется в [21, 29, 36]. В остальных случаях она производится с использованием стандартного раствора. Следует отметить, однако, что даже при работе в режиме «устойчивых» операционных параметров (кроме [13, 21]) применяются сразу несколько ВС. Использование одного внутреннего стандарта в работах [13, 21] связано, прежде всего, с более сильным разбавлением проб.

Используемые в этих работах распылители разнообразны: встречается применение как концентрических [5, 6, 9, 11-13, 15, 20-24, 28-30, 32, 35, 36, 39], поперечно-поточных [3, 7, 10, 16, 18, 31, 33, 34, 38] распылителей, так и распылителей Бабингтона [3, 8, 26, 27].



Таблица 2. Примеры МС-ИСП анализа биологических жидкостей после разбавления

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Состав разбавителя	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	Cd, Hg, Pb	20	HNO <sub>3</sub> – Au	Ge, Tb, Y	без подбора матрицы	[3]
	Cu, Zn	10	Тритон – HNO <sub>3</sub>	In	подбор матрицы	[4]
	As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Se, Tl, V, Zn	50	Тритон – HNO <sub>3</sub>	Ir, Rh	подбор матрицы	[5]
	As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Sb, Se, Sr, Tl, V, Zn	20	Тритон – HNO <sub>3</sub>	Ge, In, Re, Sc	подбор матрицы	[6]
	Cd, Hg, Pb	50	Тритон – HNO <sub>3</sub> – Au	Ir, Rh	подбор матрицы	[7]
	Ag, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cs, Cu, Ga, Hf, Hg, In, La, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Rb, Rh, Ru, Sb, Se, Sn, Sr, Te, Th, Tl, U, V, W, Y, Zr	10	Тритон – NH <sub>3</sub>	Tb	метод добавок	[8]
	Co, Cr	до 50	Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	Sc	без подбора матрицы	[9]
	Cr, Co, Mo, Ni	10	Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	Rh	без подбора матрицы	[10]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Состав разбавителя	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	As, Cd, Hg, Mn, Pb, U	50	Тритон – ЭДТА 1-бутанол – NH <sub>3</sub>	Ge/Ir/Rh/Re/Tl	подбор матрицы	[11]
	Cd, Cu, Pb, Se, Zn	10	Тритон – ЭДТА 1-бутанол – NH <sub>3</sub>	–	подбор матрицы	[12]
	Cd, Hg, Pb	50	Тритон – ЭДТА – ТМАОН изопропанол	Ir	подбор матрицы	[13]
Сыворотка крови	B, Ba, Bi, Cd, Cs, Hg, Li, Mo, Pb, Sb, Sn	5	HNO <sub>3</sub>	Be, In, Tl	без подбора матрицы	[22]
	Co, Cs, Cu, Fe, Mo, Rb, Zn	до 10	HNO <sub>3</sub>	Be, In, Tl	без подбора матрицы	[23]
	Br, Ca, Cu, Mg, Rb, Sr, Zn	10	HNO <sub>3</sub>	Rh, Te, Y	без подбора матрицы	[24]
	Al, Cd, Co, Cu, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pt, Rb, Sb, Se, Zn	до 50	HNO <sub>3</sub>	Rh, Tl	подбор матрицы	[25]
	Se	10	этанол – HNO <sub>3</sub>	In/Sc	подбор матрицы	[35]
	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, V, Zn	10	ЭДТА – NH <sub>3</sub>	Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb, Y	без подбора матрицы	[36]
	Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, Zn	10	Тритон – CH <sub>3</sub> COOH	Ge, Rh	подбор матрицы	[37]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Состав разбавителя	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Моча	Ag, As, Au, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ga, In, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Rh, Sb, Se, Sn, Tl, U, V, W, Zr	5	HNO <sub>3</sub>	Tb	метод добавок	[26, 27]
	Ag, As, Bi, Cd, Co, Ge, Hg, Mo, Pb, Pt, Se, Sn, Te, Tl, Zn	10	HNO <sub>3</sub>	Ga, In, Ir, Y	метод добавок	[28]
	Al, As, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Pb, V, Zn	10	HNO <sub>3</sub>	In, Y	подбор матрицы	[29]
	As, Cd, Cu, Fe, Pb, Se, Zn	10	HNO <sub>3</sub>	In, Rh, Tl, Y	без подбора матрицы	[30]
	As, Cu, Mo, Ni, Pb, Se, Zn	16,5	HNO <sub>3</sub>	Rh	метод добавок	[31]
	Bi, Cd, Hg, Pb, Pd, Pt, Sb, Sn, Te, Tl, W	1,124	HNO <sub>3</sub> – HCl	Ir, Rh	метод добавок	[38]
	Al, Ba, Be, Cd, Co, Cu, Cs, Mn, Ni, Pb, Pt, Sb, Se, Sn, Tl, U	20	Тритон – HNO <sub>3</sub>	Ir, Rh, Y	подбор матрицы	[39]
	As, Cd, Hg, Pb	20	Тритон – NH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> OH HNO <sub>3</sub> – Au	Ga, Ir, Rh, Y	подбор матрицы	[40]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Состав разбавителя	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь и сыворотка крови	Cd, Co, Cu, Ga, Hg, Mo, Ni, Rb, Rh, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Tl, W, Zn	10 и 5	Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	In, Sc	подбор матрицы	[14]
	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, V, Zn	20	Тритон – ЭДТА 1-бутанол – NH <sub>3</sub>	Ge, In, Rh, Sc, Tl	метод добавок	[15]
	Se	15	Тритон – ЭДТА 1-бутанол – NH <sub>3</sub>	In	подбор матрицы	[16]
Кровь и моча	As, Cd, Pb, Tl	10	HNO <sub>3</sub>	Bi, Ga, Rh	без подбора матрицы	[17]
	Cd, Hg, Pb, Tl	20 и 10	трет-бутанол – HCl – Au	Bi, Ga, Rh	подбор матрицы	[18]
Сыворотка крови и моча	Al, As, Co, Cr, Cu, Ga, Ge, Mn, Ni, Sc, Se, Si, Ti, V, Zn	20	HNO <sub>3</sub>	Bi, In	без подбора матрицы	[32]
	Al, As, Bi, Cd, Co, Cs, Cu, Mn, Mo, Ni, Rb, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, W, Zn	5	HNO <sub>3</sub>	Be, Ga, In, Ir	без подбора матрицы/ метод добавок	[33]
	Cu, Zn	20 и 10	HNO <sub>3</sub>	Y	без подбора матрицы	[34]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Состав разбавителя	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
<b>Кровь, сыворотка крови и моча</b>	Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, Ge, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, U, V, W, Zn	10	Тритон – 1-бутанол – HNO <sub>3</sub>	Rh	метод добавок	<b>[19]</b>
	Co, Cr, Mo, Ni	20	Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	In	подбор матрицы	<b>[20]</b>
	Al, As, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn	50	ТМАОН – HCl	Rh	без подбора матрицы	<b>[21]</b>

### 1.1.1.2. МС-ИСП анализ биологических жидкостей после минерализации

Окислительная минерализация также широко используется в элементном анализе биожидкостей [41-70], прежде всего цельной крови [41-58, 66-68, 70], из-за возможности удаления сложной органической матрицы и снижения биологической опасности при работе с такими объектами. В то же время этот вид пробоподготовки отличают относительная сложность методик, существенно большие временные и материальные затраты и, безусловно, повышенный риск дополнительного загрязнения пробы и потери легколетучих элементов.

В качестве окисляющего агента чаще всего используют концентрированную азотную кислоту (табл. 3), которая по сравнению с  $\text{HClO}_4$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в наименьшей степени способствует проявлению спектральных помех, обусловленных применяемыми реагентами ( $\text{ClO}^+$  или  $\text{SO}^+$ ) [71]. В работах [73, 74] показано, что при выдерживании различных биологических проб с 2 мл концентрированной азотной кислоты в закрытых сосудах при давлении до 25 бар и температуре  $180^\circ\text{C}$  в течение 3 ч практически вся органическая матрица минерализуется. При этом в остатке или растворе могут быть обнаружены преимущественно аминокислоты (фенилаланин, гистидин, триптофан, метионин) и ненасыщенные жирные кислоты (производные линолевой кислоты). В некоторых случаях дополнительно в реакционную смесь вводят пероксид водорода [44-47, 49, 54-58, 60, 62, 64, 65, 67-69] для уменьшения образования паров диоксида азота и ускорения минерализации проб за счет повышения температуры [48]. Реже используют и другие кислоты, такие как, например,  $\text{HF}$  [61, 62].

Не смотря на то, что открытая минерализация (на простой нагревательной плитке или в специальном нагревательном блоке) довольно распространена [41-47, 49, 59, 60, 66], обычно с целью интенсификации процесса применяют микроволновое (МВ) излучение [48, 50-57, 62, 63, 67, 68, 70]. Это позволяет не только сократить время пробоподготовки, в среднем, с нескольких часов до получаса, и в случае использования закрывающихся стаканов снизить риск дополнительного загрязнения проб, но и контролировать весь процесс разложения за счет возможности программирования температуры и мощности [48, 54-56, 62, 68, 70]. Недостатком коммерчески доступных стандартно укомплектованных МВ печей, однако, является невозможность осуществления минерализации более 10 – 12 образцов одновременно и относительно большой объем емкостей [70]. Тем не менее, современные микроволновые системы

снабжают либо специальными сосудами (печи Mars и Ethos), либо микровставками в основной стакан (печи Ethos) для увеличения производительности процесса пробоподготовки. Единичны случаи применения ультрафиолетового (УФ) излучения для ускорения деградации органической матрицы [58, 64, 65, 69]. При таком способе разложения удастся достигнуть относительно низких пределов обнаружения ввиду использования малых количеств окисляющих агентов. Последнее обстоятельство, однако, ограничивает и применение УФ минерализации: ее в основном используют для относительно простых матриц (сыворотки и мочи).

Так как для пробоподготовки чаще всего применяют концентрированную кислоту, перед МС-ИСП анализом разложенные образцы дополнительно разбавляют. Кратность разбавления при этом подбирают не только исходя из необходимости снижения общей кислотности раствора, но и содержания определяемых элементов и солей в образце. Повышенная концентрация азотной кислоты, играющая все же ключевую роль в разбавлении, может приводить не только к быстрой коррозии никелевых конусов интерфейса, но и подавлению сигналов аналитов. Авторы работ [68, 71] утверждают, что в масс-спектрометр желательно вводить растворы азотной кислоты с концентрацией меньше 2 М (15 об.%). В некоторых случаях, однако, эта рекомендация не соблюдается [46-48, 52, 54, 55, 63, 67, 70]. Очевидно, что при этом следует либо использовать платиновые самплер и скиммер [47, 48, 70], либо проточно-инжекционную систему ввода пробы [63, 67]. В целом кратность разбавления варьируется от методики к методике (табл. 3), хотя разбавление в 10 раз все-таки преобладает. Более радикальным способом борьбы с кислотностью анализируемых растворов является выпаривание минерализованных проб с последующим их растворением в разбавителе необходимого состава [44, 45, 59]. Тем не менее, оно применяется в современной практике все реже из-за высокого риска дополнительного загрязнения образцов и увеличения времени анализа.

Спектральные матричные помехи, как и в случае прямого разбавления, устраняют за счет использования квадрупольных приборов со столкновительными или реакционными ячейками [42, 44-47, 49, 52, 55, 56, 62, 66], а также масс-спектрометров высокого разрешения [41-43, 50, 51, 53, 57, 58, 60, 64, 65, 69, 70].

Для учета возможных неспектральных помех (подавление сигналов элементов из-за присутствия в растворе кислоты и солей) применяют метод добавок [43, 46-48, 52, 58,

**63, 66, 69, 70]** или подбирают матрицу градуировочных растворов в соответствии с составом анализируемых проб **[49-51, 53, 54, 57, 60-62, 64, 65]**. При этом обычно пытаются моделировать только содержание кислоты **[49, 54, 57, 60, 62]**, хотя в указанных примерах в силу большого разбавления (20 – 50 раз) влияние солей будет проявляться менее ярко. Способ простой внешней градуировки также используют **[41, 42, 44, 45, 53, 55, 56, 59, 67, 68]**, однако его применение иногда сопряжено с дополнительными трудностями технического характера. Так, в работах **[44, 45, 59]** определению предшествует выпаривание минерализованных проб с целью удаления избытка кислоты. Авторы работы **[67]** предлагают вводить анализируемые растворы в масс-спектрометр с помощью проточно-инжекционной системы после предварительного отделения матричных элементов (Na, K, Ca, Mg, Cl, P и S) на иминодиацетатной смоле. В случае **[56]** обходятся более сильным (в 50 раз) разбавлением образца. Помимо этого, при таком способе градуировки могут возникать и систематические ошибки при анализе некоторых элементов: Bi, Cd, Sb и Zn **[53]**, Cd, Se и Zn **[55]**, Be, Bi, Cd и Hg **[68]**. И только в работах **[41, 42]** не возникает никаких проблем с определением, что соответствует ранее указанному положению о возможном отсутствии влияния азотной кислоты в ее растворах с концентрацией менее 15 об.% **[68, 71]**.

Впрочем, наряду с рассмотренными выше способами нивелирования неспектральных помех практически всегда дополнительно прибегают к использованию метода внутреннего стандарта (табл. 3). ВС не применяют лишь в случае УФ минерализации **[58, 69]**, что связано с относительно низкими определяемыми концентрациями аналитов. Подобрать внутренний стандарт, который бы адекватно работал в таких условиях, трудно ввиду невозможности правильной регистрации его сигналов. Отказ от использования ВС в случаях ввода пробы с помощью проточно-инжекционной системы **[63, 67]**, однако, не обоснован: для учета, прежде всего, инструментального дрейфа хотя бы один внутренний стандарт просто необходим, особенно при такой подаче образца в масс-спектрометр. Таковым, очевидно, должно быть объяснение применения одного ВС и при градуировке методом добавок **[46, 47, 66]** или подборе матрицы градуировочных растворов **[50, 54, 57, 61, 62, 64, 65]**. Хотя иногда в этих случаях все-таки используют набор ВС **[43, 48, 49, 51, 52, 60, 70]**, что не вполне логично. Ситуация намного проще при внешней градуировке. Как видно из данных,



представленных в **табл. 3**, авторы работ [41, 42, 44, 45, 53, 59, 68] применяют целую группу внутренних стандартов, в то время как один ВС используют только в двух источниках. При этом в случае [55] получают заниженные результаты по некоторым определяемым элементам. Возможность сокращения числа ВС в другом случае, очевидно, продиктована довольно сильным разбавлением пробы перед анализом, что позволяет пренебречь влиянием матричных компонентов [56]. Критерии выбора внутренних стандартов также не совсем ясны. Лишь в некоторых работах уделяется должное внимание этому вопросу [41, 49, 50, 53, 56, 68, 70]. Подбор ВС исходя из близости атомных масс элементов рекомендован в [41, 49, 68, 70]. Важность совпадения не только массы, но и первого потенциала ионизации ВС и аналитов подчеркнута в [56].

О необходимости специальной инструментальной настройки масс-спектрометра для определения элементов в матрице минерализованных проб упоминается только в [53, 54]. В остальных случаях она производится с использованием стандартного раствора, поставляемого к прибору.

Подавляющее большинство используемых в работах распылителей – концентрические распылители [41, 43, 46, 47, 49, 50, 53, 55, 57, 58, 60, 62, 68-70]. Единичны случаи применения поперечно-поточного [56] или ультразвукового [61, 64, 65] распылителей, а также распылителя Бабингтона [63].

Таблица 3. Примеры МС-ИСП анализа биологических жидкостей после окислительной минерализации

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Условия минерализации	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, Zn	10	1 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> 10 ч 180°C	Ir, Rh, Sc	без подбора матрицы	[41]
	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Zn	20	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> 1 ч ~100°C	In, Ir, Lu	без подбора матрицы	[42]
	Al, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Si, Sn, Sr, Tl, V, W, Zn, Zr	15	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> 5 ч 80°C	In, Pt, Sc	метод добавок	[43]
	Se, Cu, Mn	25	0,5 мл пробы - HNO <sub>3</sub> и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> нагревание до 95°C и выпаривание	Ge, In	без подбора матрицы	[44]
	Al, As, Ba, Cd, Co, Cu, Li, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, U, V, Zn	15	1 мл пробы - HNO <sub>3</sub> и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> нагревание до 95°C и выпаривание	Ge, Lu, Rh, Sc	без подбора матрицы	[45]
	Cd, Hg, Pb	10	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> и 1 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 ч 60°C	Rh	метод добавок	[46, 47]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Условия минерализации	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	As, Cd, Hg, Pb, Se, Tl	10	0,75 мл пробы - 1,5 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 25 мин до 1000 Вт (230°C)	Ge, Ir, Rh	метод добавок	[48]
	As, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Se, Zn	25	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> и 3 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ~3 ч до 95°C	Bi, Ge, Te	подбор матрицы	[49]
	Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Br, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Ga, Ge, Hf, Hg, I, Li, Mn, Mo, Nb, Ni, Rb, Re, Pb, Sb, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Te, Th, Ti, Tl, U, V, W, Y, Zn, Zr, лантаноиды, платиновые металлы	10	1 мл пробы - 1,5 мл HNO <sub>3</sub> (1:2) МВ: 30 мин 300 Вт	In	подбор матрицы	[50]
	Cu, Mn, Se, Zn	15	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 4 ч 100°C	Ga, In	подбор матрицы	[51]
	Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V, Zr	10	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 5 ч 90°C	Ga, Rh	метод добавок	[52]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Условия минерализации	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	Ag, Al, Au, B, Ba, Be, Bi, Br, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hf, Hg, I, La, Mn, Mo, Nb, Ni, Rb, Re, P, Pb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Te, Th, Ti, Tl, U, V, W, Y, Zn, Zr, платиновые металлы	20	1 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 1 ч 600 Вт	In, Lu, Sc	без подбора матрицы/ подбор матрицы (Bi, Cd, Sb, Zn)	[53]
	Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Zn	15	0,5 мл пробы - 1,5 мл HNO <sub>3</sub> и 1 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: 23 мин до 900 Вт (190°C)	Rh	подбор матрицы	[54]
	Al, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Pd, Pb, Pt, Sn, V	20	0,5 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> и 1 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: до 180°C	Y	без подбора матрицы	[55]
	Cr, Ni	50	1 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> и 2 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: 32 мин до 800 Вт	Rh	без подбора матрицы	[56]
	Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn	50	0,5 мл пробы - 2 мл HNO <sub>3</sub> и 6 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: 25 мин 950 Вт (190°C)	Y	подбор матрицы	[57]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Условия минерализации	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь	Au, Ir, Pd, Pt	~7	1 мл пробы - 4 мл 0,5% HNO <sub>3</sub> и 1,6 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> УФ: 60 мин 1000 Вт	–	метод добавок	[58]
Сыворотка крови	Ag, Cs, Mo, Rb, Se, Sr	10	0,5 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> 5 ч 110°C и выпаривание	Ge, Re, Rh	без подбора матрицы	[59]
	Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Zn	20	0,15 мл пробы - 0,15 мл HNO <sub>3</sub> и 0,1 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ~2,5 мин 96°C	Bi, Ga, In, Sc, Y	подбор матрицы	[60]
	Ti, Zr	–	2 мл пробы - 1,5 мл HNO <sub>3</sub> и 0,5 мл HF в автоклаве 8 ч до 180°C	Rh	подбор матрицы	[61]
	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Zn	20 и более	0,5 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> , 0,5 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и 0,2 мл HF МВ: 22 мин до 300 Вт 180°C	Rh	подбор матрицы	[62]
Моча	U	2	5 мл пробы - 5 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 20 мин 180°C	–	метод добавок	[63]
	Pd, Pt, Rh	20	5 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> и 2 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> УФ: 90 мин 500 Вт	In	подбор матрицы	[64]
	Cd, Co, Cr, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, V	20	5 мл пробы - 1 мл HNO <sub>3</sub> и 2 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> УФ: 90 мин 500 Вт	Y	подбор матрицы	[65]

Образец	Определяемые элементы	Кратность разбавления	Условия минерализации	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Кровь и сыворотка крови	Al, B, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Rb, Sc, Sr, Ti, Zn	10	0,5 мл пробы - 1 или 0,5 мл HNO <sub>3</sub> 3 ч 95°C	Rh	метод добавок	[66]
	Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	–	0,5 мл пробы - 0,4 мл HNO <sub>3</sub> и 0,4 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: 2 мин 300 Вт	–	без подбора матрицы	[67]
	Ca, Cu, K, Mg, Rb, Sr, Zn	10	1 мл пробы - 1,5 мл HNO <sub>3</sub> и 0,5 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> МВ: 27,5 мин до 1000 Вт	Ga, In, Re	без подбора матрицы	[68]
Сыворотка крови и моча	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Pt, Tl, V, Zn,	10 и 2	0,5 мл пробы - 2 мл 1% HNO <sub>3</sub> 40 мкл HNO <sub>3</sub> и 0,5 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 мл пробы - 0,6 мл H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> УФ: 40/ 45 мин до 1000 Вт	–	метод добавок	[69]
Кровь, сыворотка крови и моча	Al, Bi, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Tl, Pb	10, 5 и 5	1 мл пробы - 2 мл/ 1 мл/ 0,5 мл HNO <sub>3</sub> МВ: 40 мин до 130/ 80/ 60°C	In, Pt, Sc	метод добавок	[70]

### 1.1.2. Применение МС-ИСП в разработке лекарственных средств

Как следует из рассмотренного выше материала, масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой широко используют в элементном анализе биологических жидкостей для решения задач биомониторинга или скрининга маркеров различных заболеваний. Однако на этом ее роль в клинической практике не ограничивается: МС-ИСП активно применяют и в разработке новых фармацевтических препаратов.

Несмотря на то, что большинство действующих веществ лекарственных средств по своей структуре являются органическими молекулами, содержащими только неметаллические атомы, отдельно в фармакологии существует целый класс металлоорганических соединений, которые представляют особую терапевтическую ценность, – класс так называемых лекарств на основе координационных соединений металлов (англ. metallodrugs) [75]. К нему можно отнести, в первую очередь, противоопухолевые (Pt, Ru, Ga, Au, Sn и т.д.), противовоспалительные (Cu), противоревматические (Au), антидиабетические (Zn, V) препараты, а также диагностические агенты для магнитно-резонансной томографии (Gd) и радионуклидной диагностики (Co, Tc). Именно в разработке этих соединений незаменима МС-ИСП. При этом она может использоваться и как самостоятельный метод анализа, и в сочетании с подходящими методами разделения, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией или капиллярным электрофорезом [76, 77]. В рамках этой работы подробнее остановимся на примерах и проблемах применения МС-ИСП без сочетания с каким-либо другим методом в разработке противоопухолевых препаратов.

Перед тем как соединения, претендующие на звание лекарственного средства, будут подвергнуты доклиническим и клиническим испытаниям, с целью отсеивания неподходящих кандидатов их свойства довольно подробно изучают *in vitro*. Растворимость, стабильность во времени, липофильность, являющаяся индикатором возможности проникновения вещества через клеточные мембраны, а также связывание с транспортными белками плазмы крови можно исследовать напрямую с помощью МС-ИСП. *In vivo* испытания также не обходятся без применения этого метода.

Независимо от способа ввода лекарства в организм человека (перорально или внутривенно) его растворимость должна быть достаточной, чтобы обеспечить относительно высокую биодоступность. Определить растворимость методом масс-

спектрометрии с индуктивно связанной плазмой не составляет проблемы. При этом обычно насыщенные растворы препаратов разбавляют 1 об.% азотной кислотой с целью избежать прежде всего спектральных помех, связанных с составом растворителя [76], что особенно важно в случае измерения легких элементов, таких как галлий [78].

Для изучения стабильности лекарств во времени этот метод без сочетания с разделением применяется не столь широко. В литературе встречаются только несколько работ по данной тематике, например, по масс-спектрометрическому исследованию высвобождения платинового препарата из полимерной мицеллы, в которую он был инкапсулирован [79], и частичной трансформации платиновых наночастиц, выделенных из опухоли [80].

В качестве параметра, характеризующего липофильность таких фармацевтических субстанций, в медицинской практике используют логарифм коэффициента распределения вещества в системе 1-октанол – вода (**log P**). При определении **log P**, лежащего в диапазоне от -2 до 4, чаще всего применяют так называемый метод встряхивания во флаконе [81]. Для этого добиваются достижения равновесия в распределении препарата между двумя фазами, а затем определяют содержание элемента в них обычно с помощью спектрофотометрии, газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографии, атомной абсорбционной спектроскопии или атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП). Применение масс-спектрометрии целесообразно только в граничных случаях, когда концентрация соединения в одной из фаз исключительно мала и не может быть определена вышеперечисленными методами. Так как вводить 1-октанол (в чистом виде или разбавленным каким-либо органическим растворителем) в прибор нежелательно, обычно содержание препарата в органической фазе устанавливают спектрофотометрически [82] или вычисляют как разность между его содержанием в водной фазе до и после распределения [78, 83-85].

Прямое использование МС-ИСП в исследовании взаимодействия лекарственного средства с белками плазмы крови возможно только после физического разделения связанной и несвязанной с белками фракциями препарата. Это достигается либо за счет ультрацентрифугирования [86-88] либо за счет ультрафильтрации [89-96]. Ультрацентрифугирование характеризует связывание без учета каких-либо матричных и сорбционных эффектов, влияющих на этот процесс, поэтому такую процедуру



используют редко и только для качественной оценки. Иногда ее применяют совместно с соосаждением белков с помощью этанола или ацетонитрила [77]. Ультрафильтраты плазмы наоборот довольно часто подвергают количественному анализу с помощью МС-ИСП. Для их получения обычно плазму центрифугируют через концентраторы с порогом отсечения 10 кДа [90, 93, 95, 96] или 30 кДа [89, 91, 92, 94, 96]. При этом одним из главных недостатков этого способа разделения фаз является вероятность неспецифического связывания препарата или его аддуктов с белками на мембране или других пластмассовых частях фильтра. Чтобы избежать получения неправильных результатов необходимо всегда проверять материальный баланс [76].

В *in vivo* исследованиях, проводящихся на стадии доклинических и клинических испытаний, также часто используют МС-ИСП. Она позволяет охарактеризовать распределение лекарства в биологических жидкостях и тканях после введения в организм. В силу высокой чувствительности метода подобное распределение можно изучать даже по прошествии значительного времени, контролируя процессы выведения.

В табл. 4 представлены некоторые примеры определения общего содержания платины в биологических жидкостях людей и животных, подвергшихся лечению наиболее распространенными противоопухолевыми препаратами. Как и в случае простого МС-ИСП скрининга элементов в подобных субстратах перед анализом пробы чаще всего разбавляют [86-103, 105, 109, 110], реже минерализуют и затем разбавляют [97, 104, 106-108]. Разбавителями могут служить как деионированная вода [91-94, 96, 97, 104, 108], 1 об.% азотная кислота [86-89, 95, 97-101, 103, 105], так и более сложные смеси Тритон X-100 – ЭДТА –  $\text{NH}_3$  [90, 110] и Тритон X-100 – 1-бутанол –  $\text{HNO}_3$  [102, 109]. После минерализации пробы также разбавляют 1-3 об.% соляной кислотой [106, 107] с целью устранения эффекта памяти (наблюдаемого при вводе растворов Pt в 1 об.% азотной кислоте) за счет образования хлорокомплексов металла. Кратность разбавления обычно подбирается как компромисс между пределом обнаружения элемента и максимально возможным нивелированием матричных помех, поэтому если содержание препарата в пробе велико, то и ее разбавление может быть достаточно сильным (в 100 и более раз) [89-93, 99, 101, 104].

Оценка роли спектральных помех в искажении результатов осуществляется, прежде всего, за счет исследования растворов, имитирующих матричный состав проб. Реже для устранения интерференций используют приборы со столкновительными или

реакционными ячейками [105] или масс-спектрометры высокого разрешения [105, 107].

В дополнение к пробоподготовке устранению неспектральных матричных помех, как уже многократно обсуждалось, должна способствовать и адекватная градуировка. Чаще всего градуировочные растворы готовят в той же, что и анализируемые образцы, матрице [86-90, 93-95, 97-100, 102, 108, 110]. В силу большого потребления образца и серьезных временных затрат метод добавок применяют реже [105]. Практически всегда дополнительно используют и метод внутреннего стандарта. Применение ВС не только позволяет нивелировать возможные помехи, но и учесть инструментальный дрейф. При этом выбор внутреннего стандарта, даже в случае одного аналита, неоднозначен. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что в качестве ВС могут быть применены элементы, отличающиеся от Pt как по атомной массе (Eu, In, Rh, Tb), так и по ПИ (Bi, Eu, In, Rh, Re, Tb, Tl). Однако чаще других используют элементы с параметрами, сходными по обоим критериям, – Ir [89, 92, 94, 95, 97, 100, 105] и Au [103, 106, 108], хотя применение золота осложнено эффектами памяти при его вводе в прибор.

Среди используемых распылителей преобладают концентрические [86, 87, 89, 97, 105], реже применяют поперечно-поточные [91, 98] или ультразвуковые [107].

\* \* \*

Как уже было неоднократно отмечено, ключевой проблемой МС-ИСП анализа объектов в клинической практике является устранение матричных помех. Если со спектральными интерференциями удастся легко справиться инструментальными или чисто математическими способами, то нивелирование неспектральных помех сопряжено с дополнительными трудностями. Чаще других применяемая в этом случае градуировка с подбором матрицы требует априорного знания состава анализируемого раствора, а так как состав может значительно варьироваться от пробы к пробе, такой способ совсем не универсален. К основным недостаткам метода добавок можно отнести расход большего количества исследуемого материала, а также существенные временные затраты. Применение с той же целью метода ВС осложняется необходимостью выбора подходящих элементов на эту роль при неясности четких критериев этого выбора. В связи с этим, остановимся подробнее на рассмотрении основных видов неспектральных помех, их влиянии на результаты анализа и методах уменьшения этого влияния только инструментальными способами.

Таблица 4. Примеры МС-ИСП определения Pt противоопухолевых препаратов в биологических жидкостях

Образец	Препарат	Пробоподготовка	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Ультрацентрифугат, плазма	цисплатин	разбавление в 7 и 20 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Eu	подбор матрицы	[86]
	оксалиплатин	разбавление в 10 и 20 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Eu	подбор матрицы	[87]
Ультрацентрифугат, ультрафильтрат, плазма	оксалиплатин	разбавление в 10 и 20 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Eu	подбор матрицы	[88]
Ультрафильтрат	цисплатин карбоплатин оксалиплатин	разбавление в 100 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Ir	подбор матрицы	[89]
	цисплатин	разбавление в 167 раз Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	In, Tl	подбор матрицы	[90]
Ультрафильтрат, плазма	цисплатин	разбавление в 7 и 20 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Eu	подбор матрицы	[98]
Ультрафильтрат, сыворотка крови	цисплатин карбоплатин	разбавление в 100 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Bi	подбор матрицы	[99]
Ультрафильтрат, плазма, моча	оксалиплатин	разбавление в 30, 100 и 200 раз водой	–	без подбора матрицы	[91]
		разбавление в 60, 250 и 400 раз водой	Ir	без подбора матрицы	[92]

Образец	Препарат	Пробоподготовка	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Ультрафильтрат, плазма, моча	BBR3464	разбавление в 10-100 раз водой	–	подбор матрицы	[93]
	JM216	разбавление в 10-100 раз водой	Ir	подбор матрицы	[94]
	сатраплатин	разбавление в 30 и 50 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Ir	подбор матрицы	[100]
	цисплатин	разбавление в 100 и 50 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	In	подбор матрицы	[101]
	–	разбавление в 30 и 50 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Ir	подбор матрицы	[95]
Ультрафильтрат, плазма, кровь	сатраплатин	разбавление в 25 раз водой	–	без подбора матрицы	[96]
	оксалиплатин	разбавление в 18 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub> / окислительная минерализация, разбавление в 100 и 50 раз водой	Ir	подбор матрицы	[97]
Плазма	дициклоплатин	разбавление в 40 раз Тритон – 1-бутанол – HNO <sub>3</sub>	Re	подбор матрицы	[102]
Сыворотка крови	цисплатин	разбавление в 20 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Au	без подбора матрицы	[103]
	карбоплатин	окислительная минерализация, разбавление в 100 раз водой	Tb	без подбора матрицы	[104]

Образец	Препарат	Пробоподготовка	Внутренние стандарты	Градуировка	Ссылка
Моча	–	разбавление в 3 или 10 раз 1 об.% HNO <sub>3</sub>	Ir	метод добавок	[105]
Плазма, моча	цисплатин	окислительная минерализация, выпаривание и разбавление в 10 раз 1 об.% HCl	In (Au)	без подбора матрицы	[106]
Сыворотка крови, моча	карбоплатин	окислительная минерализация, разбавление в 40 раз водой/ окислительная минерализация, выпаривание и разбавление в 5 раз 3 об.% HCl	In, Re	без подбора матрицы	[107]
Кровь	цисплатин	окислительная минерализация, выпаривание и разбавление в 10 раз водой	Au	подбор матрицы	[108]
Кровь, моча	цисплатин	разбавление в 20 раз Тритон – 1-бутанол – HNO <sub>3</sub>	Rh	без подбора матрицы	[109]
Плазма, кровь	цисплатин карбоплатин оксалиплатин сатраплатин ормаплатин	разбавление в 24 раза Тритон – ЭДТА – NH <sub>3</sub>	–	градуировка в 10 об.% HCl	[110]

## 1.2. Неспектральные матричные помехи в МС-ИСП

При анализе рассматриваемых в данной работе объектов могут проявляться следующие виды неспектральных матричных помех – влияние кислоты (прежде всего азотной кислоты, используемой для минерализации), сопутствующих элементов (элементов растворенных неорганических солей) и органических веществ (в первую очередь используемых растворителей, а также составных компонентов биологических жидкостей).

### 1.2.1. Влияние кислоты

Влияние кислоты (англ. acid effect) обычно разделяют на два подвида [111]. Так называемое постоянное влияние (англ. steady state) заключается чаще всего в подавлении сигналов определяемых элементов при анализе растворов с повышенной кислотностью [112]. Причинами этого подавления служат изменения в процессах забора пробы, образования аэрозолей, транспортировки растворителя и аналита, а также ионизации внутри плазмы. При этом величина подавления зависит как от концентрации, так и природы кислоты. Проявляющееся при анализе растворов с различной кислотностью краткосрочное с постепенным затуханием в течение 5 – 25 мин резкое занижение или завышение сигналов до 50% ниже или выше величины, характерной для равновесного состояния, соответствующего новому постоянному влиянию, известно как эффект «памяти» кислоты (англ. transient) [113]. Объясняется оно различием в скоростях испарения аэрозоля и раствора, оставшегося на стенках в распылительной камере от предыдущей пробы, что в свою очередь влияет и на эффективность транспортировки аналита в плазму.

Проявление постоянного влияния кислоты затрагивает, как было сказано выше, многие протекающие в ходе анализа процессы. Условно их можно разбить на две группы: 1) процессы, зависящие от физических свойств раствора, – поступление пробы в распылитель, образование аэрозолей, транспортировка растворителя и аналита, и 2) процессы, протекающие непосредственно в самой плазме, – не только ионизация, но и предшествующие ей десольватация, испарение, атомизация [114].

Безусловно, физические свойства растворов кислот могут существенно отличаться от таковых для воды. Среди них особо следует выделить те, что наиболее

значимы с точки зрения анализа, – вязкость, поверхностное натяжение, плотность и летучесть. В **табл. 5** представлены значения некоторых физических величин для растворов азотной и соляной кислот разных концентраций (именно эти кислоты будут использованы в работе). Очевидно, что основной вклад в изменение поведения растворов кислот вносят их вязкость и плотность.

**Таблица 5.** Физические свойства растворов кислот при 25°C [114]

Кислота	Содержание, масс. %	Вязкость (отн. H <sub>2</sub> O)	Поверхностное натяжение, мН/м	Плотность, г/см <sup>3</sup>
HNO <sub>3</sub>	4	1,014	72,15	1,022
	30	1,397	68,75	1,180
HCl	4	1,057	72,45	1,017
	30	1,896	65,75	1,149

Зависимость скорости забора пробы от содержания кислоты в ней может проявиться при использовании самых распространенных пневматических распылителей только в режиме самовсасывания. Возможность работы в этом режиме характерна для часто используемых в клинической практике концентрических распылителей. Описать весь процесс ввода пробы в этом случае можно с помощью всего одного модифицированного уравнения Пуазейля, из которого следует, что при увеличении вязкости образца скорость его забора уменьшается. Последнее может вызывать подавление сигналов определяемых элементов за счет снижения количества поступающего в прибор аналита [114, 115]. Для растворов с повышенной кислотностью, как видно из **табл. 5**, значения вязкости как раз выше. Если же проба подается посредством какого-либо насоса (шприцевого или перистальтического), данный эффект частично или полностью устраняется, что было, например, показано в работах с использованием АЭС-ИСП [115-117].

Грубо оценить влияние кислоты на величину среднего заутеровского диаметра ( $D_{3,2}$ ) – одной из важнейших характеристик первичного аэрозоля – в случае применения пневматических распылителей можно с помощью уравнения Нукиямы-Танасавы, связывающее между собой  $D_{3,2}$  и физические свойства распыляемого раствора. Однако оно работает только в определенных диапазонах вязкости, поверхностного натяжения и плотности, а также в случае применения распылителя с импактором, поэтому часто дает неправильные, сугубо теоретические результаты [114]. Экспериментально же показано,

что влияние кислоты на распределение капель первичного аэрозоля по размерам отличается в разных режимах подачи образца [117]. В режиме самовсасывания повышение концентрации азотной или соляной кислот в растворе приводит к образованию более высокодисперсного аэрозоля. Связано это с тем, что с увеличением вязкости пробы и, как следствие, уменьшением загрузки распылителя при постоянной скорости потока газа больше кинетической энергии аргона приходится на единицу объема жидкости. В то же самое время при использовании насосов увеличение содержания кислоты приводит к формированию аэрозоля, обогащенного каплями большего среднего диаметра. При этом для менее вязких кислот (такими и являются азотная и соляная кислоты), различие средних диаметров капель в разбавленных и более концентрированных растворах не так уж существенно [111, 117].

Влияние кислоты на образование третичного, выходящего из распылительной камеры, аэрозоля более универсально: чем выше содержание кислоты в растворе, тем менее крупнодисперсным является аэрозоль [117, 118]. Сильнее этот эффект, однако, проявляется в режиме самовсасывания. Возможным объяснением наблюдаемой закономерности является меньшая вероятность выхода из распылительной камеры капель крупного размера при повышенной плотности раствора, из которого они состоят, в силу их большей инерции. Другая важная характеристика, являющаяся своего рода индикатором влияния кислоты на транспортировку раствора через распылительную камеру – процент объема аэрозоля, занятый каплями жидкости, ( $VC$ ) – при незначительном увеличении концентрации кислоты не изменяется вовсе или также несущественно возрастает [117]. При этом отмечено, что величина  $VC$  зависит и от конструкции используемой распылительной камеры [119]. Так, использование циклонной камеры не приводит к изменению  $VC$  при переходе от воды к 3 М раствору азотной кислоты, в то время как в случае применения двухходового аналога наблюдается ее увеличение в два раза. Кроме этого, в работе [111] показано, что еще одна величина – общий объем частиц, проходящих в определенном направлении через поперечное сечение в единицу времени, уменьшается при увеличении концентрации азотной кислоты от 2 до 25 об.%. Однако проявление этого эффекта зависит не только от конструкции всей системы распыления, но и от скорости потока аргона: чем выше скорость потока, тем ярче проявляется эффект.

Суммарно оценить влияние кислоты на массоперенос раствора можно с помощью



измерения скоростей транспортировки растворителя ( $S_{\text{tot}}$ ) и аналита ( $W_{\text{tot}}$ ). Причем последняя характеристика наиболее важна, так как измеряемый аналитический сигнал должен быть пропорционален массе анализируемого вещества, дошедшего до плазмы. Различие в величинах  $S_{\text{tot}}$  для воды и растворов  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HCl}$  не столь принципиальны, как в случае более вязких минеральных кислот [120]. Выше уже было отмечено, что, вне зависимости от режима подачи пробы, образуемые первичный и третичный аэрозоли  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HCl}$  достаточно высокодисперсны. Помимо этого, большая летучесть их растворов также способствует тому, что  $S_{\text{tot}}$ , если изменяется, то незначительно. В первом приближении  $W_{\text{tot}}$  уменьшается, если в растворе присутствует кислота [114]. При этом более сильное снижение скорости транспортировки аналита характерно, прежде всего, для растворов вязких кислот, вводимых в прибор в режиме самовсасывания. В случае  $\text{HNO}_3$  и  $\text{HCl}$  значимое изменение этой величины наблюдается только при высоких их содержаниях в растворе (более 30 масс.%) [117]. В общем, в режиме самовсасывания  $W_{\text{tot}}$  зависит от количества распыленной жидкости, в то время как при использовании насоса – от распределения капель аэрозоля по размерам. Установлено также, что скорость потока газа через распылитель [111] и конструкционные особенности распылительной камеры [119] могут оказывать влияние на эту величину. Так, чем выше скорость потока аргона, тем менее заметно снижение  $W_{\text{tot}}$ . Использование циклонной распылительной камеры (по сравнению с двухходовой) также оказывается предпочтительнее.

Что же касается процессов, происходящих непосредственно в плазме, влияние кислоты в этом случае сильно зависит от значений операционных параметров прибора, в первую очередь, скорости потока аргона через распылитель и/или мощности генератора [112]. Использование «стандартного» режима, когда настройка масс-спектрометра на максимальную чувствительность определения осуществлена с помощью специального раствора элементов разных атомных масс в 2 об.%  $\text{HNO}_3$ , всегда приводит к подавлению сигналов в образцах с повышенной кислотностью. Возможным объяснением этого факта может быть менее эффективная в этих условиях ионизация элементов, в особенности тех, что имеют высокий ПИ, в силу большей загрузки плазмы азотной кислотой и, как следствие, снижения ее локальной температуры. Дело в том, что энергия плазмы, потребляемая на испарение и атомизацию молекул  $\text{HNO}_3$  намного больше, чем в случае молекул  $\text{H}_2\text{O}$ , а вклад продуктов распада азотной кислоты (с термической

проводимостью большей, чем у Ar) в перенос энергии к центральному каналу намного меньше, чем у воды [112]. К тому же в условиях пониженной температуры плазмы пропускная способность через ионную оптику заряженных частиц с меньшей средней кинетической энергией падает. При переходе к режиму так называемых «устойчивых» параметров, когда скорость потока аргона снижена по отношению к «стандартным» характеристикам, а используемая мощность генератора остается прежней или повышается, наблюдается устранение подавления сигналов за счет увеличения эффективности процессов десольватации, испарения, атомизации и ионизации. Связано это с двумя причинами: во-первых, при уменьшении скорости потока аргона аэрозоль медленнее перемещается от кончика инжектора горелки до плазмы, во-вторых, область резкого (от ста до нескольких тысяч градусов) перепада температур смещается к кончику инжектора; все это способствует увеличению времени нахождения распыленного раствора в высокотемпературной зоне [111]. Также отмечено, что при глубинах отбора менее 15 мм, оптимизация параметров работы прибора приводит к установлению меньших значений скорости потока аргона и больших величин мощности, что, в свою очередь, позволяет еще более эффективно нивелировать влияние кислоты.

Тем не менее, так как скорость потока аргона через распылитель оказывает влияние и на процессы, зависящие от физических свойств образца, достоверно определить, чем конкретно обусловлено изменение сигналов и как полностью устранить это влияние, часто бывает невозможно. Другими словами, абсолютного критерия выбора «устойчивых» значений параметров (как в АЭС-ИСП) в МС-ИСП нет [112].

Несколько раз выше упоминалось, что влияние кислоты зависит от конструкции системы распыления пробы, точнее используемых распылителей и распылительных камер [114]. Однако четко выраженных закономерностей в этой области установить не удается. Очевидно только одно, что применение циклонных распылительных камер более логично.

Помимо тех методов, что активно используют в клинической практике (подбор матрицы, методы добавок и внутреннего стандарта), а также выбора «устойчивых» значений параметров, для нивелирования влияния кислоты можно применять и чисто технические способы. Одним из них является отказ от использования распылительной камерой, а именно подача пробы в плазму через распылитель прямого ввода [121-123]. Другое решение – применение десольватационных систем, способствующих испарению

существенной части растворителя, содержащегося в первичном аэрозоле, с последующим удалением паров с помощью конденсатора или мембраны [124, 125]. Эффективным может быть и переход к элетротермическому испарению как способу ввода образца [126-128]. В этом случае кислоту также предварительно выпаривают. Кроме этого, применение смешанной Ar-CH<sub>4</sub> плазмы может способствовать достижению тех же целей [129].

Эффект «памяти» кислоты обнаруживает себя в ходе анализа в момент переключения от одного раствора с меньшим или большим содержанием кислоты на другой с большей или меньшей кислотностью. Так, например, если изначально в систему ввода прибора в продолжение некоторого времени подавать 10 об.% HNO<sub>3</sub>, а затем быстро сменить раствор на 2 об.% HNO<sub>3</sub>, то интенсивность сигналов анализируемых элементов резко возрастет до значения большего, чем при длительной подаче этого менее концентрированного раствора (что соответствует постоянному влиянию 2 об.% HNO<sub>3</sub> на сигналы). Впоследствии, в течение нескольких минут данный эффект нивелируется, и достигается равновесное значение аналитических сигналов, соответствующее новому постоянному уровню кислоты. Аналогичная ситуация характерна и для противоположного случая, когда 2 об.% кислоты заменяют на 10 об.%, при этом, однако, наблюдается временное резкое занижение сигналов.

Важно отметить, что величина изменения интенсивности сигналов, а также время релаксации зависят от природы и концентрации кислоты. Чем больше разница в кислотности растворов, тем более резким будет изменение сигналов. Кроме этого, данный эффект сильнее проявляется при пониженных скоростях забора пробы и подачи аргона через распылитель, что возможно связано с большим временем нахождения аэрозоля внутри распылительной камеры. Варьирование мощности генератора практически не оказывает никакого заметного влияния на устранение этого эффекта, хотя при повышенных мощностях нивелируется разница во временном влиянии азотной кислоты на элементы с различными ПИ. Все представленные закономерности идентичны для различных пневматических распылителей, а также генераторов [113].

Предлагаемое авторами этой работы объяснение причин возникновения эффекта «памяти» кроется в изменении интенсивности испарения аэрозоля внутри распылительной камеры. Пары воды образуются внутри камеры за счет испарения либо предыдущей пробы, оставшейся на ее стенках, либо капель аэрозоля, образованного из

подаваемого в прибор нового образца. При этом между этими двумя процессами наблюдается некая конкуренция, а относительные вклады в формирование паров воды будут зависеть от кислотности растворов. Как известно, давление паров воды уменьшается при увеличении содержания кислоты в пробе. Поэтому, если перед введением анализируемого образца кондиционирование системы осуществлялось с помощью раствора с высокой концентрацией кислоты, относительное содержание паров воды в распылительной камере будет понижено. При поступлении в такую относительно «сухую атмосферу» аэрозоля, сформированного из раствора с меньшим содержанием кислоты, интенсивность испарения последнего должна увеличиться. Это, в свою очередь, означает, что возрастет количество аналита, переносимого в плазму, за счет транспортировки более мелких, концентрированных (с точки зрения определяемых элементов) капель. Обратная ситуация наблюдается в случае перехода от растворов с меньшей кислотностью к растворам с высоким содержанием кислоты.

Чтобы избежать проявления эффекта «памяти» кислоты, нужно подбирать матрицы контрольных и градуировочных растворов в соответствии с кислотностью анализируемых образцов и никогда не применять для промывания деионированную воду. Иначе, для получения правильных результатов анализа будет необходимо кондиционировать систему между пробами в течение длительного (до 25 мин) времени. Однако, устранить данный эффект можно и только инструментальными способами. Увеличение скорости забора пробы или подачи аргона через распылитель, как было отмечено ранее, обычно уменьшает время, необходимое для достижения равновесного состояния, соответствующего новому постоянному влиянию кислоты. Эффективно также применение распылителя прямого ввода или нагревание стенок распылительной камеры [113].

### **1.2.2. Влияние сопутствующих элементов**

Традиционно влияние сопутствующих элементов на результаты МС-ИСП анализа разделяют также на два вида [130]. Так называемое обратимое влияние приводит к изменению аналитического сигнала только во время подачи пробы в прибор. Необратимое же влияние характеризуется постепенным снижением интенсивности сигналов и сохраняется даже после прекращения ввода образца. Связано это с

отложением солей или оксидов матрицы анализируемого раствора на поверхностях конусов и ионной оптики масс-спектрометра, что приводит к снижению пропускной способности всех этих частей прибора по отношению к аналиту, прежде всего, за счет уменьшения диаметра отверстий. Кроме этого, как утверждается в работе [113], при анализе растворов с различным солесодержанием возможно и проявление эффекта, аналогичного эффекту «памяти» кислоты, так как причина его возникновения универсальна и не привязана только к кислотной матрице.

В целом, присутствие избытка сопутствующих элементов в растворе может способствовать как подавлению аналитических сигналов [120, 131-140], так и их завышению или полному отсутствию какого-либо эффекта [141-143]. В работе [142] экспериментально подтверждено, что при определении Ge, As и Se в 1 масс.% растворах матричных компонентов в зависимости от их природы возможны все три варианта: подавление – в растворах Na или K, завышение – в растворах Cl, S или C и отсутствие влияния – в растворах N или P. Авторами работы [143] описано аналогичное наблюдение: подавление сигналов Cr, Fe, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Cd, Sn, Hg и Pb в 0,01 М растворах B, Al или U, завышение – в растворах Na, K, Mg или Ca и отсутствие влияние – в растворе Li. При этом следует отметить, что в одной работе Na и K вызывают занижение сигнала As, а в другой, наоборот, завышение. В дополнении к этому, влияние сопутствующих элементов может проявляться и в изменении фонового ионного тока. При увеличении концентрации Bi или матричных элементов с ПИ выше 6 эВ регистрируется снижение интенсивностей сигналов аргон-содержащих частиц:  $Ar^+$ ,  $ArH^+$ ,  $ArO^+$  и  $Ar_2^+$ , в то время как повышение содержание Na или элементов с ПИ ниже 6 эВ приводит к противоположному результату [135]. Из приведенных примеров становится очевидным, что данный вид несектральных матричных помех довольно сложен по своей природе, поэтому сначала подробнее остановимся на рассмотрении возможных механизмов, объясняющих его возникновение.

Влияние матричных компонентов, прежде всего, легко ионизируемых элементов, начинает проявляться уже непосредственно в распылительной камере. Если избыточное присутствие некоторых компонентов в растворе практически не приводит к изменению свойств первичного аэрозоля независимо от вида применяемого распылителя [120], то характеристики третичного обычно существенно меняются. Дело в том, что капли, образуемые с помощью пневматических систем, несут на своей поверхности

электрический заряд, который тем выше, чем больше содержание солей в растворе. Именно за счет увеличения частоты деления таких заряженных капель и формируется более высокодисперсный третичный аэрозоль [144]. Скорость транспортировки растворителя  $S_{\text{tot}}$ , как и в случае влияние кислоты, остается при этом практически неизменной, видимо, по аналогичным причинам [120]. Величина же  $W_{\text{tot}}$  обычно уменьшается. Возможным объяснением этому может быть перераспределение гидратированных ионов в аэрозоле (англ. aerosol ionic redistribution, AIR) за счет их разной (в зависимости от размера) способности к миграции в направлении двойного электрического слоя, образуемого на границе раздела фаз капля-воздух [145]. Так как аналитический сигнал пропорционален массе определяемого элемента, дошедшего до плазмы, уменьшение  $W_{\text{tot}}$  может привести к снижению интенсивности.

Механизмов, объясняющих проявление обратимого влияния сопутствующих элементов непосредственно в плазме, системе интерфейса или ионной оптике, гораздо больше. Причем обычно авторами одних и тех же работ предлагается сразу несколько вариантов.

Самой простой трактовкой уменьшения сигналов аналитов с относительно высоким ПИ является подавление их ионизации в растворах, содержащих соли легко ионизируемых элементов. Это происходит за счет увеличения эффективности ион-электронной рекомбинации при повышении плотности электронов в плазме [131-134, 136, 139, 141].

Если же экспериментально обнаруживается зависимость величины снижения сигналов от атомной массы, то явных причин этому несколько. В случае, когда «тяжелые» сопутствующие элементы сильнее подавляют сигналы относительно «легких» аналитов, объяснение кроется в рассеянии определяемых ионов в силу столкновения с частицами компонентов матрицы в зоне сверхзвукового расширения между сэмплером и скиммером [132-134]. Особенно ярко этот эффект должен проявиться для Li в матрице, содержащей U [134]. Однако, это не единственный вариант толкования наблюдаемого эффекта. Он может быть также соотнесен с возникновением объемного положительного заряда в высоковакуумной части масс-спектрометра сразу за скиммером вследствие интенсивной экстракции электронов из ионного потока под действием вакуума [133, 135, 137, 138, 141]. В отсутствии сопутствующих компонентов заряд состоит, в основном, из частиц  $\text{Ar}^+$ . С нарастанием концентрации матрицы ионы

элементов последней будут доминировать в заряде, повышая его плотность и как следствие, увеличивая, в наибольшей степени, рассеяние ионного потока «легких» изотопов (с массой менее 80). При этом рассеяние будет проходить тем сильнее, чем «тяжелее» матричные ионы.

В другом случае, когда более значительное изменение аналитического сигнала наблюдается для элементов с большей атомной массой, скорее всего, помехи вызваны либо изменениями в радиальной диффузии внутри плазмы, либо отложением солей на поверхности конуса [136, 139, 141]. На самом деле, увеличение плотности электронов в центральном канале плазмы при подаче высокосолевых растворов может приводить к так называемой амбиполярной диффузии, которая в большей степени влияет на «легкие» аналиты. В результате, в непосредственной близости от этого канала скапливаются элементы с меньшей атомной массой, а так как температура в этой зоне выше, степень ионизации последних увеличивается. Образование на поверхности конуса тонкого слоя вещества с меньшей термической проводимостью также может способствовать проявлению данной закономерности. Действительно, за счет отложения солей температура плазмы вблизи сэмплера повышается, что заметно снижает степень ион-электронной рекомбинации, прежде всего, «легких» элементов из-за их большей концентрации в этой зоне.

В силу такого количества разнообразных объяснений, исследователи сходятся во мнении, что истинная картина происходящего – не что иное, как сумма или совокупность представленных трактовок. Помимо этого, многие авторы [133, 136, 138, 139] утверждают, что доминирующий механизм, впрочем, как знак и величина эффекта могут определяться значениями операционных параметров работы масс-спектрометра и его конструкцией. Так, в работах [133, 136] напрямую указано, что для каждого конкретной установки существуют свои собственные настройки, позволяющие минимизировать влияние сопутствующих элементов («устойчивые» параметры), а разночтения, встречающиеся в литературе, обусловлены именно конфигурацией аппаратуры. Следует отметить, что и класс масс-спектрометра также способен оказывать влияние на степень проявления помех [120, 136]. Считается, что использование приборов высокого разрешения приводит к менее значительным неспектральным интерференциям, чем в случае квадрупольных аналогов. Связано это с ускорением ионов до больших энергий в масс-спектрометрах первого типа.

Несмотря на всю сложность рассматриваемой проблемы, роль операционных параметров в нивелировании данных помех остается главенствующей. При этом основные закономерности остаются более или менее универсальными. Среди прочих настроек особое место, как и в случае влияния кислоты, отводится скорости потока аргона через распылитель [134-136, 138, 146]. Экспериментально доказано, что ее понижение приводит к минимизации влияния сопутствующих элементов. В то же время при высоких скоростях может наблюдаться не только существенное подавление, но и завышение сигналов [134]. Действительно, при уменьшении скорости потока плотность матричных ионов, входящих в состав объемного заряда, по сравнению с  $Ar^+$  падает, что ослабляет проявление помех согласно этому механизму. Также в аналогичном режиме температура плазмы и время нахождения пробы в центральном канале увеличиваются; это способствует более эффективной ионизации элементов и подавлению ион-электронной рекомбинации. Однако так как при этом чувствительность определения падает примерно в 2 – 3 раза [146], обычно правильный выбор скорости потока аргона через распылитель – компромисс между двумя желаниями: достичь низких пределов обнаружения и устранить неспектральные помехи [136].

Варьирование остальных параметров работы прибора, значимых с точки зрения достижения поставленной цели, – скорости подачи пробы в распылитель, мощности генератора, глубины отбора аналитической информации или характеристик ионной оптики – считается менее эффективным [134, 136, 146]. Однако все же установлено, что уменьшение скорости ввода образца точно способствует нивелированию рассматриваемых помех [146]. Задание мощности генератора выше величин, отвечающих максимальной чувствительности определения, приводит к более эффективному переносу энергии внутри плазмы от периферии к центральному каналу, что, в свою очередь, также положительно сказывается на возможности минимизации неспектральных интерференций [134-136, 138, 146]. Недостатком этой манипуляции может стать только увеличение доли двухзарядных ионов в плазме. Значение глубины отбора аналитической информации, а именно расстояния между катушкой индуктивности и отверстием сэмплера, оценивается по-разному. Так, есть мнение, что это расстояние не оказывает никакого влияния на проявление эффектов сопутствующих элементов, что, конечно, противоречит наблюдениям, сделанным на примере АЭС-ИСП определения [132]. В то же время в работе [133] показано, что увеличение глубины



отбора действует подобно разбавлению проб, которое оказывает благоприятное действие на устранение помех в силу меньшей загрузки матричных ионов [134, 138, 139]. Последнее наблюдение, однако, не согласуется с установленными другими исследователями [136, 139] фактами минимизации интерференций при уменьшении расстояния от катушки до сэмплера. Роль настройки ионной оптики масс-спектрометра также неоднозначна [120, 132, 133, 138, 146, 147, 148], хотя в некоторых работах даются конкретные рекомендации, касающиеся установления нужного потенциала на первой линзе-экстракторе [133, 147, 148].

Иногда критичными в подавлении неспектральных помех, обусловленных присутствием сопутствующих элементов, могут быть и размеры отверстий (их внутренних диаметров) сэмплера и скиммера [132, 148]. На самом деле, если отверстие скиммера больше, чем у сэмплера, то матричные эффекты проявляются ярче только для аналитов с относительно высоким ПИ. В противном случае подавлению сигналов подвергаются все элементы, причем минимальная концентрация матричных компонентов, при которой еще не наблюдается никаких изменений, снижается [148].

Ключевым моментом в анализе высокосолевых растворов является также выбор распылителей. Существует несколько вариантов их конструкции, которые позволяют выдерживать подачу проб, содержащих большой избыток солей, – это так называемые распылители Бабингтона и Хилдебранда, V-образный и конусный распылители [149]. В отличие от них также часто применяемые концентрические распылители или распылители прямого ввода могут быстро закупориваться. Те же проблемы характерны и для ультразвуковых распылителей [131], при использовании которых помимо необратимого влияния сопутствующих элементов сильнее проявляются и обратимые помехи за счет увеличения до 3-10 раз количества введенного в плазму вещества. Если же эффективно устранить возможность закупорки отверстий распылителей прямого ввода, то их применение должно способствовать уменьшению влияния матричных компонентов [150].

Среди других, не отмеченных выше, способов устранения или минимизации неспектральных помех данного вида следует отметить различные варианты физического разделения аналита и матрицы (осаждение, электроосаждение, соосаждение, жидкость-жидкостная экстракция, сорбция на ионообменных и хелатообразующих смолах), использование проточно-инжекционных систем для подачи пробы в масс-спектрометр

[120, 149, 151], а также добавление в аргоновую плазму азота [140, 149, 152]. Последнее аналогично по своему действию работе в режиме «устойчивых» параметров.

### 1.2.3. Влияние органических веществ

Хотя стандартные анализируемые с помощью МС-ИСП пробы представляют собой водные растворы неорганических солей и кислот, нередки примеры определения элементов и в более сложных смесях, содержащих, в том числе, органическую матрицу. Действительно, как уже было показано выше, для разбавления биологических жидкостей, которые сами по себе являются конгломератом органических веществ, применяют растворы, в состав которых входят Тритон X-100, ЭДТА, ТМАОН и 1-бутанол или аналогичные спирты. Другим предметом исследования в клинической масс-спектрометрии может быть используемый при изучении липофильности металлолекарств 1-октанол, разбавленный ввиду большой вязкости, а главное, ничтожной растворимости в воде низшими спиртами. Следовательно, учет влияния органических веществ, и прежде всего, растворителей в силу их большего содержания в таких образцах, просто необходим.

Подобно действию кислот, эффект присутствия органической матрицы, может проявляться как в системе ввода пробы, так и непосредственно в плазме [120].

Среди всех известных неспектральных помех влияние органических растворителей на систему ввода образца наиболее сильное. Связано это со значительными изменениями физических свойств растворов, в состав которых они входят. В зависимости от природы и концентрации растворителя в таких системах наблюдается резкое по сравнению с водой уменьшение поверхностного натяжения и существенная модификация вязкости (чаще также ее уменьшение), что приводит, в первом приближении, к формированию более высокодисперсного первичного аэрозоля [153-156]. Со временем распределение капель по размерам в этом аэрозоле может сдвигаться в сторону относительно больших (но все же меньших, чем в случае воды) диаметров за счет практически полного из-за лучшей летучести водно-органических смесей испарения малых капель [157, 158]. Кроме этого, плотность таких растворов обычно снижается, как, например, в случае содержания низших алифатических спиртов или ацетона [120]. Последнее обстоятельство наряду с перечисленными выше фактами способствует более эффективной транспортировке аэрозоля в плазму. Другими словами,

присутствие органических растворителей в анализируемых пробах предполагает увеличение  $S_{\text{tot}}$  и, самое главное,  $W_{\text{tot}}$  [155, 156, 159, 160]. Это, конечно, не может не приводить к увеличению интенсивности сигналов определяемых элементов. Однако повышение скорости транспортировки аэрозоля в то же самое время способствует избыточной загрузке плазмы веществами органической матрицы, что не всегда положительно сказывается на результатах анализа.

На самом деле, чрезмерное поступление органических растворителей может вызвать значительное изменение термических характеристик плазмы, в первую очередь, снижение ее температуры, так как на испарение и диссоциацию этих веществ расходуется дополнительная энергия. В результате этого возможно занижение интенсивности сигналов определяемых элементов, что было неоднократно показано на примерах АЭС-ИСП анализа [120]. В случае же МС-ИСП чаще всего наблюдается завышение сигналов, которое не всегда или не совсем полностью можно соотнести с процессами, протекающими внутри системы ввода. Установлено, что среди механизмов, наиболее адекватно объясняющих этот эффект, можно выделить, во-первых, перенос заряда с иона  $C^+$  [155, 156, 159-164, 166, 168], а во-вторых, пространственный сдвиг зоны плазмы с максимальной плотностью ионов аналита [155, 156, 163-165, 167]. Помимо этого, избыток органической матрицы в растворах также часто является причиной нестабильности работы прибора из-за образования налета в виде неразложившегося органического вещества или сажи на поверхности стенок горелки, инжекторной трубки или конусов [72, 159, 161, 162].

В целом, в зависимости от концентрации органического вещества, потенциала ионизации и атомной массы определяемого элемента, а также операционных настроек масс-спектрометра, неразрывно связанных с этими характеристиками, возможна, как уже было сказано выше, регистрация как занижения, так и завышения (в различной степени) интенсивности сигналов [142, 155, 156, 159-168].

Процентное содержание органической матрицы играет ключевую роль в проявлении данных неспектральных помех [155, 159, 163, 164]. Во многих работах специально подчеркнуто, что увеличение интенсивности наблюдается только при незначительных или средних концентрациях органических веществ. При этом полная зависимость изменения сигналов от массовой доли имеет максимум, а высокие содержания приводят уже не к увеличению, а снижению интенсивности по сравнению с

водными растворами. Связано это должно быть как раз с понижением температуры плазмы за счет значительной ее загрузки неводной матрицей. Борьба с этим эффектом можно, как и в случае рассмотренных выше влияний кислот и сопутствующих элементов, с помощью подбора «устойчивых» параметров работы масс-спектрометра. Действительно, увеличение мощности генератора и уменьшение скорости потока аргона через распылитель должны увеличить температуру плазмы и время нахождения аналита, как и растворителя, в ней, понизив, при этом  $S_{\text{tot}}$  и, к сожалению,  $W_{\text{tot}}$ . Это означает, что величина скорости аргона должна принимать компромиссные значения [120].

Довольно часто встречающееся значительное (в несколько раз) завышение сигналов элементов с относительно высоким ПИ (от 9 до 11 эВ), таких как As, Au, Be, Hg, I, Se, Te, Zn [155, 156, 159-164, 166, 168], может быть объяснено с помощью упомянутого ранее переноса заряда с иона углерода. Дело в том, что образующийся в достаточно большом количестве (примерно 5%) уже при «стандартных» параметрах работы прибора ион  $C^+$  способен участвовать в реакции присоединения электрона другого менее ионизированного атома. Важным критерием протекания этого процесса является меньший, чем у атома углерода (11,26 эВ) ПИ определяемого элемента. При этом наибольший эффект от переноса заряда наблюдается для аналитов, ПИ которых отличается от 11,26 примерно на 1 – 2 эВ (см. представленный выше набор элементов). Влияние настроек масс-спектрометра в этом случае очевидно: уменьшение мощности генератора, так же как и увеличение скорости потока аргона (т.е. уход от «устойчивых» значений операционных параметров) должны способствовать меньшему завышению интенсивности сигналов за счет снижения концентрации  $C^+$  из-за падения температуры плазмы в таких условиях.

Использование другой теории, а именно зонной модели устройства плазмы [169], позволяет трактовать влияние органических растворителей, впрочем, как и любой другой матрицы, на сигналы элементов в зависимости от их атомной массы и настроек прибора. Согласно содержанию этой теории, в центральном канале индуктивно связанной плазмы для каждого элемента существует зона, отвечающая максимальному значению интенсивности сигнала в данной матрице, расположение которой определяется оптимальной скоростью потока аргона. В свою очередь, эта оптимальная скорость зависит от атомной массы аналита: чем «тяжелее» элемент, тем ниже эта скорость. Следовательно, при фиксированных настройках различные элементы (кроме

одного, для которого и была произведена оптимизация) будут находиться в неравных условиях. При переходе к другой (по составу или концентрации) матрице произойдет так называемый пространственный сдвиг зон плазмы с максимальной плотностью ионов определяемых элементов [155, 156, 163-165, 167], то есть изменится их расположение относительно отверстия сэмплера. Это, в свою очередь, приведет либо к занижению, либо завышению (по сравнению с предыдущей матрицей) сигналов аналитов, в том числе и элемента, для которого были подобраны оптимальные условия. При этом его оптимальная скорость также изменится: в большинстве случаев ввод органических растворителей приводит к ее уменьшению.

Помимо рассмотренных выше способов устранения или минимизации различных проявлений влияния органических растворителей за счет правильной настройки работы прибора, существуют и другие сугубо инструментальные методы. Основная их задача – уменьшить загрузку масс-спектрометра этими веществами. Так, для этой цели можно использовать проточно-инжекционный ввод пробы [156, 165], десольватационные системы (самой простой из которых является охлаждаемая распылительная камера) [120] или ввод в аргон дополнительного потока кислорода (до 20%, а лучше стехиометрическое количество для сжигания всего C) [72, 159, 165].

\* \* \*

Таким образом, исходя из представленной информации, можно заключить, что неспектральные матричные помехи довольно сложны по своей природе. Многообразны не только варианты проявления их влияния даже внутри одного вида помех, но и возможные механизмы, объясняющие наблюдаемые закономерности. Ситуация усугубляется и тем, что представленные в литературе данные очень трудно сравнивать между собой, так как рассматриваемые эффекты зависят от конструкции и настроек используемой аппаратуры. Все это приводит к тому, что несмотря на более чем сорокалетнюю историю экспериментально-теоретического изучения проблемы, до сих пор трудно предсказать глубину влияния того или иного компонента матрицы на результаты определения, и что самое главное, полностью устранить это влияние в ходе анализа только лишь инструментальными способами [120]. Последнее обстоятельство заставляет исследователей искать дополнительные пути компенсации данных помех,

самым простым среди которых (при сохранении возможности использования простой градуировки без подбора матрицы) является метод внутреннего стандарта.

В данной работе уже неоднократно подчеркивалось, что критерии выбора внутренних стандартов и условия их применения в клинической практике не всегда ясны и четки, поэтому остановимся на этом вопросе более подробно.

### 1.3. Выбор внутреннего стандарта в МС-ИСП

Метод внутреннего стандарта довольно часто используется в МС-ИСП для учета нестабильности работы прибора, коррекции дрейфа сигнала и устранения неспектральных матричных помех [149]. Среди главных требований, предъявляемых к выступающему в роли ВС элементу, следует отметить [170, 171]:

- его полное отсутствие или незначительное (недетектируемое) содержание в анализируемых образцах;
- отсутствие спектральных наложений, влияющих на сигнал данного изотопа в рассматриваемой матрице;
- отсутствие обусловленных самим внутренним стандартом спектральных помех на анализируемые элементы;
- близость по физическим и химическим характеристикам к определяемым элементам.

Если формулировки трех первых условий устраивают всех исследователей, то споры по поводу оценки близости физических и химических свойств ВС и аналита не разрешены до сих пор.

Действительно, еще в конце 1980-х – начале 1990-х годов сложилось два устойчивых, в чем-то противоречивых, мнения, согласно которым основными критериями выбора внутреннего стандарта могут быть либо близость атомной массы и первого потенциала ионизации [170, 172-175], либо сходство только атомной массы ВС и аналита [176-177, 179]. Ключевая роль последнего критерия в коррекции нестабильности работы прибора объясняется, прежде всего, тем, что при измерении в сканирующем режиме 2 изотопа со сходными массами регистрируются анализатором примерно в одно и то же время, что способствует нивелированию влияния случайных флуктуаций на величины их сигналов. Некоторыми авторами делаются попытки более полноценного изучения данной проблемы с использованием статистического аппарата, а точнее различных хемометрических методов: метода наименьших квадратов [170, 175,

**177, 180]** (англ. partial least squares regression, PLSR, или ordinary least squares regression, OLSR), кластерного анализа [**171**], метода главных компонент (англ. principal component analysis, PCA) [**180**]. Так, в исследовании [**171**] выбор внутреннего стандарта осуществляют исходя из разницы значений не только ПИ, но и кинетической энергии образующихся в плазме ионов, энергии связи атома в оксиде и гидриде, а также электроотрицательности элемента. Еще более широкий круг характеристик изучен в работе [**178**]: помимо атомной массы и первого потенциала ионизации, внимание в ней уделяется и второму потенциалу ионизации, подвижности ионов, термодинамическим свойствам анализируемого раствора, существующему в нем общему заряду.

Безусловно, отпечаток на выбор ВС должна откладывать не только природа аналитов, но и применяемые операционные настройки масс-спектрометра. Известно, что при работе с АЭС-ИСП в режиме «устойчивых» параметров, по крайней мере, в том случае, когда инструментальным способом удастся устранить влияние матрицы (причем какой-то конкретной, а не смешанной) на процессы в плазме, возможно применение одного любого внутреннего стандарта [**120**]. Связано это с тем, что эффекты, порождаемые внутри системы ввода пробы в ходе образования и транспортировки аэрозоля, должны одинаково действовать на все аналиты вне зависимости от их физических и химических свойств. Хотя последнее утверждение не совсем правильно, если принимать во внимание упомянутую ранее теорию AIR, которая предполагает дифференциацию элементов в ходе процесса формирования третичного аэрозоля. Однако в силу того, что в МС-ИСП неспектральные матричные помехи обычно более глубоки и сложны, в силу, прежде всего, дополнительного узла экстракции и фокусировки ионов и зависимости механизмов от конструкции и конфигурации прибора, случаи применения одного внутреннего стандарта в многоэлементном анализе сложных по составу матриц редки. Положение усугубляется еще и тем, что в отличие от АЭС-ИСП в данном методе отсутствует четкое определение «устойчивых» значений операционных параметров. При этом в литературе есть примеры, когда с помощью настройки масс-спектрометра удастся упростить проявление матричных помех до какого-то одного конкретного механизма, и, тем самым, выделить также одну единственную характеристику, ответственную за выбора ВС [**149**].

В целом, при многоэлементном анализе наиболее распространено применение сразу нескольких ВС, подобранных по тому или иному критерию. Из рассмотренных

ранее примеров МС-ИСП определения элементов в биологических жидкостях один внутренний стандарт используют в случаях подбора матрицы градуировочных растворов или градуировки методом добавок [8, 11, 13, 19, 20, 26, 27, 31, 46, 47, 50, 54, 57, 61, 64-66] (скорее всего для корректировки инструментального дрейфа и нестабильности работы прибора) и/или, что очевидно, при определении 1 – 2 элементов [4, 9, 16, 34, 35, 86-89, 92, 94, 95, 97-106, 108, 109]. Если приготовление градуировочных растворов проводят без подбора матрицы, аналогичная ситуация возможна только при значительном (около 50 раз) разбавлении проб [9, 21, 56] или их подаче в масс-спектрометр с помощью проточно-инжекционной системы [10], что существенно ослабляет проявление неспектральных матричных помех. В противном случае получают заниженные результаты по некоторым определяемым элементам [55].

В тех ситуациях, когда вводимый в пробу раствор внутреннего стандарта может быть источником спектральных интерференций для изотопов-аналитов или просто вызывать загрязнение образца, в качестве ВС иногда рекомендуют использовать многоатомные ионы, формируемые из плазмообразующего газа или матрицы анализируемого раствора, такие как  $Ar_2^+$ ,  $ArO^+$ ,  $N_2^+$ ,  $ClO^+$ ,  $SO^+$ ,  $MO^+$ , где М – это атом анализируемого элемента [173, 181]. Но и в этих исследованиях, применение такого одного внутреннего стандарта ограничено критерием близости атомных масс определяемых элементов. К тому же, препятствовать использованию данного подхода может и различие в механизмах образования и распределения подобных ионов в плазме в сравнении с ионами аналитов [151].

Один внутренний стандарт может быть использован и при дополнительной математической коррекции получаемых в ходе измерений сигналов в рамках так называемого метода внутреннего стандарта, общего для всех аналитов (англ. common analyte internal standardization, CAIS) [182, 183]. Действительно, CAIS позволяет применять в качестве ВС любой элемент вне зависимости от его химических или физических характеристик, причем как для учета инструментального дрейфа масс-спектрометра, так и устранения неспектральных матричных помех. При этом, следует отметить, что для нивелирования одновременно двух эффектов требуется все-таки как минимум два ВС, отличающихся друг от друга по атомной массе и ПИ. Основу метода составляет предварительное нахождение математической линейной функции, связывающей между собой коэффициент коррекции интенсивности сигнала аналита и



относительное изменение интенсивности сигнала ВС в какой-либо матрице по отношению к воде. Для этого проводят измерения в нескольких (3 – 4) предварительно приготовленных контрольных растворах с различным содержанием исследуемых сопутствующих компонентов, но одинаковыми концентрациями определяемых элементов и внутреннего стандарта. Затем на базе полученных результатов строят зависимость между описанными выше параметрами с целью нахождения углового коэффициента ( $k$ ). В конце концов, измеряют раствор с неизвестным содержанием матрицы, и, зная, относительное изменение сигнала внутреннего стандарта в нем, а также величину  $k$ , находят коэффициент коррекции сигнала аналита для данного раствора. Исправленную интенсивность сигнала определяемого элемента получают путем умножения коэффициента коррекции на измеренную в этом растворе интенсивность сигнала аналита. Хотя авторы данного подхода и утверждают, что вся процедура не требует значительного времени и особых математических знаний, использование метода CAIS до сих пор не распространено на более сложные (чем речные или подземные воды) матрицы. Переход к таким системам, наверняка, потребует существенного увеличения количества контрольных растворов и усложнения вида применяемых математических функций [149].

#### 1.4. Выводы к Главе 1

Как следует из представленного материала, на сегодняшний день масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой занимает лидирующие позиции в сфере элементного анализа биологических жидкостей и разработки лекарственных препаратов.

Среди способов борьбы с одним из самых главных недостатков этого метода – неспектральными матричными помехами, в клинической практике обычно преобладают различные виды градуировки: градуировка с подбором матрицы, метод добавок и обычно используемый в паре с первыми двумя метод внутреннего стандарта. Применение указанных подходов, безусловно, сопряжено с дополнительными трудностями по сравнению с более простым способом – построением градуировочного графика в 1 об.%  $\text{HNO}_3$ . Так, градуировка с подбором матрицы требует предварительной оценки состава анализируемого раствора, что ограничивает рамки универсальности ее использования. Существенные временные затраты, а также избыточный расход анализируемого образца являются ахиллесовой пятой метода добавок. Необходимость

выбора подходящих элементов на роль ВС. при неясности четких критериев этого выбора осложняет применение метода внутреннего стандарта. При этом очень мало внимания уделяется (если уделяется вообще) инструментальным возможностям устранения или минимизации влияния матричных компонентов, которые бы существенно упростили анализ за счет перехода к простой (без подбора матрицы) градуировке.

Обзор литературы, касающийся этой проблематики, позволяет утверждать, что неспектральные матричные помехи довольно сложны по своей природе. Это связано не только с многообразием вариантов их проявления и многочисленностью возможных механизмов действия, но и с их зависимостью от конструкции и настроек используемой аппаратуры. Все перечисленное приводит к тому, что предсказать степень влияния того или иного компонента матрицы на результаты определения, и, самое главное, полностью устранить это влияние в ходе анализа только лишь инструментальными настройками невозможно. Всегда дополнительно необходимо использовать еще какой-либо другой подход. При сохранении возможности использования градуировки без подбора матрицы, самым очевидным таким подходом остается уже ранее упомянутый метод внутреннего стандарта. Однако, согласно результатам описанных выше исследований, критерии выбора ВС, также как и мнения о возможности применения одного единственного элемента для этой роли без дополнительного использования математического аппарата также очень противоречивы.

Иными словами на момент начала работы над диссертацией в литературе не было разработано общей методологии получения правильных результатов определения элементов при анализе сложных биологических образцов. Практически все авторы цитируемых работ отмечали значительные вариации в методиках определения как разных элементов, так и при использовании разных приборов. Все это дает основание для разработки максимально простой процедуры массовых анализов биологических проб различного состава.

## Глава 2. Реагенты, материалы, оборудование, методики эксперимента

### 2.1. Газы, реактивы, растворы и материалы

В работе применяли следующие газы, реактивы и растворы:

- аргон высокой чистоты (Логика, Россия);
- газовую смесь 20% кислорода в аргоне (ПГС-Сервис, Россия);
- концентрированные азотную (65%, «for analysis», Merck, Германия) и хлорную (70%, Suprapur, Merck, Германия) кислоты, пероксид водорода (30%, «Suprapur», Merck, Германия) для окислительной минерализации биологических образцов и специализированного лечебного питания и ультразвуковой экстракции элементов;
- гидроксид тетраметиламмония, ТМАОН (25%, «ос.ч», Sigma-Aldrich, США), для растворения образцов волос;
- Тритон X-100 («SigmaUltra», Sigma-Aldrich, США), 1-бутанол («LiChrosolv», Merck, Германия), ЭДТА («for analysis», Merck, Германия) и раствор аммиака (>25%, «for analysis», Sigma-Aldrich, США) для приготовления разбавителей цельной крови и специализированного лечебного питания;
- растворы Na, K, Mg, Ca, Ba, Mo, P и S, приготовленные из одноэлементных стандартных растворов 1000 мг/л (High-Purity Standards, США), а также растворы глюкозы («ос.ч», Sigma-Aldrich, США), азотной, плавиковой и соляной кислот («for analysis», Merck, Германия), моделирующие содержание C, N, F и Cl в биологических жидкостях, для изучения спектральных матричных помех;
- раствор Рингера (Эском, Россия), а также NaCl, KCl,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  (все «ос.ч», Sigma-Aldrich, США) для моделирования солевого состава цельной крови и мочи, соответственно, и приготовления физиологического буферного раствора (ФБР) с pH ~7,40;
- глицин и карбамид/мочевину (все «ос.ч», Sigma-Aldrich, США) для моделирования углеродного состава цельной крови и мочи, соответственно;
- молибдат аммония и аскорбиновую кислоту (все х.ч., Реахим, Россия) в качестве реагентов для фотометрической реакции;
- концентрированную соляную кислоту (30%, «Suprapur», Merck, Германия) для разбавления растворов платиносодержащих металлолекарств и выпаривания

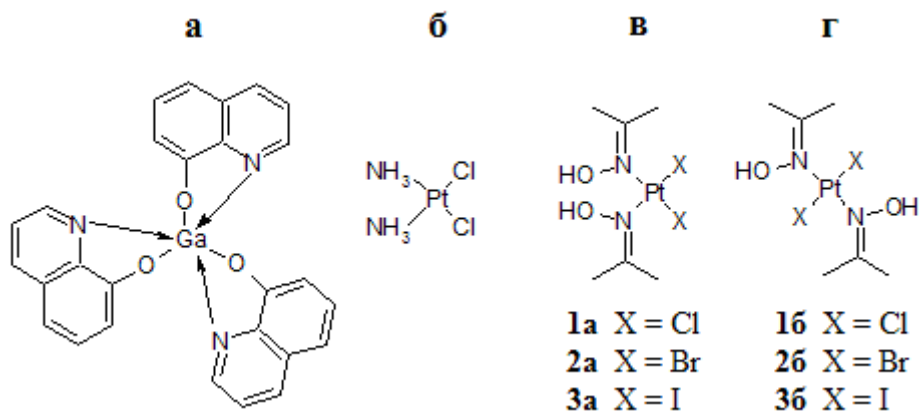
минерализованных образцов биологических жидкостей для спектрофотометрического определения фосфора;

- 1-октанол ( $\geq 99\%$ , «Chromasolv for HPLC», Sigma-Aldrich, США) в качестве органической фазы для определения коэффициентов распределения платиносодержащих препаратов;
- «технический» этиловый спирт для разбавления органической (октанольной) фазы при определении коэффициентов распределения;
- лиофилизированные человеческие сывороточные альбумин и трансферрин (холо- и апо-формы), а также сыворотку крови человека «Sera human S2257» (все Sigma-Aldrich, США) для изучения связывания белков с координационными соединениями Ga и Pt;
- стандартный раствор 10 мкг/л Li, Co, Y, Ce и Tl в 2 масс.% азотной кислоте (Agilent Technologies, Germany) для автоматической настройки параметров работы масс-спектрометра Agilent 7500с;
- стандартный P/A раствор 20 мг/л Zn, Be, Cd и As, 10 мг/л Ni, Pb и Mg, 5 мг/л Tl, Na, Al, U, Cu, Th, Ba, Co, Sr, V, Cr, Mn, Li, Sc, In, Lu и Bi, 2,5 мг/л of Y и Yb в 2-2,5 масс.% азотной кислоте для «сшивания» двух режимов детектирования – импульсного и аналогового;
- многоэлементные стандартные растворы ICP-MS-68A двух типов A и C 10 мг/л (High-Purity Standards, США) и одноэлементные стандартные 1000 мг/л P и Ga растворы (Sigma-Aldrich, США) для приготовления градуировочных растворов;
- одноэлементный стандартный раствор 1000 мг/л Rh (High-Purity Standards, США) для приготовления раствора внутреннего стандарта;
- получаемую на установке Millipore Simplicity (Millipore, Франция) деионированную воду (18,2 М $\Omega$ /см) для приготовления всех растворов.

В качестве исследуемых объектов и материалов в работе использовали:

- пробы цельной крови, сыворотки крови и мочи практически здоровых добровольцев и пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма (СВР), предоставленные Отделением реанимации и интенсивной терапии государственного бюджетного лечебно-профилактического учреждения «Городская клиническая больница № 4» Департамента здравоохранения города Москвы;
- стандартные образцы сравнения цельной крови «Seronom Trace Elements Whole

- Blood» (Level 2, Seronorm, Норвегия), PT-WB1 (Jožef Stefan Institute, Словения) и IAEA-A-13 (AQCS, Австрия);
- стандартные образцы сравнения мочи «Seronorm Trace Elements Urine» (Level 2, Seronorm, 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);
  - 8-гидроксихинолинат галлия(III) (**рис. 1**) (Faustus Translational Drug Development AG, Австрия);
  - цисплатин (Sigma-Aldrich, США), а также синтезированные в Институте неорганической химии Венского университета (Австрия) координационные соединения (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропаноноксисимы-кN)платины(II) (**рис. 1**)



**Рис. 1.** Структурные формулы исследуемых препаратов:

**а** - 8-гидроксихинолинат галлия(III), **б** – цисплатин,  
**в, г** – (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропаноноксисимы-кN)платины(II)

## 2.2. Вспомогательное оборудование и средства измерения

В качестве расходных материалов в работе использовали центрифужные концентраторы Centriplus YM-30 с порогом отсечения 30 кДа (Millipore Corporation, США), фильтрующие насадки на шприц ProFill 17 мм с диаметром пор 0,45 мкм (Аквилон, Россия), одноразовые наконечники объемом до 300, 1000 и 5000 мкл (SSI, США), полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 15 и 50 мл (Greiner Bio-

One GmbH, Германия), стеклянные пробирки объемом 5 и 15 мл и стеклянные мерные колбы объемом 25 и 50 мл (ГОСТ 25336-82).

Отбор жидкостей производили при помощи механических дозаторов с диапазонами рабочего объема 10 – 100 мкл (Ленпипет, Россия), 100 – 1000 мкл и 1 – 5 мл (LabMate, Польша) и пределом допустимой погрешности не более  $\pm 2,5\%$ .

Для определения массы использовали весы Sartorius 1702MP8 (Германия) с точностью взвешивания  $\pm 0,1$  мг.

Высушивание образцов проводили в сушильном шкафу SNOL 58/350 (ПО Компонент, Россия).

Выдерживание растворов при постоянной температуре осуществляли в термостате UTU/77 (Норьзонт, Польша).

Для отделения белковой фракции и осаждения не растворившихся в разбавителях органических частиц применяли центрифугу-миксер CM-70M12 (Elmi Ltd., Латвия) и настольную центрифугу EBA 20 (Hettich, Германия).

Октанольно-водные эмульсии встряхивали с помощью перемешивающего устройства ПЭ-6500 (Экрос, Россия).

Для интенсификации кислотной минерализации образцов использовали микроволновую систему Ethos Microwave Labstation (Milestone, Италия). Ультразвуковую (УЗ) экстракцию и растворение металлолекарств осуществляли с помощью УЗ ванны Sonorex RK 100H (Bandelin, Германия). Для выпаривания растворов применяли электрическую плитку ПЭМ (Евролаб, Россия).

МС-ИСП измерения проводили на квадрупольном масс-спектрометре 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  $2^{\circ}\text{C}$ ), платиновыми саплером и скиммером. Для управления прибором и обработки результатов применяли программное обеспечение ICP-MS ChemStation (версия G1834B). Природу фонового сигнала галлия исследовали на масс-спектрометре высокого разрешения Element 2 (Thermo Scientific, США). Операционные характеристики обоих приборов представлены в **табл. 6**.

Таблица 6. Значения операционных параметров работы масс-спектрометров

Параметры	Настройки		
	Agilent 7500с		Element 2
	непрерывный ввод	нестационарные сигналы	
<b>Плазма</b> мощность генератора скорость потока плазмообразующего газа	переменная: 950 – 1550 Вт 15 л/мин		1150 Вт 16 л/мин
<b>Масс-спектрометр</b> разрешение вакуум без плазмы вакуум с плазмой	0,7 масс $4,0 \cdot 10^{-5}$ торр $4,0 \cdot 10^{-4}$ торр		10500/11500 $7,0 \cdot 10^{-8}$ торр $1,5 \cdot 10^{-7}$ торр
<b>Подача пробы</b> скорость потока вспомогательного газа скорость потока аргона через распылитель скорость подачи образца в распылитель	1,10 л/мин переменная: 0,80 – 1,40 л/мин 0,10 оборот/с		1,00 л/мин 1,00 л/мин 4 оборот/мин
<b>Измерение</b> глубина отбора пробы потенциал на линзе-экстракторе время измерения на точке число повторений общее время одного измерения	переменная: 4 – 20 мм переменный: 1 – 9 В 100 мс 3 50с		10 мс 40 90 с
<b>Изотопы определяемых элементов</b>	$^{31}\text{P}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{65}\text{Cu}$ , $^{66}\text{Zn}$ , $^{68}\text{Zn}$ , $^{69}\text{Ga}$ , $^{71}\text{Ga}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{77}\text{Se}$ , $^{82}\text{Se}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{112}\text{Cd}$ , $^{114}\text{Cd}$ , $^{194}\text{Pt}$ , $^{195}\text{Pt}$ , $^{196}\text{Pt}$ , $^{206}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$	$^{194}\text{Pt}$ , $^{195}\text{Pt}$ , $^{196}\text{Pt}$	$^{69}\text{Ga}$ , $^{71}\text{Ga}$
	внутренние стандарты: $^9\text{Be}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{103}\text{Rh}$ , $^{209}\text{Bi}$		

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.%  $\text{HNO}_3$ .

Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических жидкостях проводили на приборе Hitachi U-2900 (Hitachi HighTechnologies, Япония) с дейтериевой и вольфрамовой лампами, спектральным диапазоном 190 – 1100 нм и разрешением 1,5 нм. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения UV Solutions (версия 2.2).

## **2.3. Методики исследования**

### **2.3.1. Хранение и подготовка проб исследуемых образцов**

Пробы цельной крови, поставляемые в одноразовых вакуумных пробирках Vacuette (с Li-гепарином), сыворотки крови в вакутейнерах той же фирмы с активатором свертывания и гелем, а также мочи, собранные в пробирки Greiner Bio-One, хранили в морозильной камере при температуре  $-18^\circ\text{C}$  без добавления каких-либо консервантов не более недели. Перед пробоподготовкой их размораживали в течение нескольких часов до комнатной температуры и тщательно перемешивали для полной гомогенизации состава. Все образцы сравнения биологических образцов, координационные соединения Ga и Pt, а также лечебное питание хранили в холодильной камере при температуре  $+4^\circ\text{C}$ .

Для перевода в жидкое состояние «восстанавливаемых» образцов сравнения биологических жидкостей («Seronorm Trace Elements Whole Blood», «Seronorm Trace Elements Urine» и «Urine Control lyophilized for Trace Elements»), а также сыворотки крови человека («Sera human S2257») во флакон из солнцезащитного стекла, содержащий спрессованную таблетку лиофилизированного образца, добавляли необходимый объем деионированной воды. Получаемую смесь периодически перемешивали вращающимися движениями без встряхивания в течение 30 минут до полного растворения. Приготовленные таким образом образцы использовали в тот же день. Образец сравнения цельной крови IAEA-A-13 перед пробоподготовкой высушивали в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре  $105^\circ\text{C}$ .



### 2.3.2. Приготовление растворов ВС и градуировочных растворов

Раствор внутреннего стандарта с концентрацией, равной 5000 мкг/л, готовили путем разбавления с помощью 1 об.%  $\text{HNO}_3$  соответствующего одноэлементного стандартного раствора 1000 мг/л Rh. Во всех исследуемых пробах концентрацию ВС, равную 25 мкг/л, создавали путем добавления необходимого объема приготовленного раствора.

Для определения фосфора использовали градуировочные растворы с концентрациями 10, 30 и 50 мг/л, приготовленные из одноэлементного стандартного раствора 1000 мг/л Р в 1 об.%  $\text{HNO}_3$ . Градуировочные растворы с концентрациями Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd и Pb, равными 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкг/л готовили также в 1 об.%  $\text{HNO}_3$  из многоэлементного стандартного раствора ICP-MS-68A-A 10 мг/л. Следует отметить, что для каждого из определяемых в биологических объектах элементов градуировку проводили в диапазоне содержаний, приведенных на сайте Независимой лаборатории ИНВИТРО (табл. 1 п. 1.1. Главы 1), с учетом конечного разбавления в процессе пробоподготовки. При исследовании свойств координационных соединений металлов применяли градуировочные растворы с концентрациями 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 мкг/л (для Ga и Pt), а также 200 и 400 мкг/л (только для Pt), приготовленные из одноэлементного стандартного раствора 1000 мг/л Ga и многоэлементного раствора ICP-MS-68A-C 10 мг/л в 1 об.%  $\text{HNO}_3$ .

### 2.3.3. Методики пробоподготовки исследуемых образцов

#### 2.3.3.1. Разбавление биологических жидкостей

При простом разбавлении жидких реальных образцов или «восстановленного» стандартного образца цельной крови или сыворотки крови к 0,5 мл пробы добавляли 4,5 мл разбавителя А-3 (составы исследуемых в работе разбавителей указаны в табл. 7) и 25 мкл раствора внутреннего стандарта.

Для разбавления реальных образцов или «восстановленных» стандартных образцов мочи к 1,0 мл пробы добавляли 4,0 мл разбавителя А-3 или 1 об.%  $\text{HNO}_3$  и 25 мкл раствора внутреннего стандарта. В связи с тем, что концентрация фосфора в моче относительно велика, для его определения пробы подвергали дополнительному разбавлению еще в 10 раз.

**Таблица 7.** Составы разбавителей биологических жидкостей и лечебного питания

<b>Разбавитель</b>	<b>Состав разбавителя</b>
<b>А</b>	0,1 об.% Тритон – 1 об.% HNO <sub>3</sub>
<b>Б</b>	0,1 об.% Тритон – 0,1 г/л ЭДТА – 1 об.% HNO <sub>3</sub>
<b>В</b>	0,1 об.% Тритон – 0,5 об.% 1-бутанол – 1 об.% HNO <sub>3</sub>
<b>Г</b>	0,1 об.% Тритон – 0,1 г/л ЭДТА – 0,5 об.% 1-бутанол – 1 об.% HNO <sub>3</sub>
<b>Д</b>	0,1 об.% Тритон – 1 г/л NH <sub>3</sub>
<b>Е</b>	0,1 об.% Тритон – 0,1 г/л ЭДТА – 1 г/л NH <sub>3</sub>
<b>Ж</b>	0,1 об.% Тритон – 0,5 об.% 1-бутанол – 1 г/л NH <sub>3</sub>
<b>З</b>	0,1 об.% Тритон – 0,1 г/л ЭДТА – 0,5 об.% 1-бутанол – 1 г/л NH <sub>3</sub>

Перед анализом получаемые смеси тщательно перемешивали, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин до полного осаждения органических частиц, если таковые присутствовали в растворе.

### **2.3.3.2. Перевод в раствор порошков лечебного питания и волос**

Для растворения специализированного лечебного питания, не переводимого полностью в жидкое состояние, к 100 мг порошка добавляли 15 мл разбавителя **А-З** и 75 мкл раствора внутреннего стандарта, соответственно. Получаемую смесь тщательно перемешивали и подвергали УЗ обработке в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин до полного осаждения органических частиц, если таковые присутствовали в растворе.

Образец сравнения волос, массой 100 мг, переводили в раствор с помощью 25% водного раствора ТМАОН согласно методике, представленной в работе [184]. УЗ экстракцию элементов проводили по методике [185] с той лишь разницей, что выдерживание в ультразвуковой ванне осуществляли в течение 30, а не 2 мин ввиду меньшей мощности оборудования, имеющегося в распоряжении.

### 2.3.3.3. Окислительная МВ минерализация исследуемых объектов

Для минерализации исследуемых объектов использовали специальные микровставки для стандартных автоклавов МВ системы Ethos.

Образцы цельной крови или сыворотки крови и специализированного лечебного питания (проба 0,5 мл для жидких образцов или 100 мг для порошков) подвергали МВ обработке после добавления 1,5 (или 3,0) мл концентрированной азотной кислоты и 0,75 (или 1,5) мл перекиси водорода согласно температурной программе, представленной в **табл. 8**. Получаемые растворы разбавляли деионированной водой до объема 15 мл и добавляли 75 мкл раствора внутреннего стандарта.

При минерализации образцов мочи и волос в микровставки помещали 1,0 мл жидкой пробы или 100 мг порошка, 1,5 (или 3,0) мл концентрированной азотной кислоты и 0,75 (или 1,5) мл перекиси водорода. В **табл. 8** также представлены режимы работы МВ печи, используемые в этих случаях. Минерализованные образцы разбавляли деионированной водой до объема 10 мл в случае проб мочи и 25 мл в случае проб волос и добавляли 50 и 125 мкл раствора ВС, соответственно. В случае определения фосфора в моче пробы дополнительно разбавляли еще в 5 раз.

**Таблица 8.** Условия микроволновой минерализации исследуемых образцов

Стадия	Температура, °С	Время, мин
<b>Кровь, сыворотка крови, лечебное питание</b>		
<b>1</b>	20 – 50	3
<b>2</b>	50	3
<b>3</b>	50 – 150	6
<b>4</b>	150	3
<b>5</b>	150 – 180	3
<b>6</b>	180	3
<b>7</b>	180 – 210	3
<b>8</b>	210	6 (12 или 18)
<b>Моча, волосы</b>		
<b>1</b>	20 – 90	5
<b>2</b>	90 – 180	5
<b>3</b>	180	10 (15 или 20)

Дополнительно, с целью проверки полноты разложения органической матрицы, после МВ минерализации цельной крови и мочи получаемые растворы подвергали обработке минимальным (1 мл) количеством хлорной кислоты при нагревании в тефлоновых чашках на плитке. Избыток  $\text{HClO}_4$  удаляли посредством трехкратного выпаривания смеси при добавлении 1,5 мл концентрированной  $\text{HNO}_3$ .

#### **2.3.4. Спектрофотометрическое определение фосфора в биологических жидкостях**

Для проверки правильности МС-ИСП анализа фосфора и подтверждения его содержания в стандартных образцах биологических жидкостей определение этого элемента осуществляли независимым методом – методом спектрофотометрии.

При этом после МВ минерализации и до разбавления все пробы биологических жидкостей дополнительно, с целью удаления остатков кислоты и перекиси, выпаривали несколько раз досуха с добавлением 1,0 мл концентрированной  $\text{HNO}_3$  и 1,0 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и два раза по 1,0 мл концентрированной  $\text{HCl}$ . Далее содержимое чашек для упаривания растворяли в 1,75 (в случае цельной крови) или 3,5 мл (в случае мочи) концентрированной  $\text{HCl}$  при нагревании, переносили в мерные колбы на 25 или 50 мл, соответственно, и доводили до метки деионированной водой (конечное разбавление крови и мочи 1:50).

В качестве фотометрического агента использовали смесь молибдата аммония и аскорбиновой кислоты в  $\text{HCl}$ . Для приготовления 100 мл этого агента смешивали 20 мл 50 г/л водного раствора аскорбиновой кислоты, 40 мл 12 г/л водного раствора молибдата аммония, 6,7 мл концентрированной  $\text{HCl}$  и добавляли деионированную воду до требуемого объема. Для проведения фотометрической реакции к 25 мл раствора образца добавляли 25 мл полученного агента и оставляли смесь на ночь. Градуировочные растворы с концентрациями фосфора 2, 5, 10 и 15 мг/л готовили аналогичным образом.

Оптическую плотность измеряли при длине волны 820 нм относительно контрольного опыта.

#### **2.3.5. Исследование связывания 8-гидроксихинолината галлия(III) с альбумином, трансферрином и сывороткой крови человека**

В связи с тем, что 8-гидроксихинолинат галлия(III) ограниченно растворим в воде, в работе использовали его насыщенный раствор в ФБР, содержащем 10 мМ

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , а также 100 мМ  $\text{NaCl}$  (рН ~ 7,40). Для приготовления такого раствора смесь 5 мг комплекса и 5 мл ФБР подвергали УЗ обработке при 37°C в течение 1 ч. Затем получаемую взвесь фильтровали через мембранный фильтр. При этом концентрация 8-гидроксихинолината галлия(III) в таком растворе составляет  $1 \cdot 10^{-5}$  М.

Для изучения кинетики связывания действующего вещества тестируемого лекарственного средства смесь координационного соединения Ga с альбумином (при соотношении 1:10) или сывороткой крови инкубировали в ФБР при температуре 37°C в течение нескольких суток. Для определения концентрации несвязанного с белком 8-гидроксихинолината галлия(III) через определенные промежутки времени из инкубируемого раствора отбирали одинаковые аликвоты смеси (по 0,4 мл). Их центрифугировали 15 – 20 мин в концентраторах с порогом отсечения 30 кДа при 3000 и 5000 оборот/мин (что соответствует 590 и 1630g) в случае индивидуальных белков и сыворотки крови, соответственно. Кратность разбавления фильтратов и концентратов 1 об.%  $\text{HNO}_3$  подбирали после предварительного анализа разбавленных в 50 раз проб. Концентрацию внутреннего стандарта, равную 25 мкг/л, как и в случае градуировочных растворов создавали путем добавления необходимого объема головного раствора ВС.

Степень связывания **В** рассчитывали по формуле:

$$B = (C_0 - C_{\text{несвяз.}}(t)) / C_0 \cdot 100\% \text{ или } C_{\text{связ.}}(t) / C_0 \cdot 100\% \quad (1),$$

где  $C_0$  и  $C_{\text{несвяз.}}(t)$ ,  $C_{\text{связ.}}(t)$  – концентрации Ga в исходном инкубируемом растворе, фильтрате или не прошедшем через фильтр концентрате по истечении времени  $t$ , соответственно.

Константы связывания **К** рассчитывали при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10 через 64 ч инкубирования по формуле:

$$K = (C_0 - C_{\text{несвяз.}}) / (C_{\text{несвяз.}} \cdot [P_{\text{несвяз.}}]) \text{ или } C_{\text{связ.}} / (C_{\text{несвяз.}} \cdot [P_{\text{несвяз.}}]) \quad (2),$$

где  $C_{\text{связ.}}$  – концентрация связанного с белком препарата и  $[P_{\text{несвяз.}}]$  – концентрация несвязанного белка. При этом вместо  $[P_{\text{несвяз.}}]$  использовали исходную концентрацию белка, так как при рассматриваемом соотношении  $[P_{\text{связ.}}] \ll [P_{\text{несвяз.}}]$ .

### 2.3.6. Определение коэффициентов распределения (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагено-бис(2-пропаноноксимов-кN)платины(II)

С целью определения коэффициентов распределения готовили 300 мкМ раствор цисплатина (в качестве вещества сравнения) и ~70 мкМ растворы тестируемых

координационных соединений Pt в деионированной воде. Ввиду относительно низкой растворимости (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагено-бис(2-пропаноноксимов-κN)-платины(II) их исходные растворы получали после УЗ обработки смеси около 1 мг препарата и необходимого количества деионированной воды при 20°C в течение 1 ч и последующей фильтрации взвеси через мембранный фильтр.

Затем к 2 мл такого раствора добавляли равный объем 1-октанола. Получаемые эмульсии встряхивали с помощью перемешивающего устройства в течение 24 часов при комнатной температуре. После установления равновесия и полного расслоения фаз водную фракцию отбирали сверху дозатором и разбавляли в 200 (в случае цисплатина), в 100 (в случае **1a**, **1b** и **2a**) и в 10 раз (в случае **2b**, **3a** и **3b**) 2,5 об.% HCl. Органическую фазу отбирали с помощью шприца и разбавляли в 10 (в случае цисплатина) и в 100 раз (в случае всех остальных координационных соединений Pt) 2,5 об.% HCl в этиловом спирте. Содержание платины в исходных растворах определяли после разбавления в 200 (в случае цисплатина) и в 100 раз (в случае всех остальных веществ) 2,5 об.% HCl. Концентрацию внутреннего стандарта, равную 25 мкг/л, как и в случае градуировочных растворов создавали путем добавления необходимого объема головного раствора ВС.

Логарифмы коэффициентов распределения исследуемых соединений рассчитывали по формуле:

$$\log P = \log ((C_0 - C_{\text{водн.}}) / C_{\text{водн.}}) \text{ или } \log (C_{\text{орг.}} / C_{\text{водн.}}) \quad (3),$$

где  $C_{\text{орг.}}$  и  $C_{\text{водн.}}$  – концентрации Pt в органической и водной фазах, соответственно.

### 2.3.7. Исследование связывания (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалагенобис(2-пропанон-оксимов-κN)платины(II) с альбумином и сывороткой крови человека

Ввиду малого количества имеющегося в распоряжении материала, исследование кинетики связывания тестируемых координационных соединений Pt с альбумином осуществляли на примере 3 препаратов – цисплатина (в качестве вещества сравнения), комплексов **2b** и **3a**. Именно эти комплексы являются наиболее и наименее реакционноспособными, соответственно, среди всех изучаемых веществ.

Инкубирование с альбумином проводили при фиксированной концентрации белка ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), но разном содержании исследуемых соединений (при соотношениях «действующее вещество:белок», равных 1:10, 1:1 и 5:1) в ФБР при температуре 37°C в течение нескольких суток. Степени связывания **B** рассчитывали по формуле **1**,

представленной выше. Центрифугирование проводили в тех же условиях, что и в случае галлиевого препарата (15 – 20 мин в концентраторах с порогом отсечения 30 кДа при 3000 или 5000 оборот/мин). Константы связывания **K** комплексов с альбумином и степени связывания с сывороткой крови определяли при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10, через 72 ч инкубирования.

Кратность разбавления фильтратов и концентратов 2,5 об.% HCl подбирали после предварительного анализа разбавленных в 50 (для соотношения 1:10) или 500 раз (для соотношений 1:1 и 5:1) проб. Исходные растворы подвергали 500-кратному разбавлению. Концентрацию внутреннего стандарта, равную 25 мкг/л, создавали путем добавления необходимого объема головного раствора ВС.

### **2.3.8. Приготовление модельных растворов для изучения неспектральных помех**

Для исследования неспектральных матричных помех, возникающих при МС-ИСП определении элементов в биологических жидкостях, использовали модельные растворы 25 мг/л Р и 100 мкг/л Mn, Co, Cu, Zn, Ga, As, Se, Cd, Pt и Pb без добавления и с добавлением ВС в матрицах, имитирующих солевой, органический и кислотный составы цельной крови и мочи после различной пробоподготовки (табл. 9).

Дополнительно, для более детального исследования рассматриваемых влияний, проводили сравнение величин сигналов элементов, измеренных:

- а) в 1, 5, 10 и 15 об.% HNO<sub>3</sub>;
- б) в 0,1, 0,2 и 0,4 % растворе NaCl в 1 об.% HNO<sub>3</sub>;
- в) в 2, 4, 8 г/л растворе глицина в 1 об.% HNO<sub>3</sub>;
- г) в 3, 6, 9 г/л растворе карбамида в 1 об.% HNO<sub>3</sub>.

В связи с тем, что при определении Pt для подавления гидролиза ее координационных соединений в качестве разбавителей предполагалось использовать растворы 2,5 об.% HCl в воде и этиловом спирте (для разбавления водной и октанольной фаз, соответственно – п. 2.3.6. и 2.3.7. Главы 2), дополнительно изучали влияние и этих матриц на результаты анализа. Для этого готовили модельные растворы 100 мкг/л Pt без добавления и с добавлением ВС в водном растворе 2,5 об.% HCl и в 2,5 об.% HCl в этиловом спирте, содержащем 10 об.% 1-октанола. При этом влияние соляной кислоты исследовали более подробно, фиксируя изменения сигналов элемента в 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5, 10 и 20 об.% HCl.

**Таблица 9.** Составы растворов, имитирующих солевую, органическую и кислотную матрицы цельной крови и мочи, а также их смеси после различной пробоподготовки

Раствор	Состав раствора
1	раствор Рингера [186], разбавленный 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 10 раз
1'	раствор Рингера, разбавленный 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 30 раз
2	искусственная по солевому составу [187] моча, разбавленная 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 5 раз
2'	искусственная по солевому составу моча, разбавленная 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 10 раз
3	8 г/л раствор глицина в 1 об.% HNO <sub>3</sub>
4	9 г/л раствор карбамида в 1 об.% HNO <sub>3</sub>
5	15 об.% HNO <sub>3</sub>
1+3	раствор Рингера, разбавленный 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 10 раз и содержащий 8 г/л глицина
2+4	искусственная по солевому составу моча, разбавленная 1 об.% HNO <sub>3</sub> в 5 раз и содержащая 9 г/л карбамида
1'+5	раствор Рингера, разбавленный 15 об.% HNO <sub>3</sub> в 30 раз
2'+5	искусственная по солевому составу моча, разбавленная 15 об.% HNO <sub>3</sub> в 10 раз

Количественно влияние компонентов матрицы анализируемых растворов на величины интенсивностей сигналов исследуемых элементов оценивали при помощи трех величин:

а) **R** – относительного изменения интенсивности абсолютного сигнала аналита в исследуемой матрице по сравнению с матрицей сравнения, рассчитываемого по формуле:

$$R = I(M)_x / I(M)_{cp} \cdot 100\% \quad (4),$$

б) **R\*** – относительного изменения отношения интенсивности сигнала аналита к интенсивности сигнала ВС в исследуемой матрице по сравнению с матрицей сравнения, рассчитываемого по формуле

$$R^* = [I(M)/I(BC)]_x / [I(M)/I(BC)]_{cp} \cdot 100\% \quad (5),$$



в)  $\Delta R^*$  – степени изменения отношения интенсивности сигнала аналита к интенсивности сигнала ВС в исследуемой матрице по сравнению с матрицей сравнения, рассчитываемой по формуле:

$$\Delta R^* = R^* - 100\% \quad (6),$$

где  $I(M)_x$  – интенсивность сигнала аналита в исследуемой матрице;

$I(M)_{cp.}$  – интенсивность сигнала аналита в матрице сравнения;

$[I(M)/I(BC)]_x$  – отношение интенсивности сигнала аналита к интенсивности сигнала ВС в исследуемой матрице;

$[I(M)/I(BC)]_{cp.}$  – отношение интенсивности сигнала аналита к интенсивности сигнала ВС в матрице сравнения.

В качестве матрицы сравнения выступала 1 об.%  $HNO_3$ , в среде которой готовили все градуировочные растворы. Очевидно, что чем меньше влияние компонентов матрицы, тем ближе величины  $R$  и  $R^*$  к 100%, а  $\Delta R^*$  к 0%.

### **Глава 3. Устранение неспектральных матричных помех при МС-ИСП элементном анализе биологических жидкостей и лекарственных средств**

Уровни содержания в биологических жидкостях элементов – жизненно важных, условно важных, токсичных, а также входящих в состав действующих веществ потенциальных противоопухолевых лекарственных средств – в ходе течения заболевания или процесса лечения представляют большой интерес для современных клиницистов. Однако как показал обзор литературы (п. 1.1. Главы 1), методики МС-ИСП анализа, часто применяемые для их установления на практике, серьезно усложнены с точки зрения обеспечения минимизации неспектральных помех. Данная глава посвящена исследованию возможных влияний матрицы и поиску более простых способов их устранения за счет варьирования инструментальных настроек масс-спектрометра, оптимизации методики измерения и обработки аналитических сигналов. В качестве аналитов в работе выступали Р, Мп, Со, Сu, Zn, Ga, As, Se, Cd, Pt и Pb – элементы, выбор которых был продиктован задачами, поставленными перед нами медиками и разработчиками лекарственных средств.

#### **3.1. Предварительные эксперименты и наблюдения**

Предварительные эксперименты были направлены, прежде всего, на выявление возможных, оказывающих влияние на сигналы аналитов спектральных помех и выбор подходящей методики как прямого разбавления, так и окислительной минерализации путем критического анализа представленных в литературе вариантов. Более того, в рамках этой части работы было произведено сравнение результатов определения исследуемых элементов в биологических жидкостях после различной пробоподготовки и выявлены основные источники обнаруженных несоответствий.

Важно отметить, что все наблюдаемые и описанные в данном разделе закономерности были получены с использованием распылителя Бабингтона при непрерывном вводе пробы в масс-спектрометр со скоростью 0,10 оборот/с в «стандартном» режиме. Последнее означает, что перед началом измерений с целью достижения максимальной чувствительности определения элементов осуществляли автоматическую настройку работы прибора с помощью программы «Autotune» из пакета ChemStation и коммерчески доступного многоэлементного (покрывающего весь диапазон исследуемых атомных масс) стандартного раствора 10 мкг/л Li, Со, Y, Се и Tl

в 2 масс.% азотной кислоте. «Сшивание» импульсного и аналогового способов детектирования производили при использовании также стандартного Р/А раствора, состав которого описан выше в п. 2.1. Главы 2. В настроенном таким образом режиме работы масс-спектрометра установленные программой значения операционных параметров, важных с точки зрения устранения неспектральных помех, представлены в **табл. 10**. При этом степени образования оксидных ( $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+$ ) и двукратно заряженных ионов ( $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+$ ) варьировались в пределах 0,9 – 1,2% и 1,5 – 2,0%, соответственно.

**Таблица 10.** Значения параметров работы масс-спектрометра в «стандартном» режиме

Параметр	Диапазон
мощность генератора	1400 – 1500 Вт
скорость потока аргона через распылитель	1,15 – 1,25 л/мин
глубина отбора пробы	7,5 – 8,5 мм
потенциал на линзе-экстракторе	2 – 4 В

### 3.1.1. Оценка спектральных матричных помех

Влияние спектральных матричных помех на интенсивность аналитических сигналов исследовали на примере следующих изотопов определяемых элементов:  $^{31}\text{P}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{69}\text{Ga}$ ,  $^{71}\text{Ga}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{112}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  и  $^{208}\text{Pb}$ . Для этого, исходя из матричного состава изучаемых биологических жидкостей, с помощью данных работы [188] и программного обеспечения используемого масс-спектрометра были определены основные мешающие компоненты (C, N, F, Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mo, Ba). С целью оценки максимально возможного негативного эффекта концентрации этих элементов в модельных растворах были подобраны в соответствии с их наибольшим содержанием [189] в разбавленных пробах цельной крови (в 10 раз) и мочи (в 5 раз).

Из данных, представленных в **табл. 11** (жирным выделены те компоненты, что оказывают доминирующее влияние), видно, что использование  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{69}\text{Ga}$  и  $^{77}\text{Se}$  при работе на квадрупольном масс-спектрометре без столкновительной или реакционной ячейки нецелесообразно из-за заметного вклада в интенсивность их сигналов наложений  $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ ,  $^{138}\text{Ba}^{2+}$  и  $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ , соответственно. Тем не менее, определение этих элементов при такой конфигурации прибора возможно, так как другие изотопы ( $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{71}\text{Ga}$  и  $^{82}\text{Se}$ )

менее подвержены этим спектральным помехам. В случаях же, если выбора между изотопами одного и того же элемента нет (например, для  $^{75}\text{As}$ ), впрочем как и при незначительном влиянии, концентрации изотопов определяемых элементов, создаваемые спектральными помехами матрицы, следует учитывать при расчете результатов, что и делалось в данном исследовании. Такой подход все еще актуален в клинической практике из-за дороговизны дополнительного оборудования масс-спектрометров. Таким образом, в качестве определяемых изотопов среди прочих были выбраны  $^{31}\text{P}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{71}\text{Ga}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  и  $^{208}\text{Pb}$ .

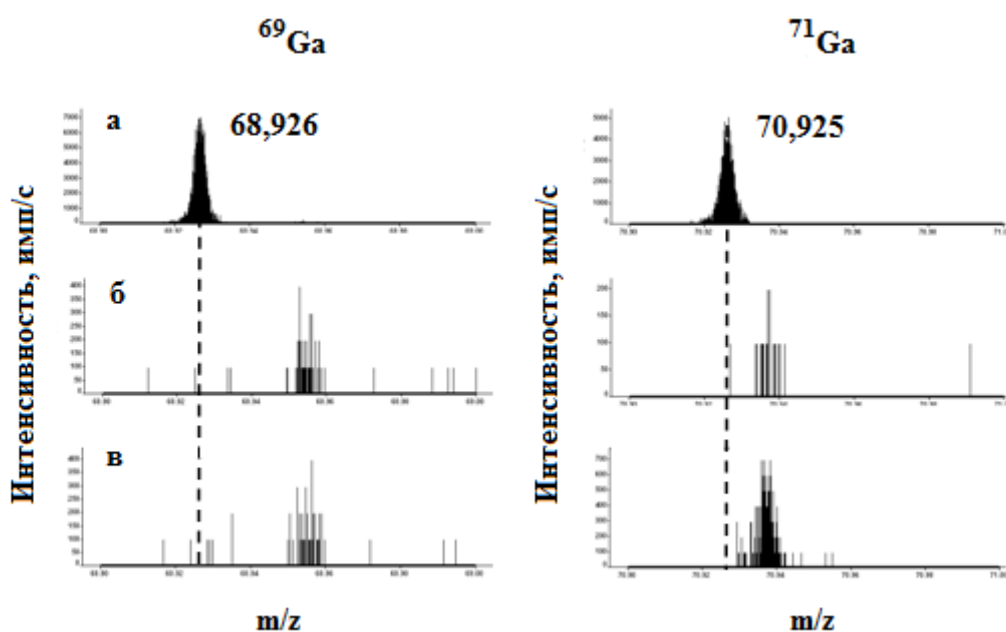
**Таблица 11.** Концентрации изотопов определяемых элементов, создаваемые спектральными наложениями матричных компонентов биологических жидкостей

Изотоп	Компоненты матрицы, вызывающие наложения	Концентрация, мкг/л	
		Кровь	Моча
$^{31}\text{P}^*$	C, N (без учета растворителя)	0,04	0,2
$^{55}\text{Mn}$	N, F, Na, S, Cl, K,	0,1	0,3
$^{59}\text{Co}$	F, Na, Mg, Cl, Ca,	0,1	0,2
$^{63}\text{Cu}$	C, N, Na, P, Cl, Ca	50	150
$^{65}\text{Cu}$	C, Mg, P, S, Cl, Ca	1	1,5
$^{66}\text{Zn}$	S, Ca	1	1,5
$^{68}\text{Zn}$	N, S, Cl	<0,3	<0,3
$^{69}\text{Ga}$	P, S, Cl, Ba	15	<0,01
$^{71}\text{Ga}$	P, S, Cl	0,7	<0,01
$^{75}\text{As}$	C, Na P, Cl, K, Ca	2	3
$^{77}\text{Se}$	C, N, F, Cl	6	10
$^{82}\text{Se}$	C, S, Cl	<0,2	<0,2
$^{111}\text{Cd}$	K, Mo	<0,004	<0,004
$^{112}\text{Cd}$	Ca	0,02	0,05
$^{114}\text{Cd}$	Ca	<0,004	<0,004
$^{194}\text{Pt}$	Mo	<0,003	<0,003
$^{195}\text{Pt}$	Mo	<0,003	<0,003
$^{196}\text{Pt}$	Mo	<0,005	<0,005
$^{206}\text{Pb}$	–	<0,01	<0,01
$^{208}\text{Pb}$	–	<0,02	<0,02

\* – концентрации в мг/л

Несмотря на то, что основные мешающие элементы для  $^{69}\text{Ga}$  и  $^{71}\text{Ga}$  в цельной крови были установлены выше (Ba и P, соответственно), дополнительно при разработке методики анализа этого элемента была изучена природа его фонового сигнала, прежде всего, в моче, где влияние тех же компонентов матрицы даже при всего 5-кратном разбавлении остается неясным. Ситуацию усугубляет еще больше и тот факт, что определению этих изотопов, источником которых является действующее вещество тестируемого лекарственного средства – 8-гидроскихинолинат галлия (Ш), предшествует на практике более сильное (в 50 раз в сравнении с 10 и 5-кратным), чем в модельных экспериментах, разбавление. Так как квадрупольный масс-спектрометр в силу меньшего разрешения по массам не позволяет провести такое исследование, в дальнейшем был использован прибор другой конфигурации – Element 2, значения операционных настроек которого представлены в **табл. 6**.

С его помощью были зарегистрированы спектры высокого разрешения вблизи масс 69 и 71 а.е.м. в трех различных пробах: а) стандартном растворе 1 мкг/л Ga, б) деионированной воде, в) моче, разбавленной в 50 раз (**рис. 2**).



**Рис. 2.** Спектры высокого разрешения вблизи масс 69 и 71 а.е.м., зарегистрированные на масс-спектрометре Element 2:

**а** – для стандартного раствора 1 мкг/л Ga, **б** – для деионированной воды,  
**в** – для мочи, разбавленной в 50 раз

Из представленных на **рис. 2а** масс-спектров явно следует, что сигналы  $^{69}\text{Ga}$  и  $^{71}\text{Ga}$  (соответствующие стандартному раствору элемента) локализованы на массах

68,926 и 70,925 а.е.м., соответственно. При этом центры сигналов двух других проб (спектры **б** и **в**) смещены в сторону больших масс – 68,956 и 70,937 а.е.м., соответственно, т. е. эти сигналы не связаны с присутствием галлия.

Программа расшифровки, которой снабжен данный прибор, приписывает сигнал, регистрируемый в деионированной воде или растворе мочи вблизи массы 69 а.е.м., двухзарядным ионам:  $^{138}\text{Ba}^{2+}$ ,  $^{138}\text{La}^{2+}$  и  $^{138}\text{Ce}^{2+}$ , исключая полностью возможность его возникновения за счет полиатомных наложений  $^{33}\text{S}^{36}\text{Ar}^+$ ,  $^{31}\text{P}^{38}\text{Ar}^+$ ,  $^{29}\text{Si}^{40}\text{Ar}^+$ ,  $^{51}\text{V}^{18}\text{O}^+$ ,  $^{52}\text{Cr}^{17}\text{O}^+$  или  $^{53}\text{Cr}^{16}\text{O}^+$ . Однако даже высокое разрешение этого масс-спектрометра не позволяет определить, какой или какие именно из этих двухзарядных ионов ответственны за происхождение фонового сигнала. Учитывая существенно меньшие концентрации La и Ce (по сравнению с Ba) в биологических жидкостях, можно утверждать, что основной вклад в фон, как и в случае цельной крови, вносит ион  $^{138}\text{Ba}^{2+}$ .

Фоновый сигнал вблизи массы 71 а.е.м. может быть обусловлен, по данным той же программы, неразрешенными полиатомными ионами  $^{40}\text{Ar}^{31}\text{P}^+$  и  $^{35}\text{Cl}^{36}\text{Ar}^+$ , но не  $^{142}\text{Nd}^{2+}$ ,  $^{142}\text{Ce}^{2+}$ ,  $^{55}\text{Mn}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{53}\text{Cr}^{18}\text{O}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$  или  $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ . Имея в виду результаты проведенного выше исследования влияния P и Cl на определение  $^{71}\text{Ga}$ , можно с уверенностью утверждать, что именно полиатомный комплекс  $^{40}\text{Ar}^{31}\text{P}^+$ , как и в случае цельной крови, является основным источником фона на массе 71 а.е.м.

Другими словами, проведенное исследование позволяет заключить, что при использовании квадрупольного масс-спектрометра предел обнаружения галлия в исследуемых биологических жидкостях (как цельной крови, так и мочи) будет определяться не фоновым содержанием элемента в самих объектах или используемых реактивах, а мешающим влиянием ионов, образованных матричными компонентами анализируемых проб.

### **3.1.2. Обоснование выбора методик пробоподготовки биологических жидкостей**

#### **3.1.2.1. Выбор разбавителя**

Согласно обзору литературы (п. 1.1.1.1. Главы 1), цельную кровь чаще всего разбавляют с помощью разнообразных смесей таких органических веществ, как Тритон X-100, ЭДТА и/или 1-бутанол, в азотнокислой или аммиачной среде. Для тех же целей в случае более простых проб (сыворотки крови или мочи) обычно применяют

разбавленную азотную кислоту. При этом в силу равноправного использования различных вариантов в анализе, прежде всего, цельной крови, выделить явные преимущества того или иного разбавителя не представляется возможным, хотя каждый компонент предлагаемых смесей отвечает за определенную функцию. В связи с этим в работе была предпринята попытка сравнения этих смесей между собой. Исследование включало в себя не только и не столько изучение полноты растворения образца, сколько выявление неспектральных матричных помех, обусловленных исключительно составом используемых для разбавления растворов. Последнее особенно важно, так как одной из целей является отказ от применения градуировки с подбором матрицы, в том числе матрицы разбавителя.

Именно поэтому первоначально были приготовлены искусственные модельные растворы, содержащие 25 мг/л Р и 100 мкг/л Mn, Co, Cu, Zn, Ga, As, Se, Cd, Pt, Pb, а также 25 мкг/л Rh в качестве внутреннего стандарта, в восьми (А-З, табл. 7) разбавителях. Так как ВС использовался, в первом приближении, для учета нестабильности работы прибора и инструментального дрейфа, а также нивелирования возможного влияния со стороны системы ввода пробы, он выбирался исключительно из соображений отсутствия элемента в исследуемых пробах и невозможности дополнительного искажения результатов за счет спектральных интерференций. Концентрации компонентов используемых для разбавления смесей соответствовали усредненным значениям встречающихся в литературе содержаний.

Рассчитанные по формуле 5 с помощью измеренных в различных смесях интенсивностей сигналов исследуемых элементов и ВС величины  $R^*$ , являющиеся, своего рода, количественными характеристиками влияния состава разбавителя на результаты определения, приведены в табл. 12. Из данных, представленных в ней, отчетливо видно, что присутствие в растворе Тритона X-100 или ЭДТА не оказывает никакого воздействия на интенсивности относительных сигналов (значения  $R^*$  близки к 100%), в то время как наличие 1-бутанола и аммиака существенно искажает их для некоторых элементов. В первом случае наблюдается значительное (примерно в 2 раза) увеличение интенсивности относительных сигналов Р, As и Se (смеси В, Г, Ж и З), видимо, за счет переноса заряда с иона  $C^+$ , образующегося при вводе в плазму органического растворителя. Этот эффект как раз характерен для элементов с высокими первыми потенциалами ионизации [190], отличающимися от ПИ углерода на 1 – 2 эВ

(п. 1.2.3. Главы 1). Несмотря на то, что цинк тоже подпадает под указанное в литературе правило, в рамках этого исследования завышения интенсивности относительного сигнала на его изотопах не установлено. Во втором же случае обнаружено примерно двукратное подавление интенсивности относительного сигнала платины (смеси Д-3), что, вероятнее всего, обусловлено ее осаждением в основной среде.

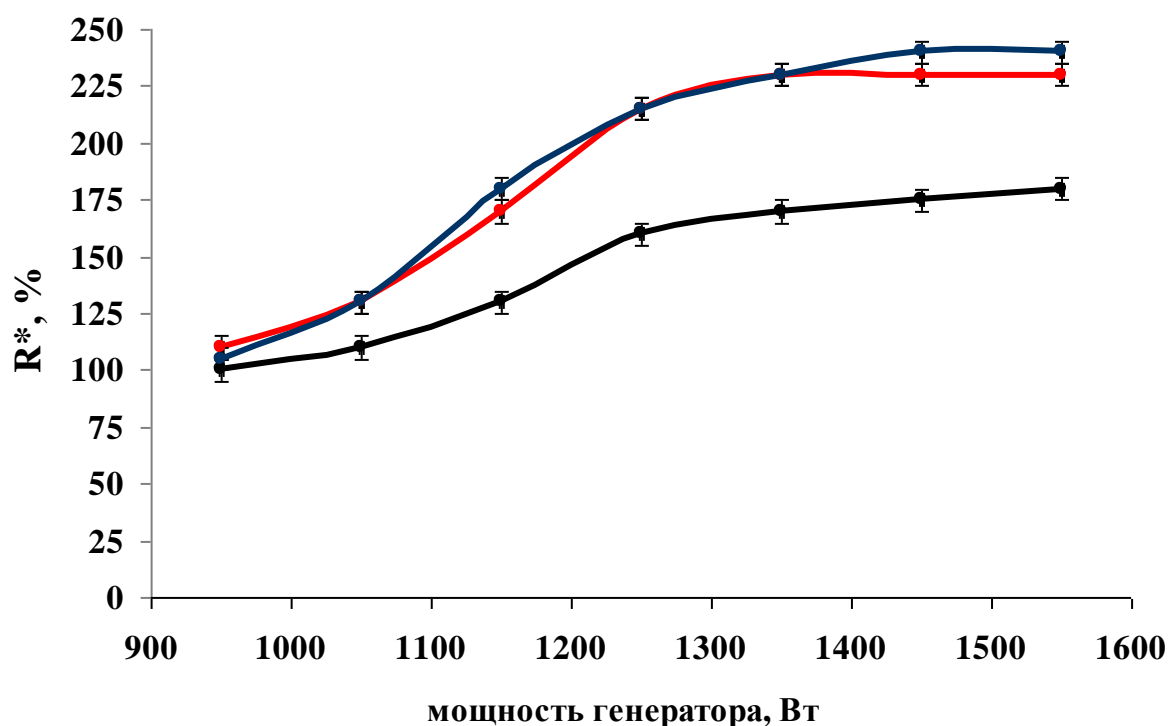
**Таблица 12.** Значения величин  $R^*$  для исследуемых элементов в различных по составу разбавителях ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Смесь	$R^*$ , %										
	P	Mn	Co	Cu	Zn	Ga	As	Se	Cd	Pt	Pb
А	98	100	99	101	99	100	101	98	101	100	99
Б	100	101	100	99	100	98	100	100	99	98	100
В	<b>180</b>	100	99	101	102	99	<b>230</b>	<b>240</b>	100	98	99
Г	<b>185</b>	99	100	99	103	100	<b>235</b>	<b>230</b>	101	99	99
Д	100	99	100	101	99	98	101	99	100	<b>55</b>	100
Е	99	98	100	99	100	99	100	100	99	<b>50</b>	99
Ж	<b>190</b>	100	101	100	101	100	<b>230</b>	<b>235</b>	100	<b>50</b>	101
З	<b>180</b>	100	101	99	98	100	<b>240</b>	<b>230</b>	101	<b>55</b>	99

Если устранить влияние аммиака на платину можно только путем перехода к растворителям, содержащим азотную кислоту (А-Г), то, согласно данным литературы (п. 1.2.3. Главы 1), минимизации завышения интенсивности относительных сигналов P, As и Se способствует и инструментальная настройка прибора, а именно, понижение мощности генератора и увеличение скорости потока аргона через распылитель. Действительно, как следует из **рис. 3**, при фиксированной скорости потока аргона (1,20 л/мин – оптимальной с точки зрения чувствительности определения элементов в 2 масс.% азотной кислоте) уменьшение мощности генератора до практически нижнего предела позволяет полностью скомпенсировать рассматриваемый эффект за счет понижения температуры плазмы и, как следствие, уменьшения в ней концентрации ионов  $C^+$ . Однако такие значения настроек масс-спектрометра – это будет показано ниже – не смогут привести к минимизации неспектральных помех, обусловленных компонентами матрицы самих биологических жидкостей. К тому же, чувствительность определения в данном режиме значительно ниже, что не может не повлиять на пределы



обнаружения остальных элементов. В связи с этим, использование 1-бутанола в рамках данной работы было признано нецелесообразным. Такому решению способствовал и тот факт, что его содержание в разбавителях никоим образом не влияет на общую растворимость образцов.



**Рис. 3.** Зависимости величины  $R^*$  для Р (черный цвет), As (красный цвет) и Se (синий цвет) от мощности генератора при фиксированной скорости потока аргона через распылитель – 1,20 л/мин ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

При более подробном изучении растворения биологических жидкостей в пяти оставшихся не содержащих 1-бутанол разбавителях (в смесях А, Б, Д и Е или 1 об.%  $\text{HNO}_3$ ) вне зависимости от кратности разбавления, которая варьировалась от 5 до 10 раз, было установлено резкое различие в поведении реальных образцов практически здоровых добровольцев и пациентов с различного рода воспалительными процессами. Если во всех случаях разбавления проб первого типа образуются гомогенные растворы, то при пробоподготовке образцов второго вида (даже при анализе непосредственно через 2 – 3 часа после отбора проб и, что самое главное, без замораживания) довольно часто происходит осаждение органических веществ вне зависимости от кислотности применяемого разбавителя и вида биологической жидкости. При этом отмечено, что наименьшая седиментация все-таки наблюдается при использовании содержащих аммиак смесей (Д и Е), что согласуется с данными литературы, предусматривающими

возможность осаждения белков в растворах азотной кислоты с ее концентрацией более 0,5 об.% [5]. Однако игнорировать частичное выделение органических веществ в этих случаях, как отмечается в некоторых исследованиях (п. 1.1.1.1. Главы 1), не всегда можно. Анализ выделенных осадков показал, что при разбавлении смесями А и Б, а также слабо концентрированной азотной кислотой в случае мочи (даже при уменьшении содержания  $\text{HNO}_3$  до 0,5 об.%) максимальные потери всех исследуемых элементов могут достигать 15 – 20%, в то время как использование разбавителей Д и Е не приводит (кроме платины) к искажению результатов определения за счет захвата аналитов в процессе седиментации.

В целом, однозначный выбор разбавителя для всех типов биологических жидкостей вне зависимости от их происхождения и природы определяемых элементов осуществить не удастся. Рекомендованными для использования в случае пробоподготовки образцов практически здоровых добровольцев могут быть смеси А и Б (для всех биологических жидкостей) и разбавленная 1 об.%  $\text{HNO}_3$  (для мочи). Смеси же Д и Е подходят для разбавления проб пациентов с различного рода воспалительными процессами с целью определения всех рассматриваемых элементов, кроме платины.

### **3.1.2.2. Оптимизация методики окислительной минерализации**

Главной целью применения окислительной минерализации, как уже было неоднократно подчеркнuto, является удаление органической матрицы биологических жидкостей и, как следствие, устранение ее влияния на результаты определения. Поэтому в данной работе, помимо прочего, была проведена и оптимизация методики такого способа пробоподготовки, а точнее проверка полноты окисления составляющих цельную кровь, плазму и мочу органических веществ в описанных в литературе и производителями оборудования условиях.

Чаще всего для минерализации таких проб применяют концентрированную азотную кислоту или ее смеси с перекисью водорода. В рамках этого исследования именно смесям было отдано предпочтение, так как к явным преимуществам добавления  $\text{H}_2\text{O}_2$  относятся уменьшение образования паров диоксида азота, что важно с точки зрения безопасности открывания автоклавов, и ускорение разложения проб за счет повышения температуры (п. 1.1.1.2. Главы 1). Для интенсификации процесса минерализации образцов была использована коммерчески доступная МВ система.

В ходе оптимизации методики разложения отталкивались от распространенных в литературе пропорций биологических жидкостей и реактивов. Так, обычно на окисление 0,5 – 1 мл образца берут 1 – 2 мл  $\text{HNO}_3$  и 0,5 – 1 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В контексте данной работы рассматривали два варианта подобных соотношений – одно, не выходящее за рамки устоявшихся значений, и другое, превышающее первое в два раза. Другими словами, к 0,5 мл цельной крови и сыворотки крови или к 1 мл мочи добавляли 1,5 или 3,0 мл  $\text{HNO}_3$  и 0,75 или 1,5 мл  $\text{H}_2\text{O}_2$ , соответственно. Несмотря на то, что программирование температуры и времени в МВ системе осуществляли согласно рекомендациям производителя оборудования (**табл. 8**), используя в случае цельной крови и сыворотки более плавное, многоступенчатое повышение параметров для равномерного разложения образцов, дополнительно изучали влияние времени выдерживания проб при максимальной температуре на результаты определения. Для этого увеличивали его с 6 до 12 и 18 мин или с 10 до 15 и 20 мин, в случае цельной крови и сыворотки крови или мочи, соответственно. Полноту окисления органической матрицы также контролировали путем сравнения результатов определения одних и тех же образцов после МВ минерализации и разложения с обработкой остатка хлорной кислотой (согласно п. **2.3.3.3**. Главы **2**). Во всех случаях перед анализом пробы разбавляли до рекомендованного конечного содержания азотной кислоты, не превышающего 15 об.% [**68, 71**]. В качестве ВС по-прежнему использовали Rh той же концентрации.

Установлено, что все описанные выше модификации начальной методики окислительной минерализации биологических жидкостей: двукратное увеличение количества применяемых для разложения реактивов, выдерживание образцов при максимальной температуре в МВ системе более длительное время, дополнительная обработка хлорной кислотой – не приводят к изменению результатов определения исследуемых элементов. Это косвенно подтверждает, что при сохранении прочих равных обстоятельств, полного окисления органической матрицы удастся добиться в первоначально предложенных условиях.

### **3.1.2.3. Сравнение результатов анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки**

Сравнение результатов определения исследуемых элементов в цельной крови и моче после различной пробоподготовки проводили на примере образцов практически

здоровых добровольцев. Исследование сыворотки не осуществляли, так как она является производной крови и не представляет дополнительного интереса с точки зрения выявления возможных несоответствий. Биологические жидкости разбавляли напрямую с помощью смеси А и разбавленной  $\text{HNO}_3$  или подвергали минерализации, согласно описанным методикам (п. 2.3.3.1. и 2.3.3.3. Главы 2) с учетом сделанных выше заключений, касающихся выбора условий пробоподготовки в обоих случаях. Ввиду того, что уровни содержаний галлия и платины в подобных пробах ничтожно малы, для проверки правильности их определения непосредственно перед пробоподготовкой в образцы добавляли эти элементы в количестве, необходимом для создания в измеряемых растворах концентрации, равной 100 мкг/л. Градуировочные растворы, как и прежде, готовили в 1 об.%  $\text{HNO}_3$ , а при расчете концентраций учитывали возможные спектральные помехи.

Из данных, представленных в **табл. 13**, видно, что для элементов с относительно высокими первыми потенциалами ионизации (P, Zn, As, Se, Pt: ПИ  $\geq 9,0$  эВ) наблюдается явное несоответствие между содержаниями, установленными в растворах после различной пробоподготовки. 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 воспалительными процессами показало, что подобное расхождение может достигать и 30 – 40% в зависимости от пробы. Очевидно, что если бы не низкое содержание, аналогичная картина была бы характерна и для кадмия, элемента также с высоким ПИ. Обращает на себя внимание и тот факт, что при определении фосфора в моче обнаруженное несоответствие проявляется в меньшей степени (занижение всего на 10%), что, безусловно, связано с дополнительным разбавлением проб перед анализом именно этого элемента. Помимо этого, результаты определения платины в моче указывают на наличие неспектральных матричных помех как при разбавлении, так и при минерализации. В обоих случаях установленные концентрации не просто не равны 100 мкг/л, а ниже этого значения, что автоматически свидетельствует и 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 13.** Результаты определения элементов в цельной крови и моче практически здорового добровольца после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	ПИ, эВ [190]	Концентрация, мкг/л			
		Кровь		Моча	
		разбавление	минерализация	разбавление	минерализация
<b>P*</b>	<b>10,5</b>	<b>450 ± 20</b>	<b>340 ± 25</b>	<b>1100 ± 30</b>	<b>1000 ± 40</b>
<b>Mn</b>	7,4	7,2 ± 0,2	7,5 ± 0,3	<0,1	<0,1
<b>Co</b>	7,9	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,65 ± 0,05	0,6 ± 0,1
<b>Cu</b>	7,7	950 ± 30	920 ± 50	15,0 ± 0,7	15 ± 1
<b>Zn</b>	<b>9,4</b>	<b>5300 ± 200</b>	<b>4100 ± 250</b>	<b>890 ± 20</b>	<b>715 ± 30</b>
<b>Ga**</b>	6,0	101 ± 3	98 ± 4	101 ± 2	100 ± 4
<b>As</b>	<b>9,8</b>	<b>9 ± 1</b>	<b>6 ± 1</b>	<b>11,6 ± 0,6</b>	<b>8,6 ± 0,7</b>
<b>Se</b>	<b>9,8</b>	<b>110 ± 5</b>	<b>80 ± 5</b>	<b>37 ± 3</b>	<b>29 ± 3</b>
<b>Cd</b>	9,0	<0,03	<0,04	<0,02	<0,06
<b>Pt**</b>	<b>9,0</b>	<b>97 ± 3</b>	<b>78 ± 5</b>	<b>86 ± 2</b>	<b>70 ± 3</b>
<b>Pb</b>	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

Другими словами, в выбранных условиях пробоподготовки и измерения за счет неоднозначного влияния компонентов матрицы исследуемых растворов на сигналы различных аналитов происходит их дифференциация по ПИ. Это приводит к невозможности получения правильных результатов для всего набора определяемых элементов. В связи с этим, на следующем этапе были выявлены основные источники такой дифференциации и оценена их роль.

#### 3.1.2.4. Оценка роли основных видов неспектральных помех

Для оценки вкладов всех возможных неспектральных помех в наблюдаемое различие концентраций элементов с относительно высоким ПИ предварительно были рассчитаны или определены максимальные концентрации компонентов анализируемых после различной пробоподготовки образцов и предложены адекватные синтетические растворы, имитирующие соответственно солевую, органическую и кислотную матрицы.

Очевидно, что при простом разбавлении пробы следует учитывать только влияние солей и органических веществ, присутствующих в биологических жидкостях. Кислотность анализируемых растворов при этом строго фиксирована за счет использования растворителя, содержащего 1 об.% азотную кислоту (в случае смеси А и разбавленной  $\text{HNO}_3$ , которые применяли в п. 3.1.2.3. настоящей Главы). Так как общее содержание минеральных солей в цельной крови не превышает 0,9%, а в моче 2%, то после описанной в п. 2.3.3.1. Главы 2 пробоподготовки их концентрации в растворе не могут быть выше 0,09% и 0,4%, соответственно. Моделировать такую матрицу уместно с помощью раствора Рингера [186] и искусственной по солевому составу мочи, описанной в работе [187]. Сложнее дело обстоит с имитацией органической матрицы биологических жидкостей, особенно в случае цельной крови. Однако если в первом приближении учитывать только влияние образуемого в плазме иона  $\text{C}^+$ , то исходя из общего содержания углерода в крови, равного 25 г/л [189], в качестве модельного можно использовать ~8 г/л раствор глицина. Простейшая аминокислота была выбрана потому, что в составе этой биологической жидкости преобладают белки. Замена раствора глицина на такой же по содержанию углерода ~6,5 г/л раствор глюкозы (строение молекулы которой намного сложнее) приводит к аналогичным, описанным ниже результатам, что подтверждает адекватность критерия выбора. При разбавлении мочи в силу наибольшего содержания в составе последней карбамида (до 45 г/л по данным сайта ИНВИТРО), именно ~9 г/л раствор этого вещества может полноценно охарактеризовать влияние органической матрицы в этом случае.

При окислительной минерализации все органические вещества наоборот полностью окислены до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и других низших молекул, поэтому на первый план здесь выходят влияние кислоты, которую добавляют в пробы для разложения, и в меньшей степени из-за обычно более сильного разбавления образцов влияние солей. Действительно, остаточная концентрация  $\text{HNO}_3$  в растворах после минерализации и соответствующего разбавления может составлять 7 – 12 об.%. В то время как максимально возможное общее солесодержание равно 0,03% и 0,2% для цельной крови и мочи, соответственно. Проблем с имитацией таких матриц не возникает.

Принимая во внимание все вышесказанное, с целью выявления основных источников неспектральных помех и выяснения возможности сложения их влияний готовили модельные растворы 1, 1', 2, 2', 3, 4, 5, 1+3, 2+4, 1'+5 и 2'+5 с добавлением ВС

Rh так, как описано в п. 2.3.8. Главы 2. В табл. 14 приведены значения рассчитанных по формулам 5 и 6 величин  $\Delta R^*$  для элементов с относительно высоким ПИ.

**Таблица 14.** Величины  $\Delta R^*$ , рассчитанные для элементов с относительно высоким ПИ в модельных растворах (n = 3, P = 0,95)

Модельные растворы		- $\Delta R^*$ , %					
		P	Zn	As	Se	Cd	Pt
1	раствор Рингера (1:10)	5±2	7±2	5±1	5±1	6±1	5±1
1'	раствор Рингера(1:30)	2±1	3±1	1±1	2±1	1±1	1±1
2	смесь солей (1:5)	10±3	11±2	10±1	9±2	9±2	11±1
2'	смесь солей (1:10)	4±1	5±2	4±2	5±1	6±1	5±1
3	глицин 8 г/л	1±1	2±1	1±1	1±1	2±1	1±1
4	карбамид 9 г/л	4±1	5±2	5±2	6±1	5±1	4±1
5	15 об.% HNO <sub>3</sub>	25±2	25±3	27±2	25±2	24±2	23±2
1+3		6±3	7±2	6±2	7±2	5±1	7±1
2+4		14±2	15±1	15±2	14±3	15±2	13±2
1'+5		27±2	28±2	28±2	30±4	24±2	24±3
2'+5		33±3	32±2	31±2	32±2	33±3	30±4

Согласно данным, приведенным в таблице, занижение результатов определения этих элементов возможно при использовании обоих способов пробоподготовки, что было ранее явно установлено на примере анализа Pt в моче (табл. 13). При этом эффект от присутствия компонентов матрицы в анализируемых растворах слабее при прямом разбавлении: значения величин  $-\Delta R^*$ , в среднем, 5 – 15% (растворы 1+3, 2+4) по сравнению с 24 – 33% при минерализации (растворы 1'+5 и 2'+5). Доминирующим в первом случае оказывается влияние солей (сравнить величины  $-\Delta R^*$  для растворов 1, 3 и 1+3 или 2, 4 и 2+4). В то время как на определяемые в разложенных пробах концентрации наибольшее воздействие оказывает кислотная матрица (сравнить величины  $-\Delta R^*$  для растворов 1', 5 и 1'+5 или 2', 5 и 2'+5). Однако недооценивать вклад других веществ, составляющих основу образца, при определении элементов в моче также нельзя: присутствие карбамида в растворах 4 и 2+4 или относительно высокое содержание солей в случае 2' и 2'+5 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. Это приводит к

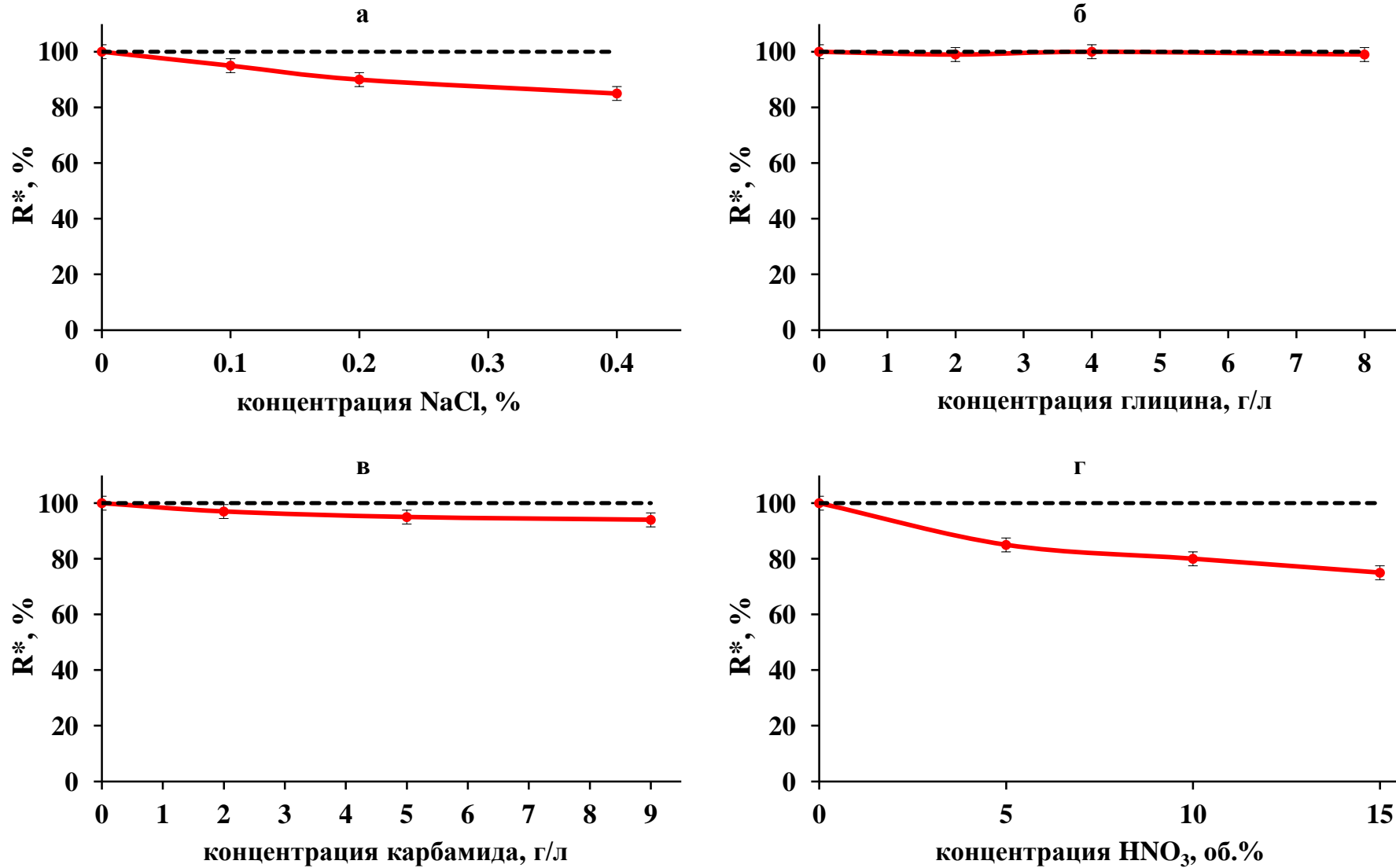
усугублению ситуации при совместном присутствии различных компонентов матрицы. Кроме того, различие результатов анализа между двумя видами пробоподготовки составляет 17 – 23%, что вполне соответствует выводам, сделанным из данных **табл. 13**. Подтверждение находит и факт отсутствия переноса заряда с иона  $C^+$  на все эти элементы: значения величин  $\Delta R^*$  для всех растворов отрицательны.

Очевидно, что при переходе от одной пробы к другой, а также при изменении кратности разбавления матричный состав анализируемых растворов может существенно варьироваться. Поэтому на следующем этапе было решено зарегистрировать в тех же условиях зависимости величины  $R^*$  от концентраций NaCl (0 – 0,4%), глицина (0 – 8 г/л), карбамида (0 – 9 г/л) и  $HNO_3$  (0 – 15 об.%), чтобы установить, в рамках каких содержаний этих компонентов помехи проявляются в наибольшей степени. Из графиков, приведенных на **рис. 4** (по оси ординат отложено усредненное значение величины  $R^*$  для группы элементов с высоким ПИ), отчетливо видно, что с уменьшением содержания компонентов матрицы глубина искажения результатов определения рассматриваемых аналитов уменьшается (кроме, естественно, растворов глицина): в  $\leq 0,05\%$  растворах NaCl (**а**), в растворах глицина любой концентрации (**б**), в  $\leq 2$  г/л растворах карбамида (**в**) и в  $\sim 1$  об.% растворах  $HNO_3$  (**г**) проявление неспектральных помех минимально. Это подтверждает применимость популярного приема борьбы с этими эффектами – дополнительного разбавления. Однако в рамках данной работы такой подход считается неперспективным, так как одной из целей исследования является одновременное определение элементов с различным содержанием (0,2 – 9000 мкг/л) из одного раствора.

\* \* \*

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 набора аналитов из одного раствора. Решением такой задачи может стать правильная настройка параметров прибора, а также выбор подходящих ВС.





**Рис. 4.** Зависимости величин  $R^*$  для элементов с ПИ  $\geq 9,0$  эВ от концентрации матричных компонентов: а – NaCl, б – глицина, в – карбамида, г – HNO<sub>3</sub> (n = 3, P = 0,95)

### 3.2. Разработка подходов к устранению неспектральных помех

Разработка подходов к устранению неспектральных матричных помех включала в себя исследование их минимизации за счет только инструментальных настроек прибора или замены распылителя и выявление четкого критерия выбора внутреннего стандарта с изучением возможности применения одного, причем любого, ВС.

#### 3.2.1. Исследование возможности нивелирования неспектральных помех за счет инструментальной настройки масс-спектрометра или замены распылителя

Оптимизация настроек масс-спектрометра (поиск так называемых «устойчивых» значений параметров) может быть одним из способов устранения неспектральных помех (п. 1.2. Главы 1). Варьируемыми в ходе этого процесса характеристиками чаще всего являются мощность генератора и, самое главное, как следует из обзора литературы, скорость потока аргона через распылитель. Реже внимание уделяется также скорости подачи образца в распылитель, глубине отбора пробы и потенциалу на линзе-экстракторе. При этом консенсуса по поводу роли последних двух параметров нет.

В рамках этого исследования было изучено влияние всех упомянутых выше характеристик, кроме скорости подачи образца в распылитель в силу того, что ее величина и так была практически минимальна (0,10 оборот/с): увеличение же этого параметра обычно приводит к более яркому проявлению эффектов, что в нашем случае нецелесообразно. Значения остальных операционных характеристик изменяли в пределах диапазонов, указанных в **табл. 6**. В качестве модельных применяли растворы исследуемых элементов в 4 матрицах: 0,4% NaCl, 8 г/л глицина, 9 г/л карбамида и 15 об.% HNO<sub>3</sub> без использования ВС, чтобы оценить абсолютный вклад в минимизацию рассматриваемых помех только инструментальной настройки прибора. При этом как и прежде, с точки зрения проявления неспектральных помех была обнаружена дифференциация аналитов по потенциалам ионизации. Для удобства они были условно разделены на две группы: элементы с относительно низкими, меньшими 9,0 эВ (Mn, Co, Cu, Ga и Pb) и с относительно высокими, приблизительно равными или большими 9,0 эВ (P, Zn, As, Se, Cd и Pt) первыми потенциалами ионизации [190]. Так как внутри каждой такой группы величины **R**, рассчитанные по формуле 4, не различались более чем на 5%, на всех графиках, представленных ниже, по оси ординат отложены их усредненные значения.

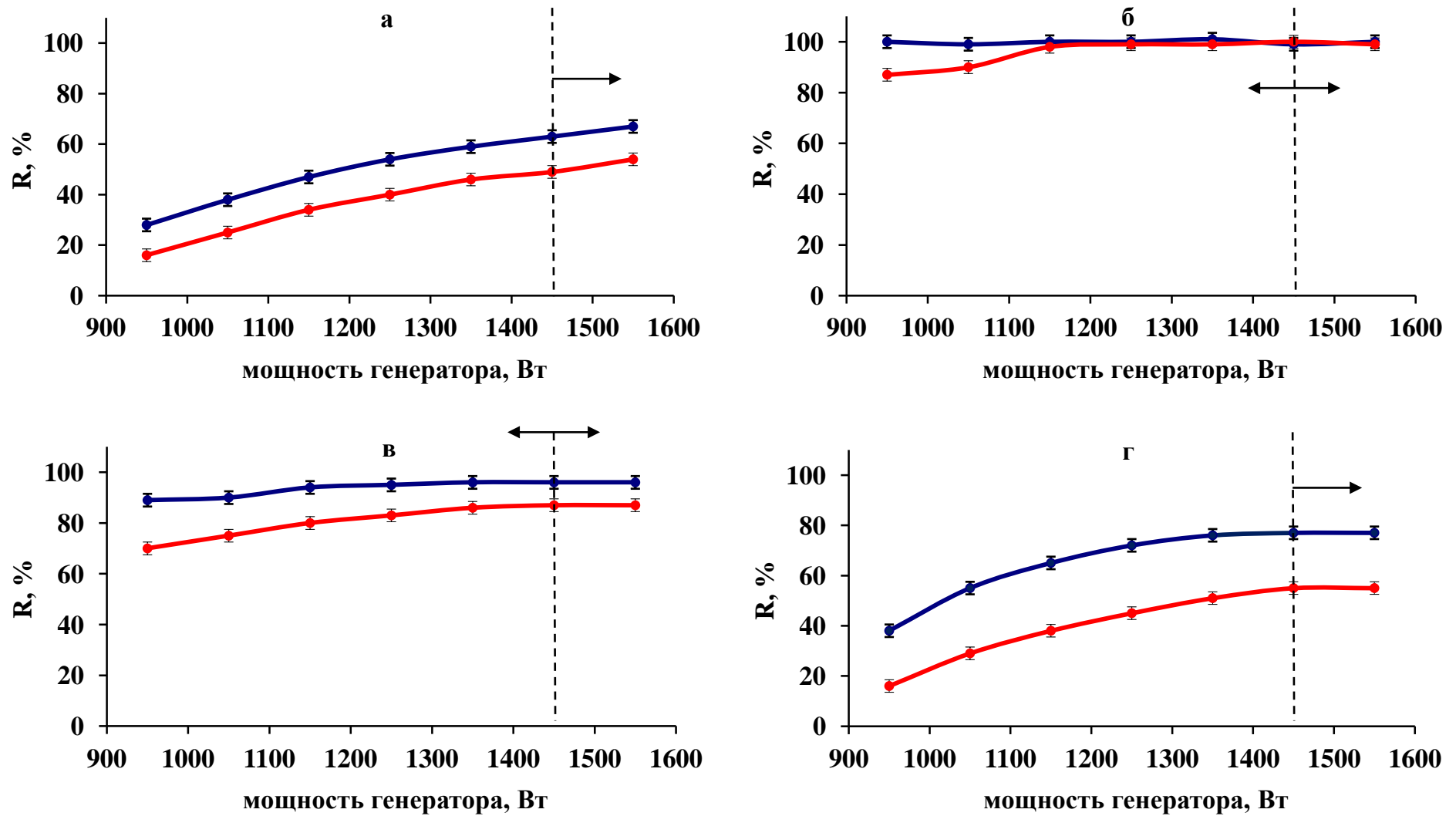
### 3.2.1.1. Варьирование мощности генератора

Варьирование мощности генератора производили при фиксации всех остальных настроек работы масс-спектрометра, соответствующих «стандартному» режиму.

Как и следовало ожидать, переход от установленного автоматически, оптимального с точки зрения чувствительности определения в 2 масс.%  $\text{HNO}_3$ , значения 1450 Вт к меньшим мощностям способствует, в первом приближении, уменьшению интенсивностей абсолютных сигналов всех элементов ввиду снижения температуры плазмы. При этом если при определении элементов в 0,4%  $\text{NaCl}$  и 15 об.%  $\text{HNO}_3$  наблюдается постепенное падение интенсивностей во всем диапазоне от 1450 до 950 Вт, то подобное явление в случае анализа матриц 8 г/л глицина и 9 г/л карбамида отмечается только после 1050 Вт. Последнее обстоятельство оправдывает применение органических веществ для повышения чувствительности определения. Так, при граничной мощности 950 Вт интенсивности абсолютных сигналов снижаются для первых двух сред в 10 – 20 раз, тогда как для вторых двух этот показатель значительно меньше и составляет всего 3 – 7 раз. Увеличение мощности до 1550 Вт обычно не приводит к значительному росту интенсивностей.

Результаты исследования возможности устранения несектральных помех за счет варьирования этого параметра показывают, что максимальные значения величина **R**, характеризующая глубину проявления эффектов, приобретает только при высоких значениях мощности, причем независимо от природы матрицы анализируемого раствора (**рис. 5**). Этому, вероятно, способствуют как повышение температуры плазмы, так и более эффективный перенос энергии внутри нее от периферии к центральному каналу. Существующая же дифференциация элементов по ПИ может быть устранена только в случае устранения влияния глицина (**рис. 5 б**), в то время как для остальных матриц зависимости  $\mathbf{R} = f(\text{мощность})$  для обеих групп анализов в первом приближении параллельны (**рис. 5 а, в и г**).

В связи с тем, что заметной разницы в минимизации влияния сопутствующих компонентов и чувствительности определения в интервале мощностей 1450 – 1550 Вт нет, учитывая также факт увеличения доли двукратно заряженных ионов при повышенных мощностях в качестве «устойчивой» была оставлена исходная мощность – 1450 Вт.



**Рис. 5.** Зависимости величин  $R$  для элементов с  $PI < 9,0$  эВ (синий цвет) и  $\geq 9,0$  эВ (красный цвет) от мощности генератора при фиксированных остальных параметрах, зарегистрированные в средах:

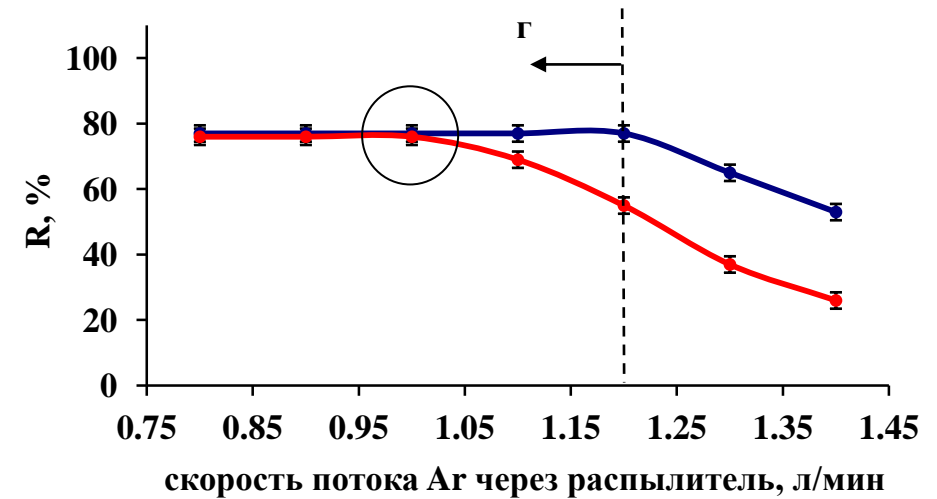
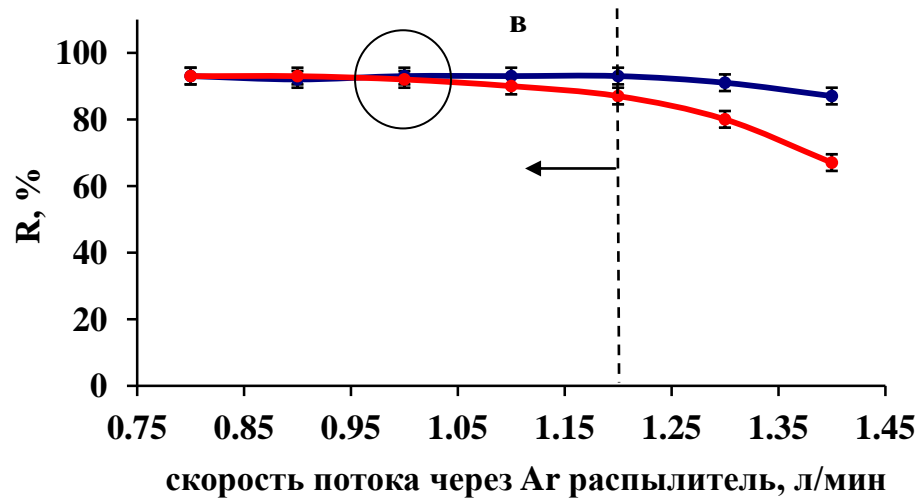
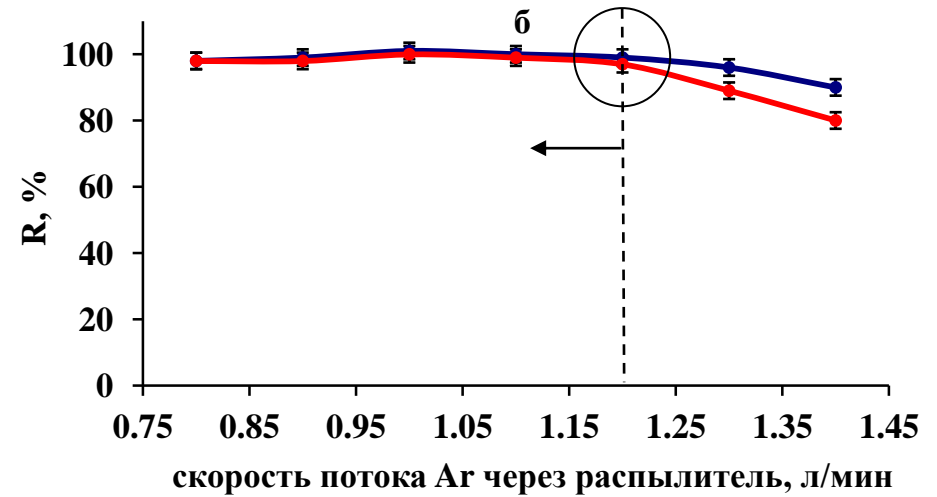
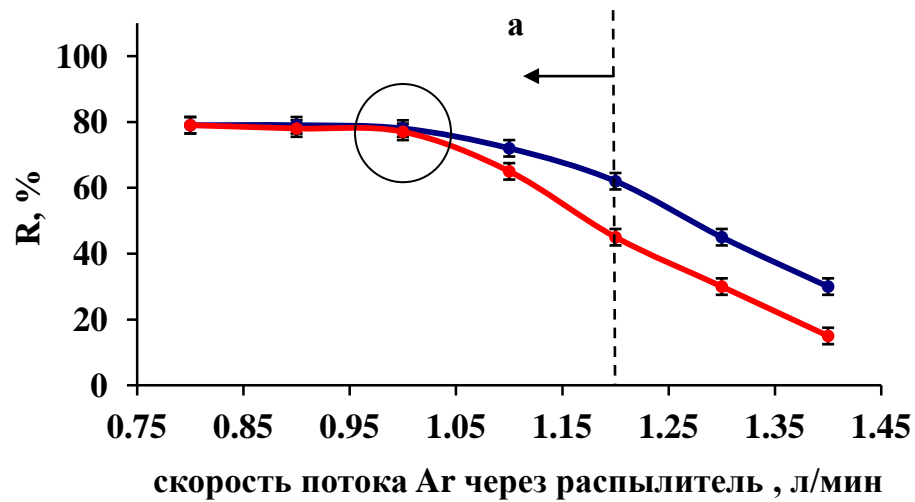
**а** – 0,4 % растворе NaCl, **б** – 8 г/л растворе глицина, **в** – 9 г/л растворе карбамида, **г** – 15 об.%  $HNO_3$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

### 3.2.1.2. Варьирование скорости потока аргона через распылитель

Как показано выше, полного устранения неспектральных помех для всех элементов во всех рассматриваемых средах (кроме глицина – **рис. 5**) с помощью подбора мощности генератора добиться не удастся, поэтому на следующем этапе при выбранном значении параметра и фиксированных остальных настройках масс-спектрометра варьировали скорость потока аргона через распылитель. С целью подтверждения необходимости именно понижения этой характеристики (как утверждается в литературе) ее изменяли как в сторону меньших, так и больших значений.

Результаты исследования показывают, что смена матрицы анализируемого раствора никак не сказывается на величине оптимальной, с точки зрения чувствительности определения, скорости потока аргона через распылитель. Действительно, при увеличении значения данного параметра до 1,40 л/мин или его уменьшении до 0,80 л/мин интенсивности абсолютных сигналов равномерно снижаются в среднем в 3-15 раз в зависимости от матрицы и определяемого изотопа. В первом случае это, вероятно, происходит за счет менее эффективной ионизации элементов в силу падения температуры плазмы из-за большей ее загрузки компонентами анализируемого раствора, а также смещения высокотемпературной зоны. При более медленной подаче пробы, очевидно, просто снижается значение величины  $W_{tot}$ . Все это полностью противоречит зонной модели устройства плазмы, описанной в п. **1.2.3** Главы **1** и утверждающей, что для каждого аналита (важную роль играет, прежде всего, его атомная масса) и, конечно, состава раствора оптимальная скорость своя. В дополнение к этому, следует отметить и незначительное сокращение доли оксидных и двукратно заряженных ионов при пониженных значениях этой характеристики (до 0,6 – 0,7% при 1,00 л/мин).

С точки зрения нивелирования неспектральных помех, свое подтверждение находит предположение о необходимости именно уменьшения скорости потока аргона через распылитель (**рис. 6**). Однако, как и при оптимизации мощности генератора, полностью устранить влияние компонентов анализируемого раствора для всех элементов можно только в случае глицина (**рис. 6 б**). При этом для каждой конкретной матрицы существует такое значение этого параметра, при котором разделение элементов на группы по ПИ исчезает. Такой величиной для сред 0,4% NaCl, 9 г/л



**Рис. 6.** Зависимости величин  $R$  для элементов с ПИ < 9,0 эВ (синий цвет) и  $\geq 9,0$  эВ (красный цвет) от скорости потока аргона через распылитель при выбранной мощности и фиксированных остальных параметрах, зарегистрированные в средах: а – 0,4 % растворе NaCl, б – 8 г/л растворе глицина, в – 9 г/л растворе карбамида, г – 15 об.% HNO<sub>3</sub> (n = 3, P = 0,95)

карбамида и 15 об.%  $\text{HNO}_3$  является скорость потока аргона через распылитель, равная 1,00 л/мин, а для 8 г/л глицина – 1,20 л/мин (обозначено окружностью). 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 более эффективной ионизации элементов с относительно высоким ПИ при анализе растворов сложного состава и подавлению ион-электронной рекомбинации таких аналитов в присутствии легко ионизируемых элементов.

Тем не менее, ввиду того, что чувствительность определения с уменьшением рассматриваемого параметра снижается, в качестве «устойчивой» в дальнейших экспериментах была выбрана пограничная скорость потока аргона через распылитель, при которой для всех матриц уже отсутствует дифференциация элементов (1,00 л/мин). Интенсивности абсолютных сигналов аналитов в этом случае уменьшаются всего в 2 – 3 раза, что несоизмеримо меньше для некоторых изотопов, чем при 0,80 л/мин (4 – 15 раз).

### **3.2.1.3. Варьирование глубины отбора пробы**

Значение глубины отбора пробы, а точнее расстояния между катушкой индуктивности и отверстием сэмплера, в устранении неспектральных помех оценивается, как упомянуто в обзоре литературы (п. 1.2.2. Главы 1), неоднозначно. Оттого изучение ее влияния на правильность результатов определения приобретает особый интерес в рамках данной работы. При «устойчивых» значениях мощности (1450 Вт) и скорости потока аргона через распылитель (1,00 л/мин) эту характеристику изменяли в диапазоне от 4 до 20 мм с шагом 4 мм.

Результаты изучения зависимости чувствительности определения аналитов от величины глубины отбора пробы показывают, что переход от оптимизированного программой Autotune значения данного параметра (8 мм) к меньшему расстоянию (4 мм) способствует резкому в 3 – 4 раза росту интенсивностей сигналов всех элементов вне зависимости от матрицы, впрочем, как и увеличению процента оксидных ионов. В то же самое время установление больших, чем оптимальная, глубин отбора (16 и 20 мм) приводит к 5-кратному снижению чувствительности и росту вероятности самогашения плазмы (согласно данным производителя масс-спектрометра).

Ввиду того, что при выбранных ранее значениях мощности и скорости потока

аргона через распылитель интенсивности абсолютных сигналов и так занижена в 2 – 3 раза, увеличение чувствительности за счет уменьшения глубины отбора пробы можно было бы считать удачным решением. Однако, как видно из графиков, представленных на **рис. 7**, при расстояниях между катушкой и сэмплером меньше 8 мм значения величины **R** для элементов с относительно высоким ПИ дополнительно падают на несколько процентов (вплоть до 10% при 4 мм) в случае матриц 0,4% NaCl и 15 об.% HNO<sub>3</sub> (**рис. 7 а и г**), что ставит под сомнение целесообразность такой оптимизации. Возможно, это происходит за счет того, что при уменьшении расстояния отбор ионов происходит из области плазмы с меньшей температурой, что сказывается на степени ионизации элементов с высоким ПИ.

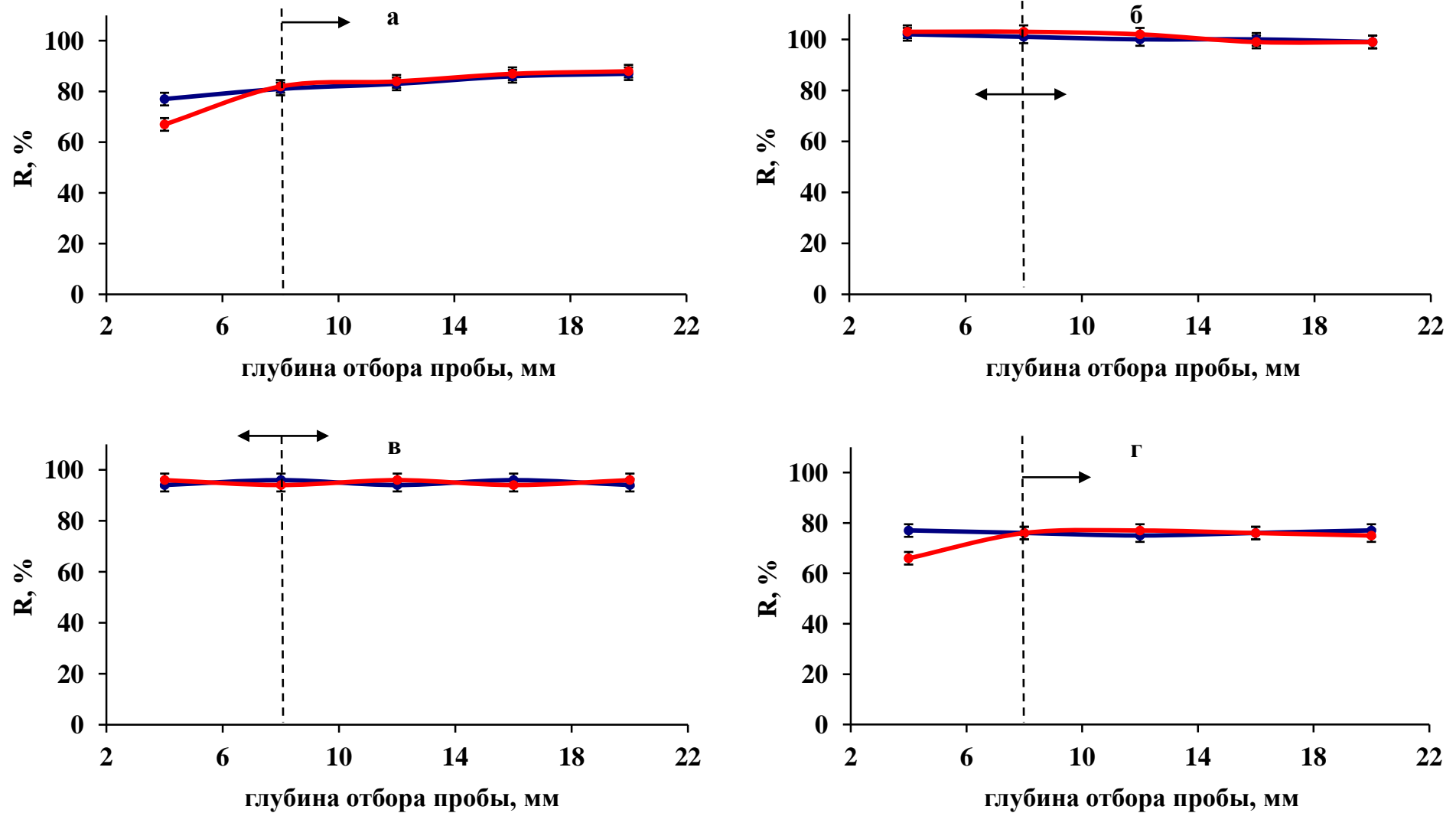
В связи с вышесказанным, исходя из необходимости сохранения одинакового поведения всех аналитов и чувствительности определения, было принято решение не изменять установленное автоматически значение глубины отбора (8 мм).

#### 3.2.1.4. Варьирование потенциала на линзе-экстракторе

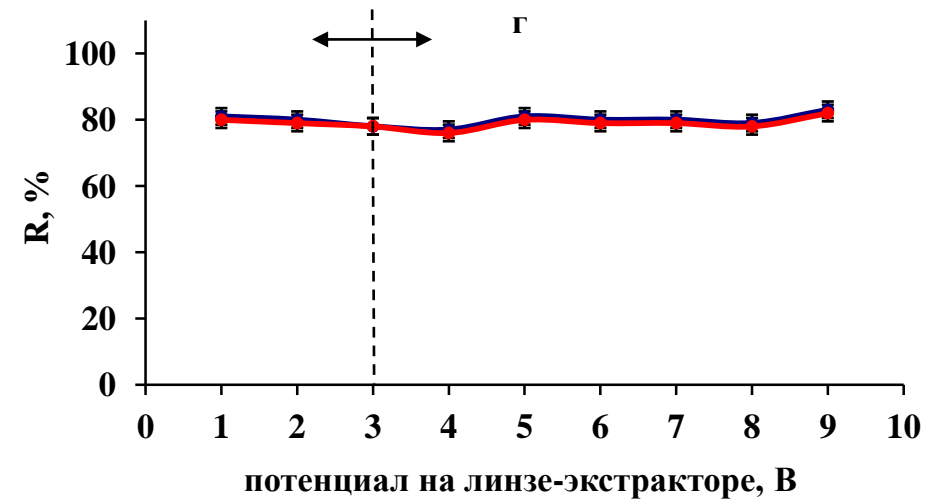
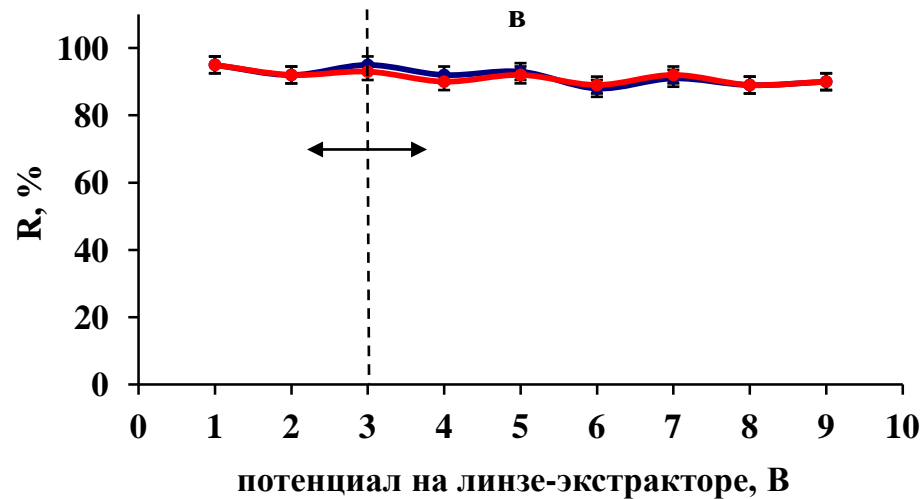
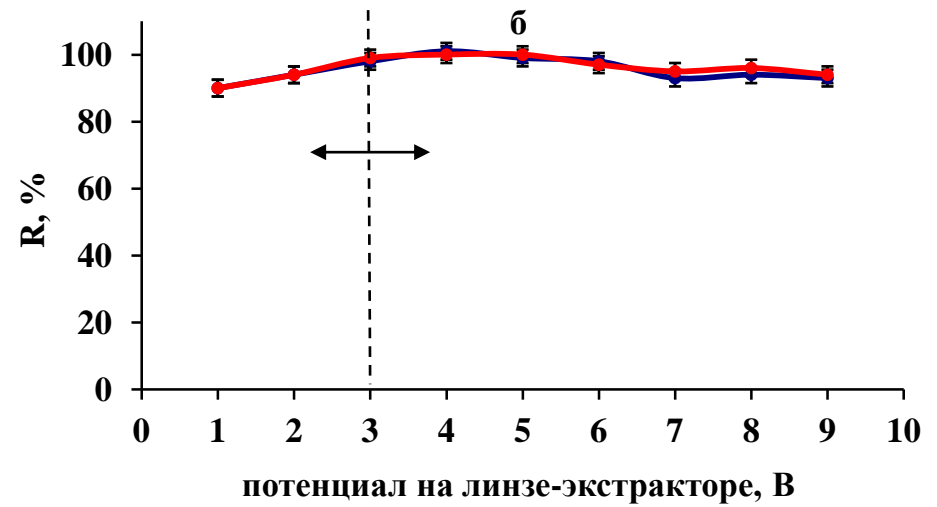
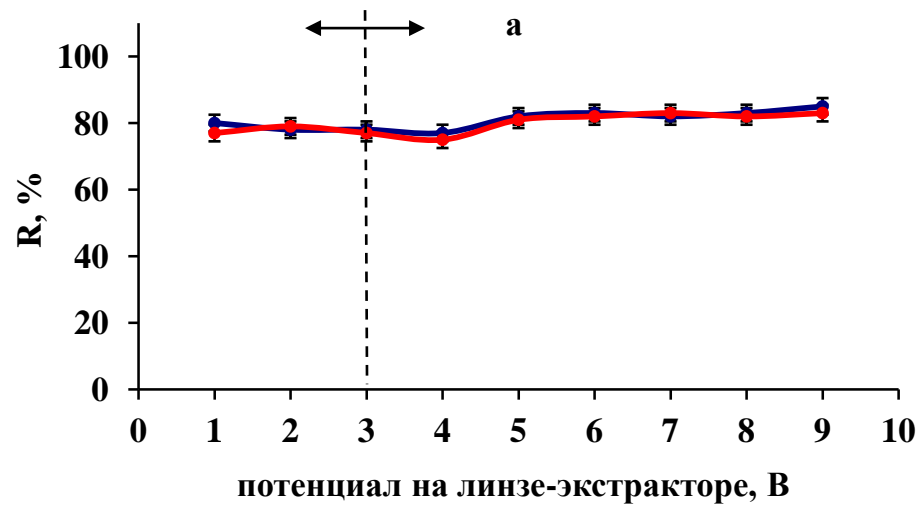
Аналогичное предыдущему исследованию было проведено и для другой, также спорной с точки зрения роли в минимизации неспектральных матричных помех характеристики – потенциала на линзе-экстракторе. В связи с тем, что при установлении отрицательных значений этой величины (вплоть до максимально возможных -200 В), интенсивности абсолютных сигналов всех определяемых элементов только снижались, потенциал на линзе-экстракторе варьировали в пределах от 0 до 10 В. Это противоречит рекомендациям, найденным в литературе (п. 1.2.2. Главы 1).

Результаты исследования показывают, что изменение потенциала во всем указанном диапазоне никаким образом не влияет на значения величины **R** для всех рассматриваемых элементов при анализе любой матрицы (**рис. 8**). Однако при этом наблюдается значительный (в сторону более положительных на 2 – 3 В потенциалов) сдвиг максимума зависимости интенсивности абсолютного сигнала. В качестве примера на **рис. 9** приведены подобные графики для элементов с отличающимися ПИ Mn и Se, определение которых проводили в среде 15 об.% HNO<sub>3</sub>. В случае остальных аналитов в этой же или других матрицах обнаруженные закономерности схожи. Таким образом, становится очевидной целесообразность дополнительной оптимизации потенциала на линзе-экстракторе с целью повышения чувствительности в 1,5 – 2 раза.

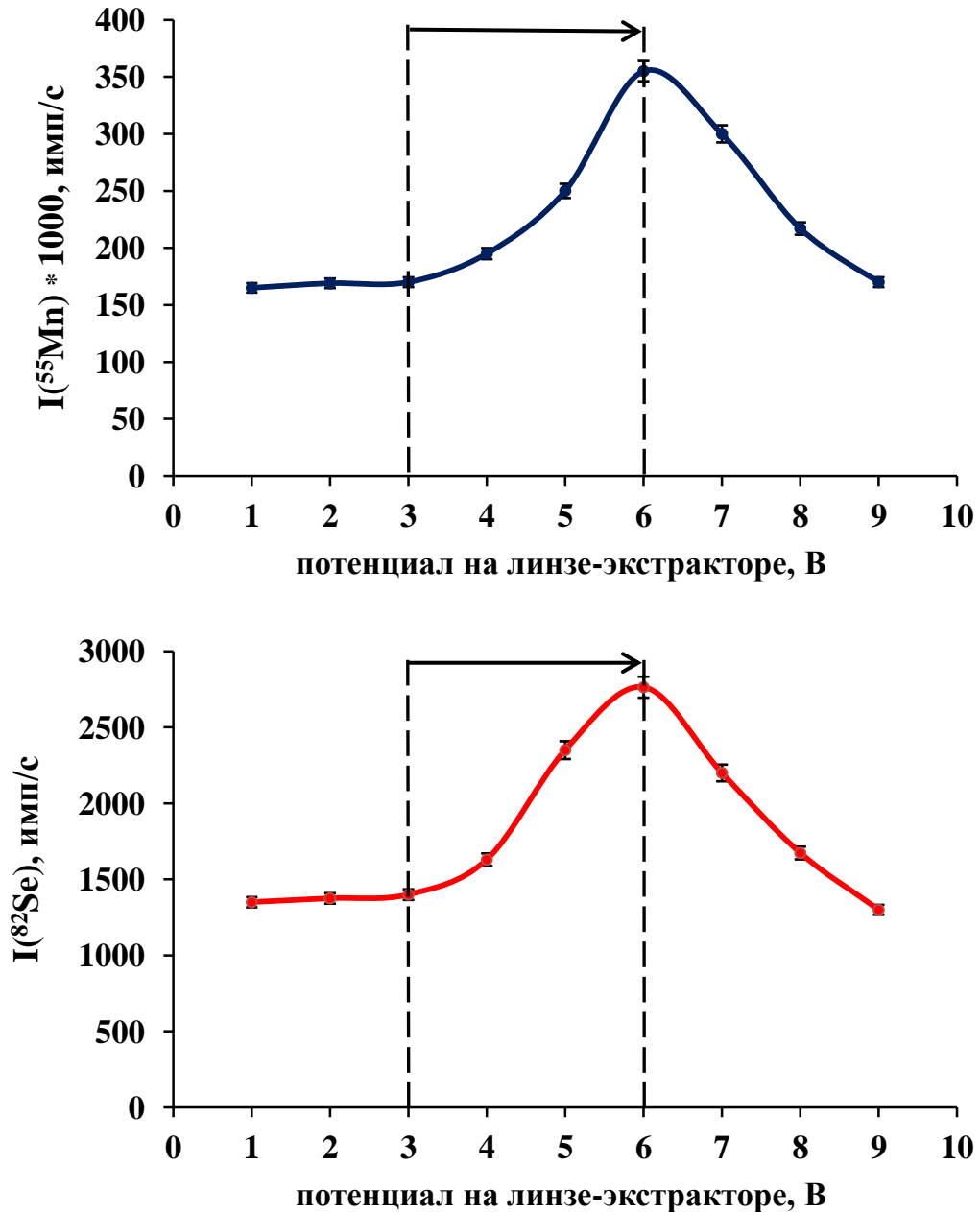




**Рис. 7.** Зависимости величин  $R$  для элементов с ПИ  $< 9,0$  эВ (синий цвет) и  $\geq 9,0$  эВ (красный цвет) от глубины отбора пробы при выбранных мощности, скорости потока аргона и фиксированных остальных параметрах, зарегистрированные в средах:  
**а** – 0,4 % растворе NaCl, **б** – 8 г/л растворе глицина, **в** – 9 г/л растворе карбамида, **г** – 15 об.%  $\text{HNO}_3$  ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )



**Рис. 8.** Зависимости величин  $R$  для элементов с ПИ < 9,0 эВ (синий цвет) и  $\geq$  9,0 эВ (красный цвет) от потенциала на линзе-экстракторе при выбранных мощности, скорости потока аргона и глубине отбора пробы, зарегистрированные в средах: а – 0,4 % растворе NaCl, б – 8 г/л растворе глицина, в – 9 г/л растворе карбамида, г – 15 об.% HNO<sub>3</sub> (n = 3, P = 0,95)



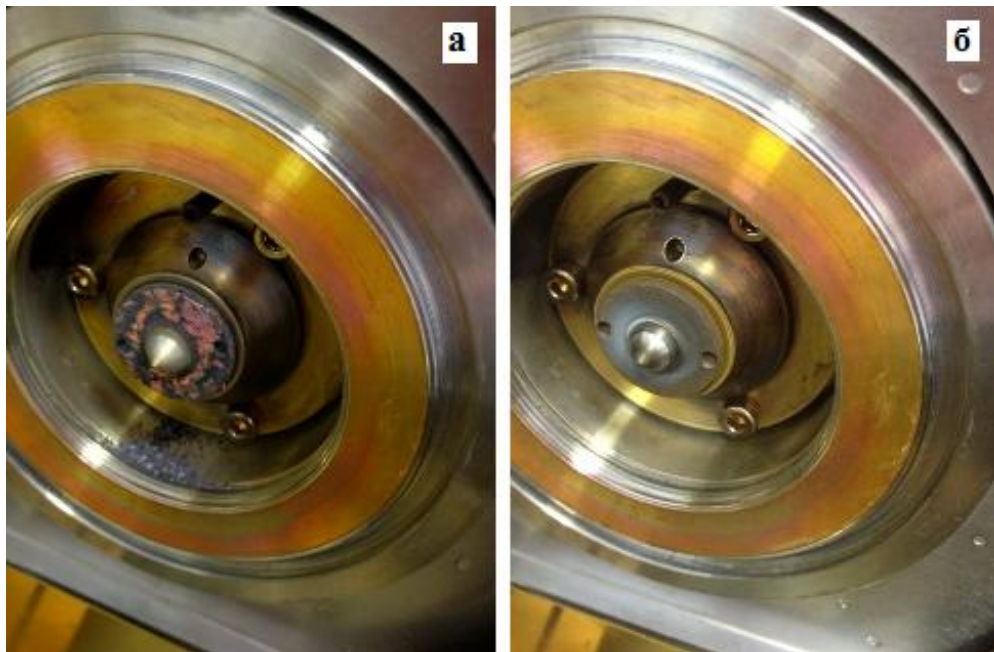
**Рис. 9.** Зависимости интенсивностей абсолютных сигналов <sup>55</sup>Mn (синий цвет) и <sup>82</sup>Se (красный цвет) от потенциала на линзе-экстракторе в растворе 15 об.% HNO<sub>3</sub> (n = 3, P = 0,95)

### 3.2.1.5. Исследование влияния добавки кислорода в основной поток аргона

В обзоре литературы уже упоминалось, что к явным недостаткам простого разбавления биологических жидкостей следует отнести возможность блокировки и закупорки распылителя, инжектора горелки и отверстий сэмплера и скиммера (п. 1.1.1. Главы 1) компонентами матрицы пробы. В нашей практике, особенно ярко при определении элементов в разбавленных образцах цельной крови проявилось загрязнение

именно конусов интерфейса сажей, образуемой при неполном сгорании органических веществ, содержащихся в растворе. После анализа всего 25 – 30 подобных проб наблюдается значительное отложение углерода на поверхности скиммера (**рис. 10 а**). Так как одним из возможных технических решений этой проблемы является добавление кислорода в основной поток газа (п. **1.1.1.** и **1.2.3.** Главы **1**), изучали влияние присутствия 1 – 5 %  $O_2$  в аргоне не только и не столько на состояние конусов, сколько на величины сигналов, а также способность минимизировать неспектральные помехи в обоих режимах измерения – «стандартном» и режиме «устойчивых» параметров.

Результаты исследования подтверждают рентабельность применения такого подхода для продления срока службы саплера и скиммера при добавлении всего 1 – 2% кислорода (**рис. 10 б**). При этом во всем рассматриваемом диапазоне изменение состава основного газового потока не оказывает какого-либо заметного влияния ни на интенсивности абсолютных сигналов, ни на значения величин **R**, ни, что самое важное, на степень образования оксидных ионов. Действительно, в обоих режимах изменения показатель  $CeO^+/Ce^+$  не превышает 1,0%. Таким образом, наличие  $O_2$  в плазме в указанных количествах дополнительно не изменяет ее характеристик.



**Рис. 10.** Состояние скиммера после анализа 25 – 30 проб разбавленной цельной крови без использования (**а**) и с использованием (**б**) 2% добавки кислорода

Другими словами, в ходе поиска «устойчивых» значений операционных параметров была действительно подтверждена главенствующая роль в минимизации неспектральных помех скорости потока аргона через распылитель. Ее снижение способствует не только нивелированию влияния компонентов матрицы, но и устранению различия между элементами по ПИ. Последнее является косвенным подтверждением того, что доминирующей, если не единственной причиной подавления сигналов непосредственно в плазме является изменение распределения температуры по оси плазмы и/или ее максимального значения. При этом среди основных механизмов, оказывающих воздействие, следует назвать уменьшение эффективности ионизации элементов и увеличение роли ион-электронной рекомбинации. Кроме этого, было установлено ключевое значение дополнительной оптимизации потенциала на линзе-экстракторе для повышения чувствительности определения, которая существенно падает при задании низких скоростей потока аргона. При данной конфигурации и конструкции масс-спектрометра переход к более положительным напряжениям позволяет практически полностью скомпенсировать этот эффект. Однако полного устранения влияния матрицы на результаты анализа таким способом добиться все же не удается.

### **3.2.1.6. Замена распылителя Бабингтона на концентрический распылитель**

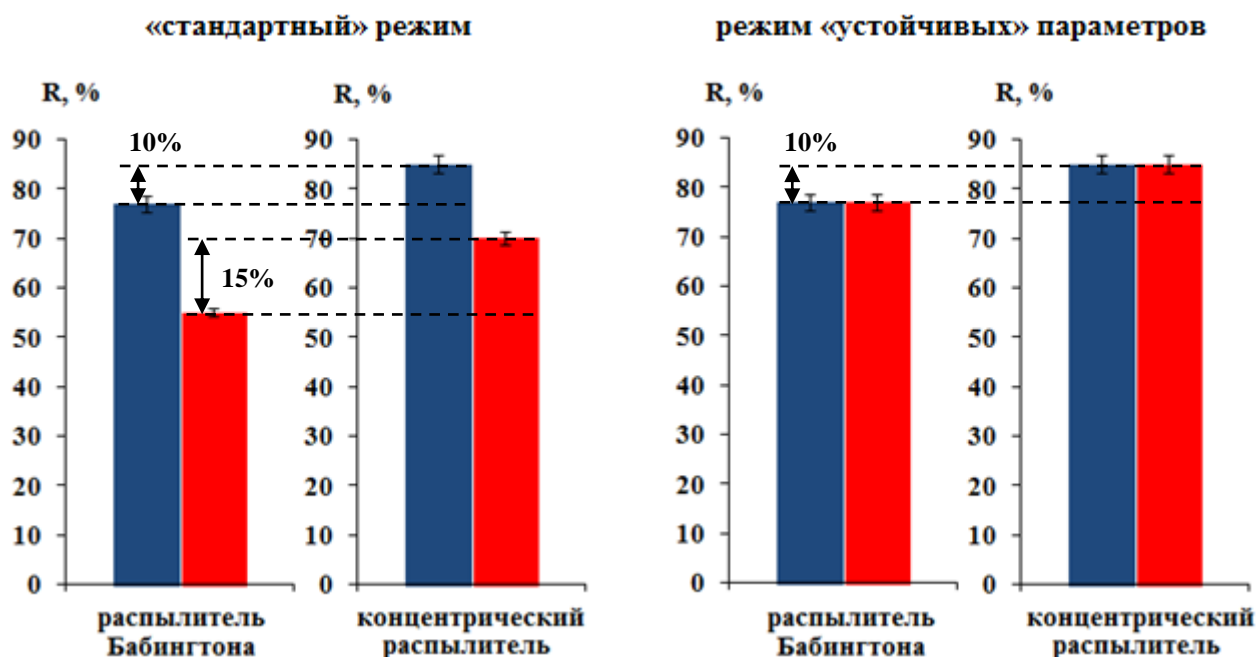
До сих пор все эксперименты проводили с применением распылителя Бабингтона, универсального с точки зрения анализа высокосолевых или вообще содержащих большое количество матричных компонентов растворов и поэтому подходящего для определения элементов как после простого разбавления, так и после окислительной минерализации. Однако как следует из обзора литературы, независимо от способа пробоподготовки наиболее популярным в клинической практике является все-таки концентрический распылитель (п. 1.1. Главы 1), что вызывает некоторое недоумение ввиду повышенной вероятности его закупорки из-за меньшего диаметра отверстий. Это должно приводить к дополнительным техническим неудобствам. Тем не менее, в данной работе было произведено сравнение возможностей нивелирования неспектральных помех при использовании этих двух распылителей.

Результаты проведенной аналогичным образом оптимизации параметров работы масс-спектрометра для всех четырех матриц с применением концентрического распылителя подтверждают все описанные выше закономерности. Из данных, представленных в **табл. 15**, видно, что значения операционных настроек прибора отличаются в обоих режимах измерения для двух распылителей только по скоростям потока аргона через распылитель, и то незначительно, всего на 0,05 л/мин.

**Таблица 15.** Сравнение значений операционных параметров работы масс-спектрометра при использовании различных распылителей в двух режимах

Режим	Параметр	Распылитель Бабингтона	Концентрический распылитель
«стандартный»	мощность генератора	1450 Вт	1450 Вт
	<b>скорость потока аргона</b>	<b>1,20 л/мин</b>	<b>1,15 л/мин</b>
	глубина отбора пробы	8 мм	8 мм
	потенциал на линзе-экстракторе	3 В	3 В
«устойчивые» параметры	мощность генератора	1450 Вт	1450 Вт
	<b>скорость потока аргона</b>	<b>1,00 л/мин</b>	<b>0,95 л/мин</b>
	глубина отбора пробы	8 мм	8 мм
	потенциал на линзе-экстракторе	6 В	6 В

При этом использование концентрического распылителя позволяет более эффективно (в среднем на 10 – 15%) минимизировать неспектральные помехи (**рис. 11**). Такое поведение может быть обусловлено меньшей в силу конструкционных особенностей этого распылителя загрузкой плазмы компонентами матрицы анализируемого раствора и, как следствие, также меньшим их влиянием на распределение температуры по оси плазмы и ее максимальное значение. Тем не менее, так как полного устранения рассматриваемых эффектов и в этом случае добиться не удастся, учитывая также ранее упомянутую уязвимость распылителя к вводу растворов с высоким содержанием солей и органических веществ, от его дальнейшего применения отказались. При этом на следующем этапе работы основное внимание уделяли выбору подходящих внутренних стандартов в обоих режимах.



**Рис. 11.** Сравнение возможностей устранения влияния 15 об.%  $\text{HNO}_3$  для элементов с ПИ < 9,0 эВ (синий цвет) и  $\geq 9,0$  эВ (красный цвет) при использовании различных распылителей в двух режимах ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

### 3.2.2. Выбор внутренних стандартов в двух режимах работы масс-спектрометра

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 несектральных 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 (п. 1.3. Главы 1), наиболее часто в качестве ВС выбирают элементы с близкими аналиту атомными массами 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 (табл. 16, ВС выделены жирным шрифтом).

**Таблица 16.** Значения первых потенциалов ионизации и атомных масс элементов

Элемент	ПИ, эВ [190]	Атомная масса, а.е.м.
<b>Be</b>	<b>9,3</b>	<b>9,0</b>
<b>P</b>	10,5	31,0
<b>Mn</b>	7,4	54,9
<b>Co</b>	<b>7,9</b>	<b>58,9</b>
<b>Cu</b>	7,7	63,5
<b>Zn</b>	9,4	65,4
<b>Ga</b>	6,0	69,7
<b>As</b>	<b>9,8</b>	<b>74,9</b>
<b>Se</b>	9,8	79,0
<b>Rh</b>	<b>7,5</b>	<b>102,9</b>
<b>Cd</b>	9,0	112,4
<b>Pt</b>	9,0	195,1
<b>Pb</b>	7,4	207,2
<b>Bi</b>	<b>7,3</b>	<b>209,0</b>

Из данных, представленных в табл. 17, следует, что при работе в «стандартном» режиме значение атомной массы ВС не может являться критерием выбора внутреннего стандарта: самые очевидные случаи невыполнения этого правила обозначены закрашенными цветом ячейками. В то же самое время полное устранение влияния компонентов матрицы осуществимо за счет подбора ВС, исходя из значений ПИ. Действительно, минимальные и несущественно отличающиеся от 0 значения величина  $\Delta R^*$  принимает только в случае близости потенциалов ионизации аналита и ВС (обозначено соответствующими цветами). При переходе же к режиму «устойчивых» параметров критерий выбора внутреннего стандарта совсем упрощается. В этом случае в качестве ВС может выступать один единственный элемент, и что самое главное, независимо от его атомной массы и ПИ. Описанные закономерности наиболее ярко прослеживаются на примере матриц 0,4% NaCl и 15 об.% HNO<sub>3</sub>.

Вероятнее всего, влияние компонентов анализируемых растворов на результаты определения необходимо рассматривать не с одной стороны, учитывая только процессы,



**Таблица 17.** Значения величин  $\Delta R^*$  для исследуемых элементов при использовании различных ВС в обоих режимах работы прибора ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

матрица – 0,4% NaCl

«стандартный» режим					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	<b>2</b>	-23	<b>-1</b>	-20	-19
<b>Mn</b>	17	<b>3</b>	20	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Co</b>	20	–	18	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Cu</b>	19	<b>-3</b>	18	<b>0</b>	<b>3</b>
<b>Zn</b>	<b>-5</b>	<b>-25</b>	<b>5</b>	-20	-20
<b>Ga</b>	20	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>As</b>	<b>3</b>	-20	–	-17	-18
<b>Se</b>	<b>4</b>	-23	<b>4</b>	-18	-19
<b>Cd</b>	<b>3</b>	-19	<b>0</b>	<b>-16</b>	-20
<b>Pt</b>	<b>-2</b>	-18	<b>-1</b>	-17	<b>-20</b>
<b>Pb</b>	15	<b>4</b>	20	<b>3</b>	<b>2</b>

«устойчивые» параметры					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	5	-3	3	-3	3
<b>Mn</b>	3	1	-2	2	-1
<b>Co</b>	-4	–	3	-1	3
<b>Cu</b>	2	-3	0	2	2
<b>Zn</b>	3	-3	-5	3	-4
<b>Ga</b>	0	-1	2	1	3
<b>As</b>	2	2	–	2	2
<b>Se</b>	3	-5	3	-3	1
<b>Cd</b>	1	-3	-1	0	0
<b>Pt</b>	0	2	0	1	0
<b>Pb</b>	-1	3	-4	-1	-1

матрица – 15 об.% HNO<sub>3</sub>

«стандартный» режим					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	<b>-3</b>	-30	<b>3</b>	-26	-32
<b>Mn</b>	35	<b>2</b>	40	<b>3</b>	<b>-3</b>
<b>Co</b>	37	–	42	<b>1</b>	<b>-2</b>
<b>Cu</b>	33	<b>-2</b>	40	<b>-1</b>	<b>2</b>
<b>Zn</b>	<b>-3</b>	<b>-30</b>	<b>-5</b>	-27	-37
<b>Ga</b>	35	<b>0</b>	<b>42</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>As</b>	<b>-2</b>	-27	–	-25	-30
<b>Se</b>	<b>2</b>	-33	<b>-3</b>	-23	-33
<b>Cd</b>	<b>1</b>	-25	<b>4</b>	<b>-26</b>	-31
<b>Pt</b>	<b>0</b>	-27	<b>1</b>	-25	<b>-30</b>
<b>Pb</b>	35	<b>1</b>	44	<b>1</b>	<b>3</b>

«устойчивые» параметры					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	3	-2	1	2	-1
<b>Mn</b>	2	1	2	3	1
<b>Co</b>	3	–	1	3	-2
<b>Cu</b>	-1	0	1	2	0
<b>Zn</b>	3	-3	-2	-1	-3
<b>Ga</b>	0	0	-1	0	1
<b>As</b>	3	-1	–	1	2
<b>Se</b>	1	1	1	2	-2
<b>Cd</b>	2	-3	1	-1	1
<b>Pt</b>	0	2	-1	2	0
<b>Pb</b>	1	-1	0	2	1

**Таблица 17.** Значения величин  $\Delta R^*$  для исследуемых элементов при использовании различных ВС в обоих режимах работы прибора ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

матрица – 8 г/л глицина

«стандартный» режим					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	3	-2	1	-3	2
<b>Mn</b>	-1	1	2	1	3
<b>Co</b>	3	–	1	0	3
<b>Cu</b>	2	0	1	-3	2
<b>Zn</b>	-2	3	-2	3	-1
<b>Ga</b>	3	0	-1	-1	0
<b>As</b>	2	-1	–	2	1
<b>Se</b>	1	1	1	-5	2
<b>Cd</b>	0	-3	1	-3	-1
<b>Pt</b>	0	2	-1	2	2
<b>Pb</b>	-1	-1	0	3	2

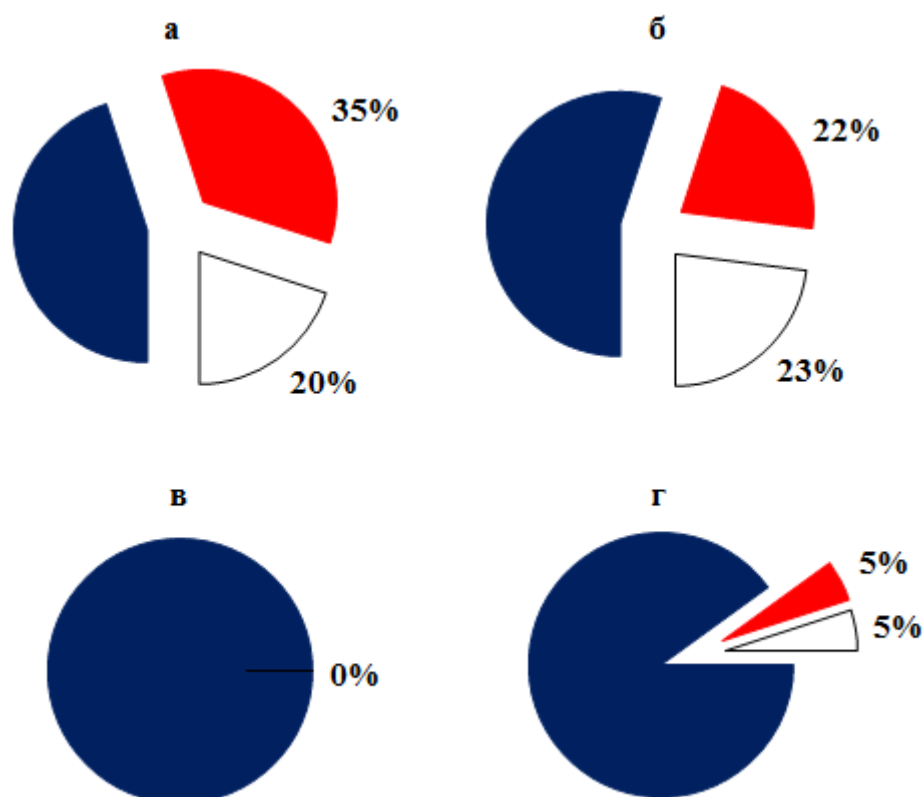
«устойчивые» параметры					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	3	2	1	-1	-1
<b>Mn</b>	-1	1	2	0	1
<b>Co</b>	3	–	1	-3	0
<b>Cu</b>	2	2	1	2	2
<b>Zn</b>	-2	1	-3	-1	-1
<b>Ga</b>	1	0	-1	2	3
<b>As</b>	2	2	–	3	-1
<b>Se</b>	1	-2	1	-1	2
<b>Cd</b>	0	1	-1	2	-3
<b>Pt</b>	2	0	-1	3	2
<b>Pb</b>	-1	-1	0	0	-1

матрица – 9 г/л карбамида

«стандартный» режим					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	<b>3</b>	-7	<b>2</b>	-7	-6
<b>Mn</b>	9	<b>0</b>	8	<b>1</b>	<b>-1</b>
<b>Co</b>	9	–	9	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Cu</b>	9	<b>-1</b>	10	<b>-2</b>	<b>0</b>
<b>Zn</b>	<b>3</b>	-7	<b>-2</b>	-7	-8
<b>Ga</b>	11	<b>2</b>	9	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>As</b>	<b>2</b>	-6	–	-8	-7
<b>Se</b>	<b>-3</b>	-7	<b>3</b>	-8	-5
<b>Cd</b>	<b>0</b>	-6	<b>-2</b>	-6	-6
<b>Pt</b>	<b>1</b>	-6	<b>2</b>	-5	<b>-7</b>
<b>Pb</b>	9	<b>0</b>	10	<b>2</b>	<b>0</b>

«устойчивые» параметры					
	$\Delta R^*$ , %				
	Be	Co	As	Rh	Bi
<b>P</b>	-3	2	3	2	1
<b>Mn</b>	2	0	-3	3	2
<b>Co</b>	2	–	-4	1	2
<b>Cu</b>	3	1	-2	-2	3
<b>Zn</b>	1	-1	-1	3	1
<b>Ga</b>	2	2	0	1	2
<b>As</b>	4	4	–	3	4
<b>Se</b>	4	5	3	3	5
<b>Cd</b>	0	-2	-2	-2	0
<b>Pt</b>	1	-3	0	2	3
<b>Pb</b>	-2	-1	1	3	1

происходящие непосредственно в плазме (испарение, атомизация, ионизация), а с двух, сторон, принимая во внимание также и процессы, протекающие в системе ввода образца (поступление пробы в распылитель, образование и транспортировка аэрозолей). Так как последние 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 первыми 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. 12**, они вполне соизмеримы или даже равнозначны.



**Рис. 12.** Распределение вкладов в занижение сигнала по природе происхождения: подавление за счет процессов, происходящих в системе ввода пробы (белый цвет) и непосредственно в плазме (красный цвет) - в матрицах 0,4% NaCl (**а**), 15 об.% HNO<sub>3</sub> (**б**), 8 г/л глицина (**в**) и 9 г/л карбамида (**г**) ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

При этом обнаруженное в работе отсутствие хоть какого-либо влияния на результаты определения еще одного вида процессов, характерных для МС-ИСП: экстракция ионов из плазмы, формирование первичного ионного пучка и его изменение в интерфейсе и высоковакуумной части прибора – можно объяснить конструкционными особенностями ионной оптики используемого масс-спектрометра – Agilent 7500с.

\* \* \*

Таким образом, в ходе данного исследования было установлено, что в «стандартном» режиме работы масс-спектрометра при учете всех возможных спектральных интерференций, используя градуировку без подбора матрицы, после как прямого разбавления, так и окислительной минерализации биологических жидкостей правильное определение всего исследуемого набора элементов 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, выступающего в роли внутреннего стандарта непринципиальна, а значит, возможно сокращение набора применяемых ВС до одного единственного. Последний подход особенно прост в исполнении, что важно для клинической практики. Поэтому именно его дальнейшее использование считается целесообразным. При этом для продления срока службы систем ввода и интерфейса без дополнительной их очистки применяли распылитель Бабингтона и осуществляли 2% добавку кислорода в основной поток аргона.

### **3.2.3. Проверка эффективности разработанной стратегии для анализа биологических жидкостей после различной пробоподготовки**

Так как до сих пор все заключения были сделаны только на примере анализа модельных растворов, на следующем этапе работы потребовалось подтверждение эффективности применения выбранного подхода в случае реальных проб.

Для этого определение рассматриваемых элементов осуществляли в стандартных образцах сравнения цельной крови и мочи «Serorm Trace Elements Whole Blood, Level 2» и «Serorm Trace Elements Urine, Level 2» как после разбавления смесью А, так и после окислительной минерализации согласно методикам 2.3.3.1. и 2.3.3.3. Главы 2, соответственно. При этом в качестве ВС использовали все тот же Rh. Ввиду того, что

содержание фосфора в этих образцах не аттестовано, а приведено лишь для справки, его значение дополнительно определяли спектрофотометрическим методом по методике **2.3.4.** Главы **2.** Как и ранее в пробы также вводили добавки галлия и платины, соответствующие концентрациям 100 мкг/л.

Из результатов, представленных в **табл. 18** и **19**, видно, что наблюдается хорошее совпадение между найденными после различной пробоподготовки и аттестованными значениями содержаний всех элементов в рамках погрешности измерения. Причем, рассчитанные пределы обнаружения (ПО) не превышают минимальных концентраций аналитов в данных образцах (**табл. 1**), что позволяет применять этот подход для всего диапазона. Последнее обстоятельство обусловлено тем, что при поиске «устойчивых» значений операционных параметров была произведена дополнительная оптимизация потенциала на линзе-экстракторе, позволившая практически полностью скомпенсировать падение чувствительности определения при понижении скорости потока аргона через распылитель. Относительные стандартные отклонения ( $s_r$ ) получаемых результатов в целом выше при окислительной минерализации, что, вероятнее всего, связано с большей в этом случае кратностью разбавления проб, которая приводит к необходимости определения меньших концентраций.

Дополнительно аналогичное исследование было проведено и для порошкообразных, невосстанавливаемых полностью до жидкой цельной крови стандартных образцов сравнения РТ-WB1 и IAEA-A-13 (**табл. 20**), а также стандартного образца сравнения мочи другого производителя (**табл. 21**). Было подтверждено, что предложенная для использования комбинация режима «устойчивых» параметров и единственного ВС действительно позволяет из одного раствора независимо от пробоподготовки правильно определять содержания элементов с различными потенциалами ионизации и атомными массами без подбора матрицы градуировочных растворов.

Схожие (ничем кардинально не отличающиеся) результаты были получены и для другого подхода к устранению неспектральных помех – измерение в «стандартном» режиме при использовании нескольких ВС, подобранных исходя из близости ПИ. Таким образом, была доказана их равнозначность при анализе реальных биологических жидкостей.

**Таблица 18.** Результаты анализа стандартного образца сравнения цельной крови «Seronorm Trace Elements Whole Blood, Level 2», полученные в режиме «устойчивых» параметров и ВС Rh после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Найдено после разбавления			Найдено после минерализации			Аттестовано	
	концентрация, мкг/л	s <sub>r</sub> , %	ПО, мкг/л	концентрация, мкг/л	s <sub>r</sub> , %	ПО, мкг/л	средняя концентрация, мкг/л	допустимый интервал концентраций, мкг/л
<b>P*</b>	190 ± 10	2,0	0,03	195 ± 15	3,0	0,04	<b>191</b>	-
<b>Mn</b>	30 ± 1	1,3	0,07	26 ± 1	1,5	0,1	<b>29,9</b>	17,9 – 41,9
<b>Co</b>	5,9 ± 0,3	2,0	0,02	5 ± 1	8,0	0,04	<b>5,8</b>	3,5 – 8,1
<b>Cu</b>	1450 ± 50	1,4	0,2	1480 ± 90	2,4	0,3	<b>1330</b>	790 – 1870
<b>Zn</b>	6400 ± 200	1,3	0,3	6750 ± 350	2,1	1	<b>6500</b>	5800 – 7200
<b>Ga**</b>	101 ± 3	1,2	0,01	99 ± 4	1,6	0,08	<b>100</b>	-
<b>As</b>	16 ± 2	5,0	0,1	16 ± 3	7,6	0,2	<b>14,3</b>	8,5 – 20,1
<b>Se</b>	120 ± 5	1,7	1	100 ± 10	4,0	2	<b>112</b>	66 – 158
<b>Cd</b>	5,5 ± 0,2	1,5	0,03	5,4 ± 0,6	4,5	0,04	<b>5,8</b>	5,4 – 6,2
<b>Pt**</b>	99 ± 3	1,2	0,01	100 ± 4	1,6	0,02	<b>100</b>	-
<b>Pb</b>	330 ± 10	1,2	0,2	320 ± 15	1,9	0,3	<b>310</b>	186 – 434

\* – концентрации в мг/л

\*\* – добавка элемента, эквивалентная **100 мкг/л**

**Таблица 19.** Результаты анализа стандартного образца сравнения мочи «Seronorm Trace Elements Urine, Level 2», полученные в режиме «устойчивых» параметров и ВС Rh после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Найдено после разбавления			Найдено после минерализации			Аттестовано	
	концентрация, мкг/л	s <sub>r</sub> , %	ПО, мкг/л	концентрация, мкг/л	s <sub>r</sub> , %	ПО, мкг/л	средняя концентрация, мкг/л	допустимый интервал концентраций, мкг/л
<b>P*</b>	530 ± 15	1,1	0,03	550 ± 20	1,5	0,04	<b>543</b>	–
<b>Mn</b>	11,2 ± 0,5	1,8	0,1	11,1 ± 0,4	1,6	0,1	<b>10,9</b>	6,5 – 15,3
<b>Co</b>	11 ± 1	3,7	0,03	11 ± 2	7,3	0,05	<b>10,6</b>	6,4 – 14,8
<b>Cu</b>	23 ± 1	1,8	0,3	23 ± 2	3,5	0,4	<b>22</b>	–
<b>Zn</b>	1270 ± 30	1,0	0,4	1260 ± 50	1,6	1	<b>1338</b>	800 – 1876
<b>Ga**</b>	99 ± 3	1,0	0,01	100 ± 3	1,2	0,07	<b>100</b>	–
<b>As</b>	185 ± 10	2,2	0,1	185 ± 15	3,3	0,2	<b>184</b>	110 – 258
<b>Se</b>	75 ± 6	3,2	1	70 ± 6	3,5	2,5	<b>70,1</b>	41,9 – 98,3
<b>Cd</b>	5,0 ± 0,4	3,2	0,02	5 ± 1	8,1	0,06	<b>4,9</b>	4,4 – 5,4
<b>Pt**</b>	100 ± 3	1,2	0,01	100 ± 3	1,2	0,03	<b>100</b>	–
<b>Pb</b>	89 ± 4	1,8	0,1	90 ± 5	2,2	0,4	<b>90,7</b>	54,1 – 127,3

\* – концентрации в мг/л

\*\* – добавка элемента, эквивалентная **100 мкг/л**

**Таблица 20.** Результаты анализа стандартных образцов сравнения крови PT-WB1 и IAEA-A-13, полученные в режиме «устойчивых» параметров и BC Rh (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Концентрация, мг/кг				
	PT-WB1		IAEA-A-13		
	Найдено	Аттестовано	Найдено	Аттестовано	
				среднее	интервал
<b>P</b>	–	–	950±80	<b>940</b>	690 – 1120
<b>Cu</b>	2,0 ± 0,2	<b>2,1 ± 0,3</b>	4,1 ± 0,2	<b>4,3</b>	3,7 – 4,8
<b>Zn</b>	32 ± 5	<b>34 ± 4</b>	12,5 ± 0,6	<b>13</b>	12 – 14
<b>Se</b>	–	–	0,27 ± 0,05	<b>0,24</b>	0,15 – 0,31
<b>Cd</b>	0,003 ± 0,001	<b>0,003 ± 0,001</b>	–	–	–
<b>Pb</b>	0,17 ± 0,02	<b>0,16 ± 0,02</b>	0,17 ± 0,02	<b>0,18</b>	0,15 – 0,29

**Таблица 21.** Результаты анализа стандартного образца сравнения мочи «Urine Control lyophilized for Trace Elements Level II», полученные в режиме «устойчивых» параметров и BC Rh после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Концентрация, мкг/л			
	Найдено		Аттестовано	
	после разбавления	после минерализации	средняя	допустимый интервал
<b>Mn</b>	16,8 ± 0,3	17,0 ± 0,5	<b>16</b>	12 – 20
<b>Co</b>	36,2 ± 0,7	35 ± 1	<b>35</b>	29 – 41
<b>Cu</b>	116 ± 1	115 ± 2	<b>113</b>	95 – 131
<b>Zn</b>	550 ± 5	570 ± 10	<b>590</b>	510 – 670
<b>Ga*</b>	99 ± 1	99 ± 1	<b>100</b>	–
<b>As</b>	75 ± 1	70 ± 3	<b>73</b>	57 – 89
<b>Se</b>	68 ± 3	72 ± 2	<b>71</b>	53 – 84
<b>Cd</b>	15,3 ± 0,3	15 ± 1	<b>15</b>	12 – 18
<b>Pt*</b>	100 ± 2	99 ± 1	<b>100</b>	–
<b>Pb</b>	63 ± 2	60 ± 3	<b>60</b>	48 – 72

\* – добавка элемента, эквивалентная **100 мкг/л**



### 3.3. Исследование применимости подходов при анализе других матриц

С целью расширения круга объектов анализа была осуществлена оценка возможности применения предлагаемых подходов и по отношению к другим матрицам: волосам, подвергшимся обработке ТМАОН, УЗ или МВ окислительной минерализации, напрямую разбавленному или разложенному специализированному лечебному питанию, а также солянокислым и октанол-этанольным растворам (на примере платины). Подобные объекты выбраны не случайно, так как определение элементов в них является одной из типичных аналитических задач. При этом эффективность устранения неспектральных помех проверяли на примере использования более простого подхода – измерения в режиме «устойчивых» параметров с применением единственного ВС.

#### 3.3.1. Волосы, подвергшиеся обработке ТМАОН, УЗ или МВ минерализации

Анализ стандартного образца сравнения волос GBW07601 осуществляли после трех различных способов пробоподготовки, описанных в п. 2.3.3.2. и 2.3.3.3. Главы 2. Обработка пробы ТМАОН или УЗ экстракция элементов из него должны приводить к образованию совершенно других по составу матриц раствора, что позволяет оценить универсальность применения предложенного подхода для этого объекта исследования.

Было установлено (табл. 22), что вне зависимости от выбранного способа подготовки пробы, и, несмотря на то, что оптимизация параметров работы прибора проводилась по другим модельным растворам, удается правильно в пределах погрешности измерения определить все исследуемые аналиты, кроме фосфора и селена. Вероятнее всего, эти два элемента настолько сильно связаны со структурными компонентами волос, что не могут быть экстрагированы в достаточно мягких условиях – посредством ТМАОН или УЗ – и остаются в составе нерастворившегося остатка. В то время как окислительная минерализация дает адекватные совпадающие с аттестованными значениями результаты. Кроме того, еще раз было показано, что предложенный способ устранения неспектральных помех приводит к существенному упрощению методик анализа. Так, вместо рекомендованного в работе [184] подбора матрицы градуировочных растворов, а точнее добавления в них цистеина, имитирующего неразложившийся под действием ТМАОН кератин, в нашем случае используется простая внешняя градуировка в 1 об.%  $\text{HNO}_3$ .

**Таблица 22.** Результаты анализа стандартного образца сравнения волос GBW07601, полученные в режиме «устойчивых» параметров и ВС Rh после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Концентрация, мкг/г			
	Найдено			Аттестовано
	после обработки ТМАОН	после УЗ минерализации	после МВ минерализации	
<b>P</b>	–	–	165 ± 10	<b>170 ± 7</b>
<b>Mn</b>	6,2 ± 0,1	6,4 ± 0,7	6,0 ± 0,1	<b>6,3 ± 0,5</b>
<b>Co</b>	0,066 ± 0,003	0,067 ± 0,003	0,069 ± 0,003	<b>0,071 ± 0,008</b>
<b>Cu</b>	10,9 ± 0,1	12,0 ± 0,2	11,3 ± 0,2	<b>10,6 ± 0,7</b>
<b>Zn</b>	195 ± 5	192 ± 3	190 ± 3	<b>190 ± 5</b>
<b>As</b>	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,02	<b>0,28 ± 0,04</b>
<b>Se</b>	–	–	0,55 ± 0,06	<b>0,60 ± 0,03</b>
<b>Cd</b>	0,14 ± 0,01	0,131 ± 0,005	0,12 ± 0,01	<b>0,11 ± 0,02</b>
<b>Pb</b>	9,2 ± 0,3	9,4 ± 0,3	9,3 ± 0,3	<b>8,8 ± 0,9</b>

### 3.3.2. Разбавленное или минерализованное лечебное питание

Специализированное лечебное питание «Nutrison», предназначенное для восстановления пациентов после операций, перед либо напрямую растворяли в смеси Д (образец не содержит платины) с помощью простого перемешивания или УЗ, либо минерализовали согласно методикам, также представленным в п. 2.3.3.2. и 2.3.3.3. Главы 2. Применение азотнокислых растворителей (смесей А и Б) в данном случае нецелесообразно по причинам, озвученным в п. 3.1.2.1. настоящей Главы на примере анализа реальных проб биологических жидкостей пациентов.

Как следует из данных, представленных в табл. 23, вполне приемлемое совпадение между результатами, полученными после различной пробоподготовки, и указанными на упаковке содержаниями наблюдается только для Mn, Cu и Zn. При этом концентрации фосфора и селена завышены при их определении в разбавленных пробах приблизительно в 1,2 и 1,9 раз, соответственно. Причиной этому может быть рассмотренный ранее перенос заряда с иона  $C^+$  в случае анализа матриц со

значительным содержанием органических веществ. Так как применяемый в данном случае растворитель уже был проверен на выявление подобного эффекта в п. 3.1.2.1. настоящей Главы, источником углерода может быть только сама матрица анализируемого объекта. Удалить это влияние в рамках выбранного подхода с одним ВС не удастся ввиду необходимости существенного понижения мощности генератора практически до минимального значения. Поэтому для получения правильных результатов рекомендуется либо минерализовать исследуемый объект, либо использовать равнозначный подход – измерение в «стандартном режиме» при использовании нескольких ВС, подобранных исходя из близости ПИ, применяя мышьяк в качестве ВС для определения фосфора и селена.

**Таблица 23.** Результаты анализа специализированного лечебного питания «Nutrison», полученные в режиме «устойчивых» параметров и ВС Rh после различной пробоподготовки (n = 3, P = 0,95)

Элемент	Концентрация, мкг/100 г порошка		
	Найдено		Указано на упаковке
	после разбавления	после минерализации	
<b>P*</b>	<b>400 ± 10</b>	340 ± 10	<b>333</b>
<b>Mn</b>	1450 ± 50	1470 ± 50	<b>1526</b>
<b>Cu</b>	830 ± 30	820 ± 40	<b>832</b>
<b>Zn</b>	5000 ± 150	5200 ± 200	<b>5500</b>
<b>Se</b>	<b>50 ± 3</b>	29 ± 5	<b>27</b>

\* – концентрации в мг/100 г порошка

### 3.3.3. Солянокислые растворы платины

Особое внимание в ходе данного исследования было уделено влиянию соляной кислоты на интенсивности сигналов платины, так как разбавлять образцы координационных соединений, содержащих этот элемент, после соответствующей пробоподготовки (с целью предотвращения гидратации комплексов или их осаждения на стенках используемых пробирок) предполагалось именно этой кислотой. При этом рассматривали достаточно широкий диапазон концентраций – от 1,0 до 20 об.% или, что

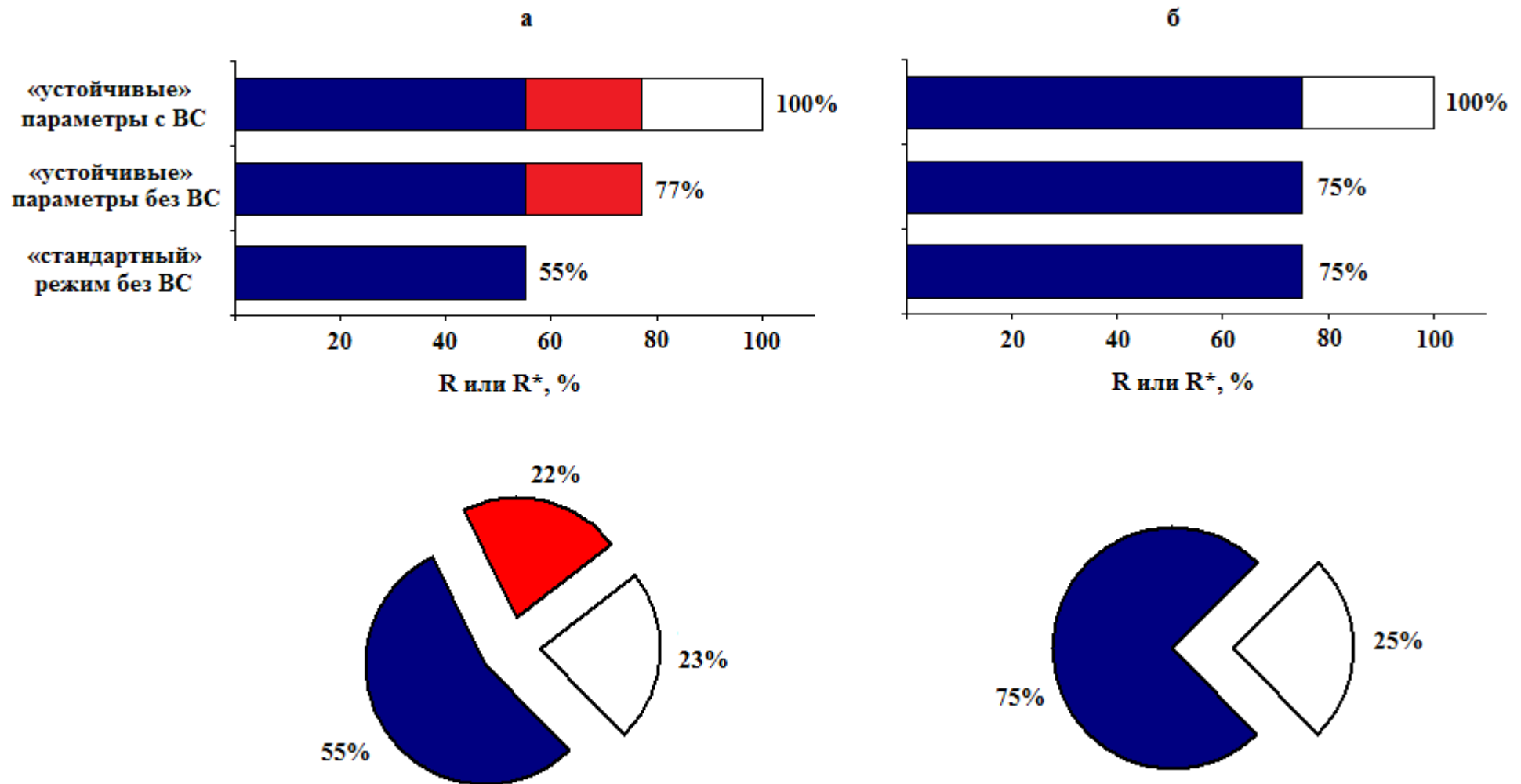
то же самое, от примерно 0,10 до 2,0 моль/л. Верхняя граница содержаний была выбрана исходя из молярной концентрации 15 об.%  $\text{HNO}_3$ , чтобы сравнить эффекты от присутствия одинаковых количеств этих веществ.

Было обнаружено, что в случае применения ВС Rh (несовпадающего с платиной по ПИ) во всем исследуемом диапазоне содержаний в обоих режимах HCl не оказывает явного влияния на относительные сигналы аналита, что выражается в близости значений величины  $R^*$  к 100% (табл. 24).

**Таблица 24.** Значения величин  $R^*$  для платины в солянокислых растворах различной концентрации ( $s_r$  не превышает 5% при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Концентрация HCl		$R^*$ , %	
об. %	моль/л	«стандартный» режим	«устойчивые» параметры
1,0	~ 0,10	99	101
1,5	~ 0,15	101	101
2,0	~ 0,20	100	100
2,5	~ 0,25	101	101
5	~ 0,50	99	99
10	~ 1,0	100	98
<b>20</b>	<b>~ 2,0</b>	<b>101</b>	<b>100</b>

Это может означать только одно: возможное занижение сигналов в солянокислых растворах обусловлено только процессами, происходящими при подаче и транспортировке анализируемого раствора, но никак не в самой плазме. Более подробное сравнение неспектральных матричных помех, вызываемых 2,0 М растворами  $\text{HNO}_3$  и HCl в «стандартном» режиме и режиме «устойчивых» параметров (рис. 13) подтверждает сделанное предположение. Действительно, если в случае первой кислоты занижение абсолютного сигнала складывается из двух составляющих (-22% за счет процессов в плазме и -23% за счет процессов в системе ввода пробы), то в случае HCl за падение интенсивности сигнала ответственны только последние процессы. При этом как было сказано в обзоре литературы (п. 1.2.1.1. Главы 1), присутствие данных кислот примерно одинаково воздействует как на саму подачу пробы, так и на характеристики получаемых аэрозолей (за счет этого величины занижения схожи: -23% и -25% для



**Рис. 13.** Распределение компонентов занижения сигнала Pt в растворах 2,0 М  $\text{HNO}_3$  (а) и  $\text{HCl}$  (б) по природе происхождения: подавление за счет процессов, происходящих в системе ввода пробы (белый цвет) и непосредственно в плазме (красный цвет) ( $s_r$  не превышает 5% при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

$\text{HNO}_3$  и  $\text{HCl}$ , соответственно). Отсутствие дополнительного влияния в солянокислых растворах, видимо, обусловлено меньшей суммарной энергией связи молекулы  $\text{HCl}$  (~4,5 эВ) по сравнению с молекулой  $\text{HNO}_3$  (~18,7 эВ), что не способствует столь заметному снижению температуры плазмы.

Другими словами, определение платины в растворах соляной кислоты возможно с применением любого (при прочих равных условиях) ВС в обоих режимах. Однако с целью учета влияний других присутствующих в растворе компонентов матрицы в дальнейшем использовали только режим «устойчивых» параметров. С точки зрения подавления гидратации или осаждения комплексов в качестве оптимальной была выбрана 2,5 об.%  $\text{HCl}$ .

### 3.3.4. Октанол-этанольные растворы платины

При определении коэффициентов распределения Pt-содержащих комплексов между фазами 1-октанол – вода среди прочих в качестве анализируемых выступают и октанол-этанольные растворы, а точнее 1 об.% или 10 об.% растворы 1-октанола в этиловом спирте, содержащем 2,5 об.%  $\text{HCl}$  (п. 2.3.6. Главы 2). Так как подавать напрямую в масс-спектрометр такие пробы нежелательно, с этой целью была использована проточно-инжекционная система, описанная в п. 2.2. Главы 2.

Эффекты от присутствия в растворе тех или иных компонентов при измерении нестационарных сигналов могут существенно отличаться от тех, что наблюдаются в случае непрерывного ввода проб. Тем более что скорости подачи пробы в распылитель отличаются в 3 раза (табл. 6). В связи с этим было решено исследовать влияние 0,4%  $\text{NaCl}$ , 15 об.%  $\text{HNO}_3$  и естественно октанол-этанольной матрицы на интенсивности сигналов Pt без использования и с использованием ВС в обоих режимах.

Было показано (табл. 25), что при использовании проточно-инжекционной системы удастся избавиться от неспектральных помех, обусловленных наличием избытка соли или кислоты, не прибегая к поиску «устойчивых» значений параметров работы масс-спектрометра или применению какого-либо внутреннего стандарта. При этом оба режима и, что самое интересное, все рассматриваемые ВС равнозначны. Иначе дело обстоит с органической матрицей, для которой, как и следовало ожидать, лимитирующим фактором является перенос заряда с образующегося в избытке иона  $\text{C}^+$ . Действительно, исходя из результатов определения Pt в «стандартном» режиме понятно,

**Таблица 25.** Значения величин  $\Delta R^*$  для Pt в растворах различного состава в обоих режимах при подаче с помощью проточно-инжекционной системы и использовании разных ВС ( $s_r \leq 5\%$  при  $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Модельный раствор	Режим	$\Delta R^*$ , %					
		внутренний стандарт					
		Нет	Be	Co	As	Rh	Bi
15 об.% HNO <sub>3</sub>	«стандартный»	-3	3	2	3	1	-2
	«устойчивые» параметры	-2	1	-3	0	-1	1
0,4% NaCl	«стандартный»	-4	-3	0	0	3	3
	«устойчивые» параметры	-3	3	-2	-2	4	3
10 об.% 1-октанола в этаноле	«стандартный»	-5	-55	2	-75	0	-4
	«устойчивые» параметры	50	-60	-6	-80	-5	-5

что подверженные завышению сигналов элементы с относительно высоким ПИ, отличающимися от ПИ  $C^+$  на 1 – 2 эВ, Be (увеличение интенсивности примерно в 2 раза) и As (в 4,5 раза) нельзя использовать в качестве внутренних стандартов. Обращает на себя внимание и тот факт, что при переходе к «устойчивым» значениям параметров имеет место существенное, практически в 1,5 – 2 раза, повышение чувствительности определения Co, Rh, Pt и Bi по сравнению с матрицей 1 об.% HNO<sub>3</sub>. Последнее обстоятельство приводит к ошибке определения аналита без использования ВС. Сигналы Be и As в этом случае оказываются завышенными уже в 3 и 6 раз, соответственно, что также не способствует их применению в анализе. Таким образом, при определении Pt в октанол-этанольной среде с помощью проточно-инжекционной системы следует использовать ВС с относительно низкими ПИ вне зависимости от режима работы прибора.

## **Глава 4. Применение разработанных подходов в клинической практике**

С учетом обнаруженных в Главе 3 закономерностей выбранный подход устранения неспектральных матричных помех был применен для решения конкретных клинических задач, поставленных медиками и разработчиками металлолекарств. В ходе этой части работы было произведено сравнение уровней содержания аналитов (P, Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd, Pb) в биологических жидкостях практически здоровых добровольцев и пациентов с синдромом системной воспалительной реакции (СВР), что позволило выявить диагностически значимые элементы, возможно являющиеся маркерами заболевания. Кроме этого, было подробно изучено связывание тестируемых Ga- и Pt-содержащих координационных соединений с белками сыворотки крови, которое может влиять не только на механизмы их транспорта в раковые клетки, но и на биодоступность этих препаратов, а также определены коэффициенты распределения действующих веществ новых тестируемых лекарственных средств.

### **4.1. Комплексное исследование цельной крови, сыворотки крови и мочи пациентов с синдромом системной воспалительной реакции организма**

Для упрощения и ускорения анализа в качестве способа пробоподготовки цельной крови, сыворотки и мочи было выбрано простое разбавление. Оно осуществлялось с помощью смеси Д по причинам, указанным в п. 3.1.2.1. Главы 3. Так как среди аналитов отсутствовала Pt, такой выбор был вполне обоснован. Дополнительно, чтобы предотвратить отложение сажи на частях интерфейса, согласно п. 3.2.1.5. Главы 3, в основной поток аргона вводили добавку кислорода.

В первичной модели процесса протекания синдрома СВР предполагалась высокая биологическая роль P, Mn, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd и Pb. Поэтому в ходе предварительного исследования определяли содержания всего этого ряда элементов.

Анализ цельной крови, сыворотки крови и мочи 30 практически здоровых добровольцев, проживающих в Москве и Московской области, показал, что полученные диапазоны концентраций (табл. 26), в первом приближении, соответствуют референсным значениям Независимой лаборатории ИНВИТРО (табл. 1). Они в дальнейшем и были использованы для сравнительной оценки элементного состава проб пациентов, страдающих от гнойных ран мягких тканей (ГМРТ), панкреонекроза и перитонита.



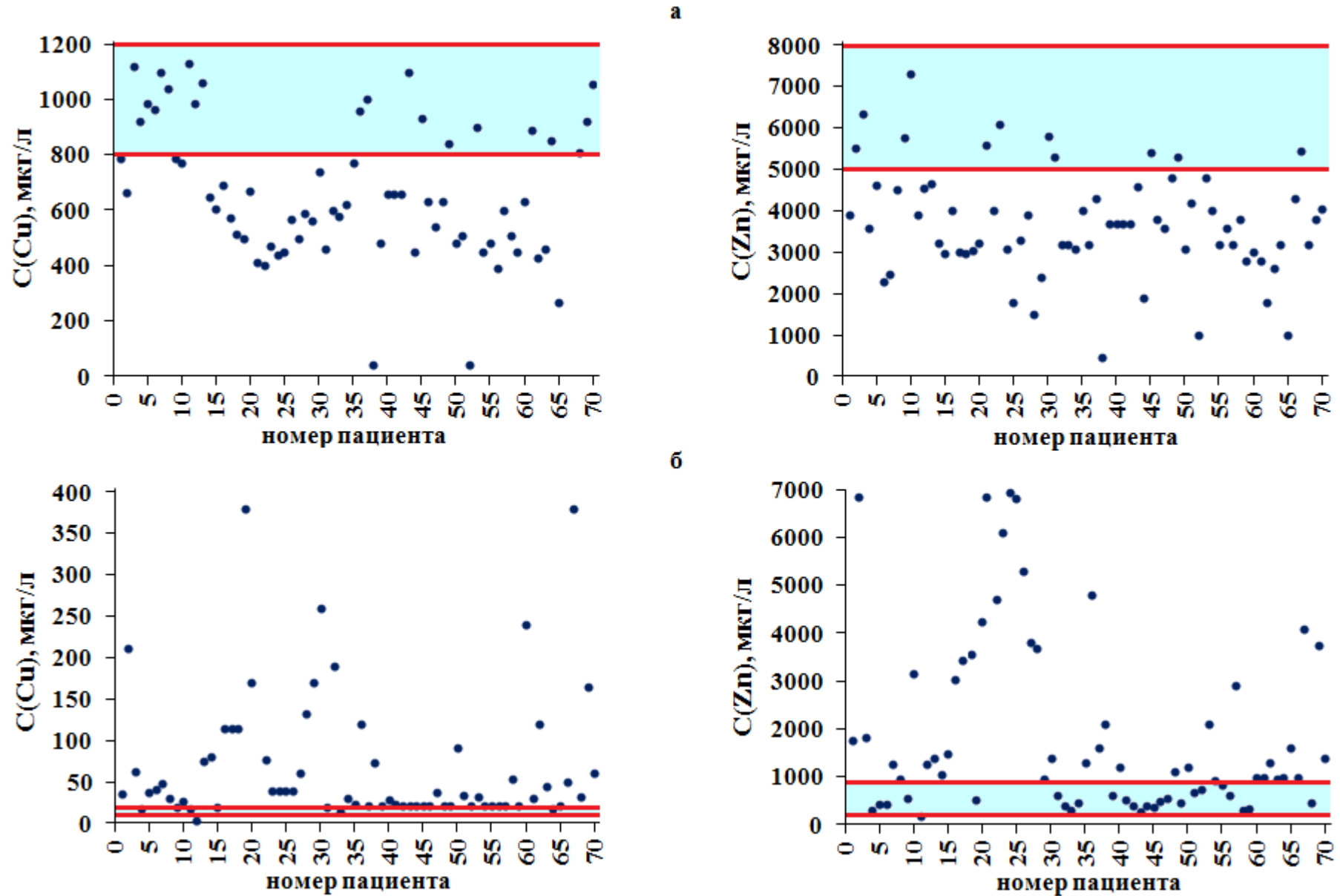
**Таблица 26.** Диапазоны содержаний элементов в пробах практически здоровых добровольцев

Элемент	Концентрация, мкг/л		
	Кровь	Сыворотка	Моча
<b>P*</b>	300 – 450	100 – 130	600 – 1300
<b>Mn</b>	4 – 18	0 – 3	0 – 4
<b>Co</b>	0 – 0,9	0 – 1	0,6 – 0,9
<b>Cu</b>	800 – 1200	550 – 1200	10 – 20
<b>Zn</b>	5000 – 8000	450 – 1050	170 – 890
<b>As</b>	0 – 9	2 – 10	5 – 200
<b>Se</b>	90 – 250	70 – 135	12 – 45
<b>Cd</b>	0 – 2	0 – 0,5	0 – 0,4
<b>Pb</b>	3 – 60	4 – 8	1 – 5

\* – концентрации в мг/л

В процессе интерпретации результатов, полученных для относительно небольшой (10 человек) пилотной группы больных, было установлено, что наиболее сильно при указанных выше заболеваниях (относительно значений нормы, приведенных в **табл. 26**) изменяются концентрации только двух элементов – Cu и Zn. Для них наблюдается ярко выраженная тенденция к снижению содержания в цельной крови и увеличению выведения с мочой.

С целью подтверждения обнаруженных закономерностей на следующем этапе число пациентов было увеличено до 70 (включая первоначальную группу). Как отчетливо видно из графиков, представленных на **рис. 14**, в 70 и 85% случаев концентрации Cu и Zn, соответственно, в цельной крови ниже, чем в пробах практически здоровых добровольцев (**а**), в то же самое время у 50 – 60% пациентов зафиксирован повышенный уровень этих элементов в моче (**б**). Однако наибольшую диагностическую ценность представляет оценка содержания только Cu. Было показано, что тяжесть воспалительного процесса влияет на концентрацию в цельной крови, прежде всего, этого элемента. Так, в ряду ГРМТ – панкреонекроз – перитонит (степень тяжести патологии увеличивается слева направо) ее содержание снижается. Кроме этого, при выведении с мочой более чем 70 мкг/л Cu смертельный исход наблюдается в 75% случаев, в то время как при меньших концентрациях исход всегда положителен.



**Рис. 14.** Сравнение содержаний Cu и Zn в цельной крови (а) и моче (б) практически здоровых добровольцев (выделенные цветом области) и пациентов с синдромом СВР (точки)

Тем не менее, учитывая тот факт, что выборка пациентов была не очень большой, данные выводы являются скорее гипотезой, которая требует доказательства в процессе исследования еще большего числа больных.

#### **4.2. Изучение связывания действующих веществ лекарственных средств с белками крови человека**

На данном этапе работы было изучено связывание действующих веществ новых тестируемых противоопухолевых лекарственных средств – 8-оксихинолината галлия(III) и цис- или транс-[дигалогенобис(2-пропаноноксимов)]платины(II) – с альбумином и трансферрином, а также цельной сывороткой крови.

Перед этим, безусловно, были подобраны подходящие условия для инкубации и ультрафильтрации смесей координационных соединений с белковой матрицей (п. **2.3.5.** и **2.3.7.** Главы **2**). Инкубацию проводили при температуре тела человека 37°C с моделированием рН крови посредством использования ФБР (рН 7,40). Ультрафильтрацию осуществляли при 3000 или 5000 об/мин (для индивидуальных белков и сыворотки, соответственно) на фильтрах с порогом отсечения в 30 кДа в течение 15-20 мин, которых оказывалось достаточно для полного разделения фаз. Оптимальное время выдерживания проб при определении констант связывания выбирали исходя из результатов предварительных кинетических исследований.

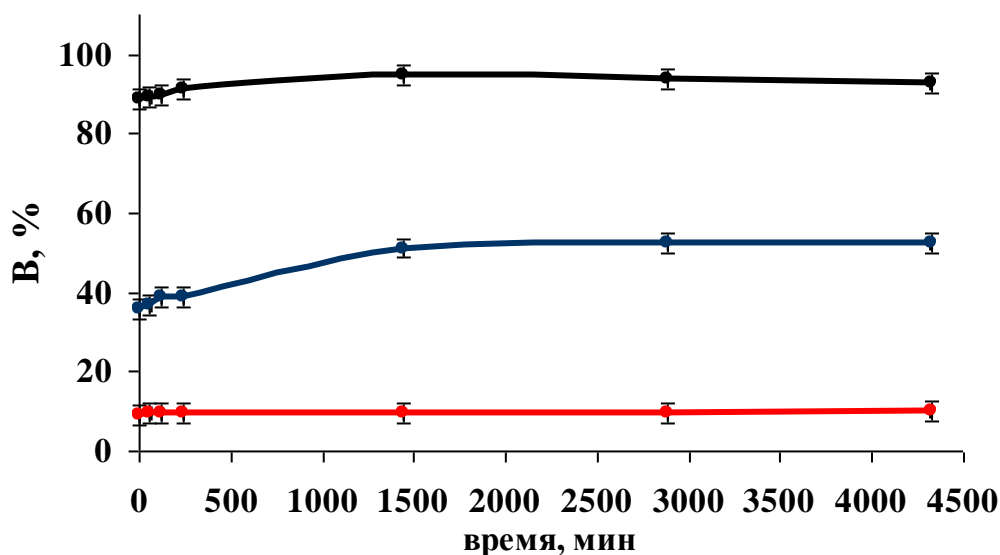
Для проверки материального баланса (т.е. выявление справедливости выражения  $C_0 - C_{\text{несвяз.}}(t) = C_{\text{связ.}}(t)$ ) и, как следствие, контроля неспецифического связывания комплексов металлов с мембраной фильтра или другими полимерными поверхностями, анализировали как свободную от белка (определение  $C_{\text{несвяз.}}$ ), так и связанную с белком (определение  $C_{\text{связ.}}$ ) части исходной смеси, полученные после ультрафильтрации. Было установлено, что неспецифическое взаимодействие не превышает 5%. Однако возможность мониторинга содержания препаратов в обеих средах важна не только поэтому: она также обеспечивает получение правильных значений величины степени (**В**) и константы (**К**) связывания, когда концентрация элемента в фильтрате принимает близкие к пограничным значения (т.е. разница между  $C_0$  и  $C_{\text{несвяз.}}(t)$  стремится к 0 или  $C_0$ ). Использование режима «устойчивых» параметров и любого ВС актуально, прежде всего, при низких получаемых значениях  $C_{\text{несвяз.}}$  и  $C_{\text{связ.}}$ , особенно в случае соотношения «действующее вещество:белок», равном 1:10, в начале ( $C_{\text{связ.}}$  обычно мало) и конце

( $C_{\text{несвяз}}$  часто невелико) периода регистрации кинетической кривой: кратность разбавления при этом не превышает 10 раз, что приводит к проявлению неспектральных помех за счет присутствия солей (около 0,9 % в фильтрате и концентрате) и белков (в концентрате). Если учесть и тот факт, что в реальности содержание препаратов в крови после всасывания может быть существенно меньше, а влияние сопутствующих матричных компонентов сильнее, оправданность учета помех не вызывает сомнения. Однако так как обсуждаемое исследование касается только одноэлементных анализов, применение «стандартного» режима работы и ВС, подобранного по ПИ, также вполне приемлемо. Выбор операционных условий и внутреннего стандарта в случае анализа Pt-металлолекарств более подробно обсужден в п. 3.3.3. и 3.3.4. Главы 3.

#### **4.2.1. Исследование связывания 8-оксихинолината галлия(III) с альбумином, трансферрином и сывороткой крови человека**

Исследование кинетики связывания 8-оксихинолината галлия(III) с альбумином, трансферрином и сывороткой крови человека было проведено с целью выявления основного пути транспортировки препарата в раковую клетку, а именно определения белка, с которым комплекс наиболее эффективно взаимодействует. Это исследование проводили при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10, моделирующем примерную ситуацию после растворения перорально вводимого препарата в тонком кишечнике и его всасывания в кровь. Было обнаружено, что, в первом приближении, взаимодействие комплекса с той или иной белковой матрицей практически полностью до насыщения (70 – 100% от наибольшего значения величины **B**) происходит по истечении меньше, чем одной минуты после смешения реагентов (рис. 15). При этом максимальное связывание соединения с альбумином (**B** = 10%) и сывороткой крови человека (**B** = 95%) достигается мгновенно. В то же самое время поведение 8-оксихинолината галлия(III) в присутствии трансферрина несколько отличается: после начального быстрого взаимодействия с белком (до **B** = 35%) наблюдается равномерный в течение 48 ч рост величины степени связывания до ~50%. Последнее обстоятельство может быть объяснено протеканием ступенчатых процессов образования и/или трансформации нескольких аддуктов. Тем не менее, различия в поведении между двумя существующими формами трансферрина – апо- (не содержащей Fe) и холо- (содержащей Fe), – обнаружено не было. Более того, было показано, что в

ходе взаимодействия галлий не вытесняет железо из холо-формы (фильтрат не содержит значимых количеств железа), что свидетельствует в пользу его присоединения к другим центрам полипептидной молекулы. В целом, очевиден и тот факт, что, несмотря на доминирование трансферрина, связывание Ga-комплекса приблизительно на 35% (95% – 10% – 50%) обусловлено и другими, также содержащимися в сыворотке крови белками с атомной массой, превышающей 30 кДа.



**Рис. 15.** Зависимости величины **B** от времени взаимодействия 8-оксихинолината галлия(III) с альбумином (красный цвет), трансферрином (синий цвет) и сывороткой крови человека (черный цвет) при соотношении «действующее вещество:белок» 1:10 ( $n = 3, P = 0,95$ )

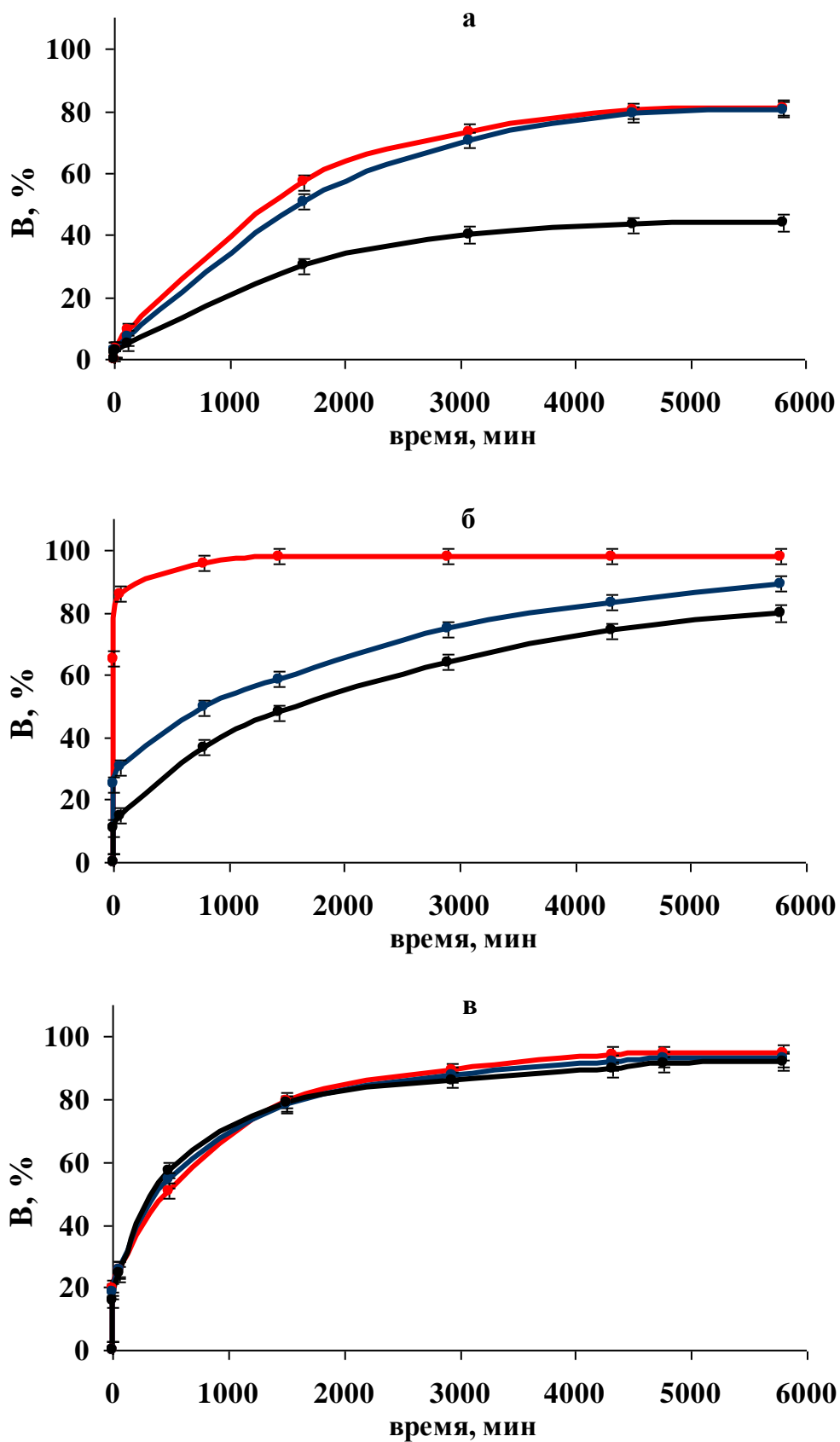
В качестве оптимального времени при определении **K**, исходя из зависимостей, представленных на **рис. 15**, было выбрано время 64 ч, при котором явно все 100% (от наибольшего значения величины **B**) координационного соединения связаны с обоими белками. Рассчитанные по формуле 2 значения констант связывания составляют  $(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^3$  и  $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$  для альбумина и трансферрина, соответственно. Это еще раз подтверждает большее (примерно в 9 раз) сродство 8-оксихинолината галлия(III) по отношению к последнему белку и дает возможность говорить о его главенствующей роли при транспортировке лекарства в раковые клетки.

#### 4.2.2. Исследование связывания (SP-4-2)- и (SP-4-1)-дигалогенобис(2-пропаноноксимов-κN)платины(II) с альбумином и сывороткой крови человека

Сравнение процессов связывания действующих веществ новых тестируемых противоопухолевых лекарственных средств, представляющих собой комплексы цис- и транс-[дигалогенобис(2-пропаноноксимов)]платины(II) разного строения, с альбумином и сывороткой крови человека, а также их липофильных свойств и установление возможной корреляции между значениями величин **log K** и **log P** было осуществлено с целью выбора наиболее подходящих на эту роль молекул. Действительно, биодоступность платиновых комплексов определяется в основном степенью их связывания с альбумином (средство к этому белку для них должно быть доминирующим), так как подобное взаимодействие предотвращает выведение препаратов с мочой и способствует увеличению времени их действия. Липофильность же определяет способность проникновения молекул вещества через мембрану раковой клетки, что также важно с точки зрения отсеивания веществ-кандидатов в период доклинической фазы испытаний в процессе разработки фармацевтического препарата. Более того, было интересно установить и возможную зависимость между строением вещества и его свойствами для последующего синтеза молекул с заранее заданными характеристиками.

Первоначально связывание изучали при различных соотношениях «действующее вещество:белок» (1:10, 1:1 и 5:1) на примере соединений **2б** и **3а**. Именно они являются наиболее и наименее реакционноспособными в отношении гидратации или взаимодействия с 2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфатом, являющимся моделью молекулы ДНК [191, 192]. В качестве вещества сравнения применяли цисплатин – самое простое из известных платиновых противоопухолевых фармпрепаратов.

Из графиков, представленных на **рис. 16**, четко видно, что поведение всех трех исследуемых комплексов отличается друг от друга. Так, для цисплатина характерно равномерное в одну стадию связывание с альбумином. При этом величина **B** достигает своего максимального значения по истечении уже примерно 72 ч (80% для соотношений «действующее вещество:белок», равных 1:10 и 1:1; 45% для соотношения 5:1). В то же самое время при взаимодействии кинетически более лабильного соединения **2б** следует отметить наличие как минимум двух ступеней данного процесса. В ходе первой быстрой (в течение 1 ч) стадии степень связывания возрастает до 85, 30 и 15% при соотношениях



**Рис. 16.** Зависимости величины **V** от времени взаимодействия цисплатина (**а**) и комплексов **2б** (**б**) и **3а** (**в**) с альбумином при различных соотношениях «действующее вещество:белок» 1:10 (красный цвет), 1:1 (синий цвет) и 5:1 (черный цвет) ( $n = 3, P = 0,95$ )

«действующее вещество:белок», равных 1:10, 1:1 и 5:1, соответственно. Затем скорость реакции падает и, как следствие, происходит постепенный выход на насыщение. Максимальное связывание в этих случаях (около 98, 90 и 80%) достигается за 24, 96 и 96 ч, соответственно. Наблюдение такого двухстадийного процесса объясняется содержанием в молекуле белка двух центров связывания, независимых друг от друга и, что самое главное, с различным сродством по отношению к платиновым комплексам. Аналогичная картина характерна и для препарата **3a**, с той лишь разницей, что вне зависимости от соотношения реагентов кинетические кривые идентичны в пределах погрешности: мгновенное (менее чем за минуту) связывание 20% белка сменяется более равномерным ростом величины **B** до 94% в течение последующих 72 ч.

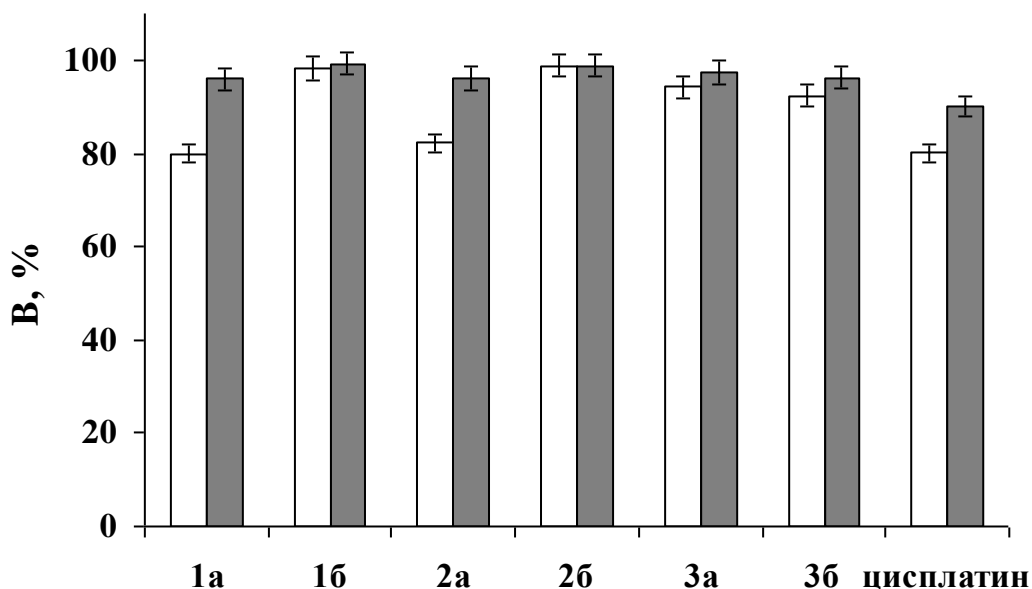
Как следует из данных **табл. 27**, значения констант связывания **K** для тестируемых действующих веществ, в целом, выше, чем для цисплатина. К тому же, сродство по отношению к данному белку меньше у цис-изомеров (за исключением йодидных комплексов). Помимо этого, только для них наблюдается и следующая 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. Таким образом, с точки зрения биодоступности предпочтительными являются соединения **1b** и **2b** с наибольшими значениями величины **K**.

**Таблица 27.** Константы связывания тестируемых Pt-содержащих комплексов при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10 ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Комплекс	$K, (\text{моль/л})^{-1}$
цисплатин	$(8,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$
<b>1a</b>	$(8,8 \pm 0,4) \cdot 10^4$
<b>1b</b>	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^6$
<b>2a</b>	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^5$
<b>2b</b>	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$
<b>3a</b>	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$
<b>3b</b>	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^5$



В ходе дополнительных экспериментов, касающихся взаимодействия цисплатина и цис-, транс-[дигалогенобис(2-пропаноноксимов)]платины(II) с сывороткой крови человека было подтверждено и ранее высказанное предположение о доминирующей роли альбумина в связывании этих препаратов. Действительно, от 85 до 100% (рис. 17) всего связанного белками сыворотки крови количества координационных соединений приходится именно на альбумин.



**Рис. 17.** Сравнение величин **В** тестируемых Pt-содержащих комплексов с альбумином (белый цвет) и сывороткой крови человека (серый цвет) при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10 ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

С целью сравнения способности проникновения рассматриваемых соединений через двойной липидный слой мембраны раковой клетки оценивали их липофильность, а точнее логарифмы коэффициента распределения веществ между фазами 1-октанол – вода согласно методике, приведенной в п. 2.3.6. Главы 2, с учетом изложенных в п. 3.3.4. Главы 3 рекомендаций. Из данных табл. 28 видно, что, на самом деле, как и при расчете величин **В** и **К**, правильное определение **log P** в случае, правда, только одного пограничного значения  $C_{\text{водн}}$ . (т.е. когда разница между  $C_0$  и  $C_{\text{водн}}$  стремится к 0 при отрицательных **log P**) необходимо знание концентрации лекарства в органической фазе. Так, адекватное, сравнимое с данными литературы (-2,19, приведенное в работе [193]) значение этой величины для цисплатина  $-2,18 \pm 0,04$  получается только по формуле

$$\log P = \log (C_{\text{орг.}} / C_{\text{водн.}}).$$

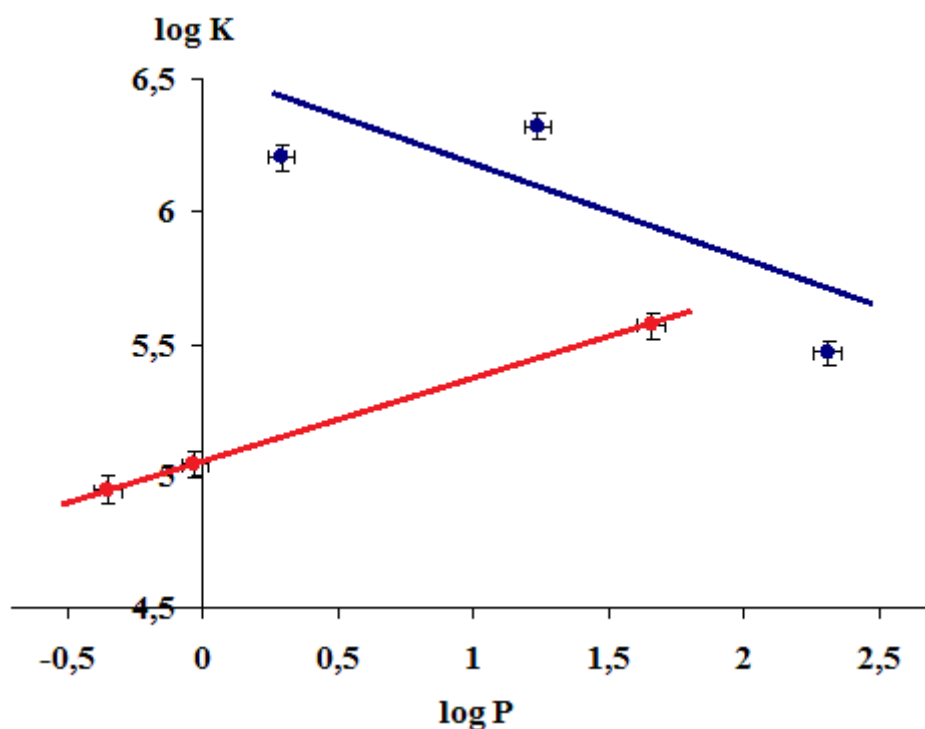
Поэтому рассчитанные именно таким образом величины использовались в дальнейшем

**Таблица 28.** Рассчитанные двумя способами логарифмы коэффициентов распределения ( $n = 3, P = 0,95$ )

Комплекс	log P	
	log ((C <sub>0</sub> – C <sub>водн.</sub> )/C <sub>водн.</sub> )	log (C <sub>орг.</sub> / C <sub>водн.</sub> )
цисплатин	<b>-1,79 ± 0,03</b>	<b>-2,18 ± 0,04</b>
<b>1a</b>	<b>-0,21 ± 0,02</b>	<b>-0,35 ± 0,01</b>
<b>1б</b>	0,25 ± 0,04	<b>0,29 ± 0,05</b>
<b>2a</b>	-0,05 ± 0,02	<b>-0,03 ± 0,01</b>
<b>2б</b>	1,19 ± 0,04	<b>1,24 ± 0,08</b>
<b>3a</b>	1,75 ± 0,03	<b>1,66 ± 0,05</b>
<b>3б</b>	2,35 ± 0,05	<b>2,31 ± 0,08</b>

(последний столбец **табл. 28**). Очевидно, что для каждой галолен-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. Таким образом, с точки зрения липофильности, наиболее предпочтительными являются соединения **2б**, **3a** и **3б**, значения **log P** для которых положительны, а значит, способность прохождения мембраны клетки существенно выше, чем у цисплатина.

Попытка установить линейную зависимость между значениями **log K** и **log P** для всех новых тестируемых комплексов не увенчалась успехом (коэффициент корреляции  $R^2$  составляет всего 0,11, **рис. 18**). Это означает, что связывание с альбумином обусловлено не только липофильностью соединений. При этом для молекул разной пространственной конфигурации характерно противоположное поведение. Так, в случае транс-изомеров взаимодействие с белком, вероятнее всего, происходит за счет специфического распознавания молекулы-гостя полипептидным кластером, о чем косвенно свидетельствует не ярко выраженная зависимость двух рассматриваемых величин ( $R^2$  составляет 0,67). В то же время для цис-комплексов наблюдается линейное увеличение **log K** с ростом **log P** и, очевидно, размера заместителя ( $R^2$  близок к 1), что говорит о доминирующей роли именно неспецифического связывания.



**Рис. 18.** Зависимости величины  $\log K$  при соотношении «действующее вещество:белок», равном 1:10, от логарифма коэффициента распределения  $\log P$  для цис- (красный цвет) и транс-комплексов (синий цвет) тестируемых Pt-содержащих препаратов ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

В целом, подводя итог, среди всех исследуемых веществ наиболее перспективным для дальнейшего изучения является соединение **2б**, константа связывания которого с альбумином максимальна, а липофильность относительно высока.

## 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 конструктивных особенностей ионной оптики данного масс-спектрометра.

5. Эффективность предлагаемых подходов проверена при анализе крови, мочи, волос, лечебного питания и лекарственных 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 P. 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.

## Список литературы

1. *Parsons P.J., Barbosa Jr. F.* Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2007. V. 62. № 9. P. 992–1003.
2. *Пупышев А.А., Суриков В.Т.* Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Образование ионов. Е.: УрО РАН. 2006. 276 с.
3. Determination of heavy metals in whole blood by ICP-MS. // Agilent Technologies. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: [http://icpmslab.mersin.edu.tr/docs/Blood\\_Analysis.pdf](http://icpmslab.mersin.edu.tr/docs/Blood_Analysis.pdf) (дата обращения: 08.04.2014).
4. *Mestek O., Čurdová E., Koplík R., Zima T.* Přímé stanovení mědi a zinku v plné lidské krvi metodou ICP-MS. // *Chem. Listy.* 1997. V. 91. № 12. P. 1059–1062.
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. 13–18.
6. *Kira C.S., Sakuma A.M., Cruz Gouveia N.* Fast and simple multi-element determination of essential and toxic metals in whole blood with quadrupole ICP-MS. // *J. Appl. Pharm. Sci.* 2014. V. 4. № 5. P. 39–45.
7. *Palmer C.D., Lewis Jr. M.E., Geraghty C.M., Barbosa Jr. F., Parsons P.J.* Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma – mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2006. V. 61. № 8. P. 980–990.
8. *Heitland P., Köster H.D.* Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2006. V. 20. № 4. P. 253–262.
9. *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.* An 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. 806–810.
10. *Case C.P., Ellis L., Turner J.C., Fairman B.* Development of a routine method for the determination of trace metals in whole blood by magnetic sector inductively coupled

- plasma mass spectrometry with particular relevance to patients with total hip and knee arthroplasty. // *Clin. Chem.* 2001. V. 47. № 2. P. 275–280.
11. *Gajek R.* Determination of essential and toxic metals in blood by ICP-MS using calibration in a synthetic matrix. // Agilent Technologies. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: <https://www.chem.agilent.com/Library/applications/5991-2991EN.pdf> (дата обращения: 30.05.2014).
  12. *Tănăselia C., Frențiu T., Ursu M., Vlad M., Chintoanu M., Cordoș E., David L., Paul M., Gomoiescu D.* Fast method for determination of Cd, Cu, Pb, Se, and Zn in whole blood by DRC-ICP-MS using the simple dilution procedure. // *Optoelectron. Adv. Mat.* 2008. V. 2. № 2. P. 99–107.
  13. *McShane W.J., Pappas R.S., Wilson-McElprang V., Paschal D.* A rugged and transferable method for determining blood cadmium, mercury, and lead with inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2008. V. 63. № 6. P. 638–644.
  14. *Barany E., Bergdahl I.A., Schütz A., Skerfving S., Oskarsson A.* Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1997. V. 12. № 9. P. 1005–1009.
  15. *Wahlen R., Evans L., Turner J., Hearn R.* The Use of Collision/Reaction Cell ICP-MS for the determination of elements in blood and serum samples. // *Spectroscopy.* 2005. V. 20. № 12. P. 84–89.
  16. *Sieniawska C.E., Mensikov R., Delves H.T.* Determination of total selenium in serum, whole blood and erythrocytes by ICP-MS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1999. V. 14. № 2. P. 109–112.
  17. *Nixon D.E., Moyer T.P.* Routine clinical determination of lead, arsenic, cadmium, and thallium in urine and whole blood by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1996. V. 51. № 1. P. 13–25.
  18. *Nixon D.E., Neubauer K.R., Eckdahl S.J., Butz J.A., Burritt M.F.* Comparison of tunable bandpass reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry with conventional inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of heavy metals in whole blood and urine. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2004. V. 59. № 9. P. 1377–1387.
  19. *Gouille J-P., Mahieu L., Castermant J., Neveu N., Bonneau L., Laine G., Bouige D., Lacroix C.* Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. // *Forensic Sci. Int.* 2005. V. 153. № 1. P. 39–

- 44.
20. *Krachler M., Heisel C., Kretzer J.P.* Validation of ultratrace analysis of Co, Cr, Mo and Ni in whole blood, serum and urine using ICP-SMS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2009. V. 24. № 5. P. 605–610.
  21. Determination of trace elements in clinical samples by high resolution ICP-MS. // Thermo Fisher Scientific. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: <https://www.thermoscientific.com/content/am/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/AN-30003-Determination-of-Trace-Elements-in-Clinical-Samples-by-High-Resolution-ICP-MS.pdf> (дата обращения: 30.05.2014).
  22. *Vanhoe H., Dams R.* Use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace elements in human serum. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1994. V. 9. № 1. P. 23–31.
  23. *Vanhoe H., Vandecasteele C., Versieck J., Dams R.* Determination of iron, cobalt, copper, zinc, rubidium, molybdenum, and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. № 17. P. 1851–1857.
  24. *Gerotto M., Dell'Andrea E., Bortoli A., Marchiori M., Palonta M., Troncon A.* Interference effects and their control in ICP-MS analysis of serum and saline solutions. // *Microchem. J.* 1995. V. 51. № 1–2. P. 73–87.
  25. *Alimonti A., Petrucci F., Fioravanti S., Laurenti F., Caroli S.* Assessment of the content of selected trace elements in serum of term and pre-term newborns by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 342. № 1. P. 75–81.
  26. *Heitland P., Köster H.D.* Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. № 12. P. 1552–1558.
  27. *Heitland P., Köster H.D.* Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 365. № 1–2. P. 310–318.
  28. *Mulligan K.J., Davidson T.M., Caruso J.A.* Feasibility of the direct analysis of urine by inductively coupled argon plasma mass spectrometry for biological monitoring of exposure to metals. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1990. V. 5. № 4. P. 301–306.
  29. *Bass D., Jones D.* Determination of trace metals in human urine using the NexION 300/350 ICP-MS. // PerkinElmer. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: [http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/444317APP\\_TraceMetalsAnalysisNexION.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/444317APP_TraceMetalsAnalysisNexION.pdf) (дата обращения: 30.05.2014).



30. Nakagawa J., Tsuchiya Y., Yashima Y., Tezuka M., Fujimoto Y. Determination of trace levels of elements in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Health Sci.* 2004. V. 50. № 2. P. 164–168.
31. Wang J., Hansen E.H., Gammelgaard B. Flow injection on-line dilution for multi-element determination in human urine with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Talanta.* 2001. V. 55. № 1. P. 117–126.
32. Determination of trace and ultratrace elements in body fluids using sector-field ICP-MS. // Thermo Fisher Scientific. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: [http://www.microgenics.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_5017.pdf](http://www.microgenics.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_5017.pdf) (дата обращения: 30.05.2014).
33. Hsiung Ch-Sh., Andrade J.D., Costa R., Ash K.O. Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Clin. Chem.* 1997. V. 43. № 12. P. 2303–2311.
34. Szpunar J., Bettmer J., Robert M., Chassaigne H., Cammann K., Lobinski R., Donard O.F.X. Validation of the determination of copper and zinc in blood plasma and urine by ICP MS with cross-flow and direct injection nebulisation. // *Talanta.* 1997. V. 44. № 8. P. 1389–1396.
35. Featherstone A.M., Townsend A.T., Jacobson G.A., Peterson G.M. Comparison of methods for the determination of total selenium in plasma by magnetic sector inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 512. № 2. P. 319–327.
36. Blas Bravo I., Castro R.S., Riquelme N.L., Díaz C.T., Goyenaga D.A. Optimization of the trace element determination by ICP-MS in human blood serum. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2007. V. 21. S. 1. P. 14–17.
37. Forrer R., Gautschi K., Lutz H. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2001. V. 80. № 1. P. 77–93.
38. Schramel P., Wendler I., Angerer J. The determination of metals (antimony, bismuth, lead, cadmium, mercury, palladium, platinum, tellurium, thallium, tin and tungsten) in urine samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1997. V. 69. № 3. P. 219–223.
39. Batista B.L., Rodrigues J.L., Tormen L., Curtius A.J., Barbosa Jr. F. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICP-

- MS with a simple dilute-and-shoot procedure. // *J. Braz. Chem. Soc.* 2009. V. 20. № 8. P. 1406–1413.
40. *Minnich M.G., Miller D.C., Parsons P.J.* Determination of As, Cd, Pb, and Hg in urine using inductively coupled plasma mass spectrometry with the direct injection high efficiency nebulizer. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2008. V. 63. № 3. P. 389–395.
  41. *Schramel P., Wendler I.* Capabilities of double focusing magnetic sector-ICP-MS for the determination of trace elements in body fluids (blood, blood serum, urine) at the example of control materials. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. V. 361. № 5. P. 487–491.
  42. *Gulson B., Mizon K., Taylor A., Korsch M., Stauber J., Davis J.M., Louie H., Wu M., Antin L.* Longitudinal monitoring of selected elements in blood of healthy young children. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2008. V. 22. № 3. P. 206–214.
  43. *Bocca B., Forte G., Petrucci F., Senofonte O., Violante N., Alimonti A.* Development of methods for the quantification of essential and toxic elements in human biomonitoring. // *Ann. Ist. Super Sanità.* 2005. V. 41. № 2. P. 165–170.
  44. *Rambousková J., Krsková A., Slavíková M., Čejchanová M., Wranová K., Procházka B., Černá M.* Trace elements in the blood of institutionalized elderly in the Czech Republic. // *Arch. Gerontol. Geriat.* 2013. V. 56. № 2. P. 389–394.
  45. *Stavros H-Ch. W., Bonde R.K., Fair P.A.* Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). // *Mar. Pollut. Bull.* 2008. V. 56. № 6. P. 1215–1233.
  46. *D'Ilio S., Forastiere F., Draicchio A., Majorani C., Petrucci F., Violante N., Senofonte O.* Human biomonitoring for Cd, Hg and Pb in blood of inhabitants of the Sacco Valley (Italy). // *Ann. Ist. Super Sanità.* 2013. V. 49. № 1. P. 24–33.
  47. *D'Ilio S., Majorani C., Petrucci F., Violante N., Senofonte O.* Method validation for the quantification of As, Cd, Hg and Pb in blood by ICP-MS for monitoring purposes. // *Anal. Methods.* 2010. V. 2. № 12. P. 2049–2054.
  48. *Schweitzer L., Cornett C.* Determination of heavy metals in whole blood using inductively-coupled plasma mass spectrometry: a comparison of microwave and dilution techniques. // *The Big M.* 2008. V. IV. P. 75–83.
  49. *Bazzi A., Nriagu J.O., Linder A.M.* Determination of toxic and essential elements in children's blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *J. Environ. Monit.* 2008. V. 10. № 10. P. 1226–1232.

50. *Rodushkin I., Ödman F., Olofsson R., Axelsson M.D.* Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2000. V. 15. № 8. P. 937–944.
51. *Bocca B., Madeddu R., Asara Y., Tolu P., Marchal J.A., Forte G.* Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2011. V. 25. № 1. P. 19–26.
52. *D'Ilio S., Violante N., Di Gregorio M., Senofonte O., Petrucci F.* Simultaneous quantification of 17 trace elements in blood by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) equipped with a high-efficiency sample introduction system. // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 579. № 2. P. 202–208.
53. *Rodushkin I., Ödman F., Branth S.* Multielement analysis of whole blood by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999. V. 364. № 4. P. 338–346.
54. *Forrer R., Wenker Ch., Gautschi K., Lutz H.* Concentration of 17 trace elements in serum and whole blood of plains viscachas (*Lagostomus maximus*) by ICP-MS, their reference ranges, and their relation to cataract. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2001. V. 81. № 1. P. 47–62.
55. *Griesel S., Kakuschke A., Siebert U., Prange A.* Trace element concentrations in blood of harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Wadden Sea. // *Sci. Total Environ.* 2008. V. 392. № 2–3. P. 313–323.
56. *Alimonti A., Petrucci F., Santucci B., Cristaudo A., Caroli S.* Determination of chromium and nickel in human blood by means of inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 306. № 1. P. 35–41.
57. *Ivanenko N.B., Ivanenko A.A., Solovyev N.D., Zeimal A.E., Navolotskii D.V., Drobyshev E.J.* Biomonitoring of 20 trace elements in blood and urine of occupationally exposed workers by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Talanta.* 2013. V. 116. P. 764–769.
58. *Begerow J., Turfeld M., Dunemann L.* Determination of physiological palladium, platinum, iridium and gold levels in human blood using double focusing magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1997. V. 12. № 9. P. 1095–1098.
59. *Hasegawa T., Inagaki K., Haraguchi H.* Multielement correlation analysis of major-to-

- trace elements in human blood serum for medical diagnosis as studied by ICP-AES and ICP-MS. // *Anal. Sci.* 2001. V. 17. P. 979–982.
60. *Li G., Brockman J.D., Lin Sh-W., Abnet C.C., Schell L.A., Robertson J.D.* Measurement of the trace elements Cu, Zn, Fe, and Mg and the ultratrace elements Cd, Co, Mn, and Pb in limited quantity human plasma and serum samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Am. J. Anal. Chem.* 2012. V. 3. № 9. P. 646–650.
  61. *Kunze J., Koelling S., Reich M., Wimmer M.A.* Use of ultrasonic nebulizer with desolvator membrane for the determination of titanium and zirconium in human serum by means of inductively coupled plasma-mass spectroscopy. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000. V. 366. № 2. P. 165–166.
  62. *Dombovári J., Varga Zs., Becker J.S., Mátyus J., Kakuk Gy., Papp L.* ICP-MS determination of trace elements in serum samples of healthy subjects using different sample preparation methods. // *At. Spectrosc.* 2001. V. 22. № 4. P. 331–335.
  63. *Kuwabara J., Noguchi H.* Development of rapid urine analysis method for uranium. // 10th international congress of the International Radiation Protection Association on harmonization of radiation, human life and the ecosystem. 2000. V. 32. P–3a–156.
  64. *Krachler M., Alimonti A., Petrucci F., Irgolic K.J., Forastiere F., Caroli S.* Analytical problems in the determination of platinum-group metals in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 363. № 1. P. 1–10.
  65. *Krachler M., Alimonti A., Petrucci F., Forastiere F., Caroli S.* Influence of sample pre-treatment on the determination of trace elements in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 8. P. 701–705.
  66. *Vaughan M-A., Balnes A.D., Templeton D.M.* Multielement analysis of biological samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. II. Rapid survey method for profiling trace elements in body fluids. // *Clin. Chem.* 1991. V. 37. № 2. P. 210–215.
  67. *Huang Ch-Ch., Yang M-Hs.* Automated on-line sample pretreatment system for the determination of trace metals in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1997. V. 69. № 19. P. 3930–3939.
  68. *Krachler M., Irgolic K.J.* The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whole blood, plasma

- and serum. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1999. V. 13. № 3. P. 157–169.
69. *Begerow J., Turfeld M., Dunemann L.* New horizons in human biomonitoring of environmentally and occupationally relevant metals – sector-field ICP-MS versus electrothermal AAS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2000. V. 15. № 4. P. 347–352.
70. *Bocca B., Alimonti A., Forte G., Petrucci F., Pirola C., Senofonte O., Violante N.* High-throughput microwave-digestion procedures to monitor neurotoxic elements in body fluids by means of inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. № 1. P. 65–70.
71. *Venkatesh Iyengar G., Subramanian K.S., Woittiez J.R.W.* Element Analysis of Biological Samples: Principles and Practices, Volume II. N.Y.: CRC Press. 1997. 272 p.
72. *McCurdy E., Potter D.* Techniques for the analysis of organic chemicals by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). // Agilent Technologies. Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: <https://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-6190EN.pdf> (дата обращения: 20.04.2014).
73. *Wurfels M., Jackwerth E.* Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. // *Anal. Chim. Acta.* 1989. V. 226. № 1. P. 1–16.
74. *Wurfels M., Jackwerth E.* Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. Part 2. Identification of the reaction products. // *Anal. Chim. Acta.* 1989. V. 226. № 1. P. 17–30.
75. *Gielen M., Tiekink E.R.T.* Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. N.Y.: Wiley. 2005. 598 p.
76. *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. 1058–1072.
77. *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. 1120–1138.
78. *Rudnev A.V., Foteeva L.S., Kowol Ch., Berger R., Jakupec M.A., Arion V.B., Timerbaev A.R., Keppler B.K.* Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: Solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins // *J. Inorg. Biochem.* 2006. V. 100. № 11. P. 1819–1826.
79. *Duong H.T.T., Huynh V.T., de Souza P., Stenzel M.H.* Core-cross-linked micelles

- synthesized by clicking bifunctional Pt(IV) anticancer drugs to isocyanates. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. № 9. P. 2290–2299.
- 80.** *Gehrke H., Pelka J., Hartinger C.G., Blank H., Bleimund F., Schneider R., Gerthsen D., Bräse S., Crone M., Türk M., Marko D.* Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations. // *Arch. Toxicol.* 2011. V. 85. № 7. P. 799–812.
- 81.** OECD guideline for the testing of chemicals. Partition coefficient (n-octanol/water): Shake flask method. // OECD. URL: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-107-partition-coefficient-n-octanol-water-shake-flask-method\\_9789264069626-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-107-partition-coefficient-n-octanol-water-shake-flask-method_9789264069626-en) (дата обращения: 25.07.2014).
- 82.** *Mendoza-Ferri M.G., Hartinger Ch.G., Mendoza M.A., Groessl M., Egger A.E., Eichinger R.E., Mangrum J.B., Farrell N.P., Maruszak M., Bednarski P.J., Klein F., Jakupec M.A., Nazarov A.A., Severin K., Keppler B.K.* Transferring the concept of multinuclearity to ruthenium complexes for improvement of anticancer activity. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 4. P. 916–925.
- 83.** *Foteeva L.S., Trofimov D.A., Kuznetsova O.V., Kowol Ch.R., Arion V.B., Keppler B.K., Timerbaev A.R.* A quantitative structure-activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011. V. 55. № 3. P. 409–413.
- 84.** *Reithofer M.R., Bytzek A.K., Valiahdi S.M., Kowol Ch.R., Groessl M., Hartinger Ch.G., Jakupec M.A., Galanski M., Keppler B.K.* Tuning of lipophilicity and cytotoxic potency by structural variation of anticancer platinum(IV) complexes. // *J. Inorg. Biochem.* 2011. V. 105. № 1. P. 46–51.
- 85.** *Varbanov H., Valiahdi S.M., Legin A.A., Jakupec M.A., Roller A., Galanski M., Keppler B.K.* Synthesis and characterization of novel bis(carboxylato)dichloridobis(ethylamine) platinum(IV) complexes with higher cytotoxicity than cisplatin. // *Eur. J. Med. Chem.* 2011. V. 46. № 11. P. 5456–5464.
- 86.** *Gamelin E., Allain P., Maillart P., Turcant A., Delva R., Lortholary A., Larra F.* Long-term pharmacokinetic behavior of platinum after cisplatin administration. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1995. V. 37. №1–2. P. 97–102.
- 87.** *Gamelin E., Boull A., Boisdron-Celle M., Turcant A., Delva R., Cailleux A., Krikorian A., Brienza S., Cvitkovic E., Robert J., Larra F., Allain P.* Cumulative pharmacokinetic study

- of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. // *Clin. Cancer Res.* 1997. V. 3. № 6. P. 891–899.
88. *Gamelin E., Boisdron-Celle M., Lebouil A., Turcant A., Cailleux A., Krikorian A., Brienza S., Cvitkovic E., Larra F., Robert J., Allain P.* Determination of unbound platinum after oxaliplatin administration: comparison of currently available methods and influence of various parameters. // *Anti-cancer Drugs.* 1998. V. 9. № 3. P. 223–228.
89. *Brouwers E.E.M., Tibben M.M., Rosing H., Hillebrand M.J.X., Joerger M., Schellens J.H.M., Beijnen J.H.* Sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry assay for the determination of platinum originating from cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate. // *J. Mass Spectrom.* 2006. V. 41. № 9. P. 1186–1194.
90. *Johnsson A., Björk H., Schütz A., Skärby T.* Sample handling for determination of free platinum in blood after cisplatin exposure. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998. V. 41. № 3. P. 248–251.
91. *Liu J., Kraut E., Bender J., Brooks R., Balcerzak S., Grever M., Stanley H., D'Ambrosio S., Gibson-D'Ambrosio R., Chan K.K.* Pharmacokinetics of oxaliplatin (NSC 266046) alone and in combination with paclitaxel in cancer patients. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. V. 49. № 5. P. 367–374.
92. *Liu J., Kraut E., Bender J., Balcerzak S., Grever M., D'Ambrosio S., Chan K.K.* Dosing sequence-dependent pharmacokinetic interaction of oxaliplatin with paclitaxel in the rat. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. V. 50. № 6. P. 445–453.
93. *Sessa C., Capri G., Gianni L., Peccatori F., Grasselli G., Bauer J., Zucchetti M., Vigano L., Gatti A., Minoia C., Liati P., Bosch S., Bernareggi A., Camboni G., Marsoni S.* Clinical and pharmacological phase I study with accelerated titration design of a daily times five schedule of BBR3464, a novel cationic triplatinum complex. // *Ann. Oncol.* 2000. V. 11. № 8. P. 977–983.
94. *Sessa C., Minoia C., Ronchi A., Zucchetti M., Bauer J., Borner M., Jong J., Pagani O., Renard J., Weil C., D'Incalci M.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of the oral platinum analogue JM216 given daily for 14 days. // *Ann. Oncol.* 1998. V. 9. № 12. P. 1315–1322.
95. *Bettinelli M.* ICP-MS determination of Pt in biological fluids of patients treated with antitumor agents: evaluation of analytical uncertainty. // *Microchem. J.* 2005. V. 79.

- № 1–2. P. 357–365.
96. Carr J.L., Tingle M.D., McKeage M.J. Rapid biotransformation of satraplatin by human red blood cells in vitro. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. V. 50. № 1. P. 9–15.
  97. Morrison J.G., White P., McDougall S., Firth J.W., Woolfrey S.G., Graham M.A., Greenslade D. Validation of a highly sensitive ICP-MS method for the determination of platinum in biofluids: application to clinical pharmacokinetic studies with oxaliplatin. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000. V. 24. № 1. P. 1–10.
  98. Allain P., Berre S., Mauras Y., Bouil A. Evaluation of inductively coupled mass spectrometry for the determination of platinum in plasma. // *Biol. Mass Spectrom.* 1992. V. 21. № 3. P. 141–143.
  99. Royer B., Guardiola E., Polycarpe E., Hoizey G., Delroeux D., Combe M., Chaigneau L., Samain E., Chauffert B., Heyd B., Kantelip J.P., Pivot X. Serum and intraperitoneal pharmacokinetics of cisplatin within intraoperative intraperitoneal chemotherapy: influence of protein binding. // *Anti-cancer Drugs.* 2005. V. 16. № 9. P. 1009–1016.
  100. Bettinelli M., Spezia S., Ronchi A., Minoia C. Determination of Pt in biological fluids with ICP-MS: Evaluation of analytical uncertainty. // *Atom. Spectrosc.* 2004. V. 25. P. 103–111.
  101. Screnci D., Galettis P., Baguley B.C., McKeage M.J. Optimization of an ICP-MS assay for the detection of trace levels of platinum in peripheral nerves. // *Atom. Spectrosc.* 1998. V. 19. P. 172–175.
  102. Zhao D., Zhang Y., Xu Ch., Dong C., Lin H., Zhang L., Li C., Ren Sh., Wang X., Yang Sh., Han D., Chen X. Pharmacokinetics, tissue distribution, and plasma protein binding study of platinum originating from dicycloplatin, a novel antitumor supramolecule, in rats and dogs by ICP-MS. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2012. V. 148. № 2. P. 203–208.
  103. Casetta B., Roncadin M., Montanari G., Fulanut M. Determination of platinum in biological fluids by ICP mass spectrometry. // *Atom. Spectrosc.* 1991. V. 12. P. 81–86.
  104. Poehlen U., Rieger H., Meyer B.T., Loddenkemper Ch., Buhr H.J., Heitland P., Köster H.D., Schneider P. Chemoembolization of lung metastases – pharmacokinetic behaviour of carboplatin in a rat model. // *Anticancer Res.* 2007. V. 27. № 2. P. 809–816.
  105. Spezia S., Bocca B., Forte G., Gatti A., Mincione G., Ronchi A., Bavazzano P., Alimonti A., Minoia C. Comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry techniques in the determination of platinum in urine: quadrupole vs. sector field. // *Rapid*



- Commun. Mass Spectrom. 2005. V. 19. № 11. P. 1551–1556.
- 106.** *Tohill P., Matheson L.M., Smyth J.F.* Inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of platinum in animal tissues and a comparison with atomic absorption spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1990. V. 5. № 7. P. 619–622.
- 107.** *Hann S., Koellensperger G., Kanitsar K., Stingeder G., Brunner M., Erovic B., Müller M., Reiter C.* Platinum determination by inductively coupled plasma – sector field mass spectrometry (ICP–SFMS) in different matrices relevant to human biomonitoring. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 376. № 2. P. 198–204.
- 108.** *Nygren O., Vaughan G.T., Florence T.M., Morrison G.M.P., Warner I.M., Dale L.S.* Determination of platinum in blood by adsorptive voltammetry. // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. № 15. P. 1637–1640.
- 109.** *Charlier C., Kintz P., Dubois N., Plomteux G.* Fatal overdose with cisplatin. // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. № 2. P. 138–140.
- 110.** *Scenci D., McKeage M.J., Galettis P., Hambley T.W., Palmer B.D., Baguley B.C.* Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. // *Br. J. Cancer.* 2000. V. 82. № 4. P. 966–972.
- 111.** *Stewart I.I., Olesik J.W.* The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively coupled plasma sample introduction. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 11. P. 1249–1256.
- 112.** *Stewart I.I., Olesik J.W.* Steady state acid effects in ICP-MS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 12. P. 1313–1320.
- 113.** *Stewart I.I., Olesik J.W.* Transient acid effects in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 9. P. 843–854.
- 114.** *Todolí J-L., Mermet J-M.* Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1999. V. 54. № 6. P. 895–929.
- 115.** *Greenfield S., McGeachin McD., Smith P.B.* Nebulization effects with acid solutions in I.C.P. spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1976. V. 84. № 1. P. 67–78.
- 116.** *Maessen F.J.M.J., Balke J., Boer J.L.M.* Preservation of accuracy and precision in the analytical practice of low power ICP-AES. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1982. V. 37. № 6. P. 517–526.

117. *Canals A., Hernandis V., Todolí J-L., Browner R.F.* Fundamental studies on pneumatic generation and transport in atomic spectrometry: effect of mineral acids on emission intensity in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B*. 1995. V. 50. № 4–7. P. 305–321.
118. *Marichy M., Mermet M., Mermet J.M.* Some effects of low acid concentrations in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B*. 1990. V. 45. № 11. P. 1195–1201.
119. *Maestre S., Mora J., Todolí J-L., Canals A.* Evaluation of several commercially available spray chambers for use in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1999. V. 14. № 1. P. 61–67.
120. *Todolí J-L., Mermet J-M.* Liquid sample introduction in ICP spectrometry: A practical guide. UK: Elsevier Science. 2008. 300 p.
121. *Wiederin D.R., Houk R.S.* Measurements of aerosol particle sizes from a direct injection nebulizer. // *Appl. Spectrosc.* 1991. V. 45. № 9. P. 1408–1412.
122. *Lawrence K.E., Rice G.W., Fassel V.A.* Direct liquid sample introduction for flow injection analysis and liquid chromatography with inductively coupled plasma spectrometric detection. // *Anal. Chem.* 1984. V. 56. P. 289–292.
123. *Shum S.C.K., Neddersen R., Houk R.S.* Elemental speciation by liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization. // *Analyst.* 1992. V. 117. № 3. P. 577–582.
124. *Todolí J-L., Mermet J-M.* Minimization of the acid effects at low consumption rates in an axially-viewed inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry by using micronebulizer-based sample introduction systems. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 8. P. 727–734.
125. *Mora J., Canals A., Hernandis V., Van Veen E.H., de Loos-Vollebregt M.T.C.* Evaluation of a microwave desolvation system in inductively coupled plasma mass spectrometry with low acid concentration solutions. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 3. P. 175–181.
126. *Grégoire C.D., Goltz D.M., Lamoureux M.M., Chakrabarti C.L.* Vaporization of acids and their effect on analyte signal in electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1994. V. 9. № 9. P. 919–926.
127. *Mora J., Gras L., Veen E.H., Loos-Vollebregt M.T.C.* Electrothermal vaporization of

- mineral acid solutions in inductively coupled plasma mass spectrometry: comparison with sample nebulization. // *Spectrochim. Acta Part B*. 1999. V. 54. № 6. P. 959–974.
- 128.** *Park C.J., Loon J.C., Arrowsmith P., French J.B.* Sample analysis using plasma source mass spectrometry with electrothermal sample introduction. // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 2191–2196.
- 129.** *Guo W., Hu Sh., Zhang J., Hu Zh., Zhang H., Wang Y.* Reduction of acid effects on trace element determination in food samples by CH<sub>4</sub> mixed plasma-DRC-MS. // *Talanta*. 2012. V. 91. P. 60–64.
- 130.** *Dams R.F.J., Goossens J., Moens L.* Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry. // *Mikrochim. Acta*. 1995. V. 119. № 3–4. P. 277–286.
- 131.** *Olivares J.A., Houk R.S.* Suppression of analyte signal by various concomitant salts in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. № 1. P. 20–25.
- 132.** *Kawaguchi H., Tanaka T., Mizuike A.* Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Sci.* 1987. V. 3. № 4. P. 305–308.
- 133.** *Kim Y-S., Kawaguchi H., Tanaka T., Mizuike A.* Non-spectroscopic matrix interferences in inductively coupled plasma – mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B*. 1990. V. 45. № 3. P. 333–339.
- 134.** *Tan S.H., Horlick G.* Matrix-effect observations in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1987. V. 2. № 8. P. 745–763.
- 135.** *Tanner S.D.* Characterization of ionization and matrix suppression in inductively coupled ‘cold’ plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1995. V. 10. № 11. P. 905–921.
- 136.** *Rodushkin I., Ruth T., Klockare D.* Non-spectral interferences caused by a saline water matrix in quadrupole and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1998. V. 13. № 3. P. 159–166.
- 137.** *Карандашев В.К., Туранов А.Н., Орлова Т.А., Лежнев А.Е., Носенко С.В., Золотарева Н.И., Москвина И.П.* Использование метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой в элементном анализе объектов окружающей среды. // *Завод. лаб.* 2007. Т. 73. № 1. С. 12–22.
- 138.** *Gillson G.R., Douglas D.J., Fulford J.E., Halligan K.W., Tanner S.D.* Nonspectroscopic

- interelement interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 1472–1474.
- 139.** *Gregoire D.C.* The effect of easily ionizable concomitant elements on non-spectroscopic interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1987. V. 42. № 7. P. 895–907.
- 140.** *Falk H., Geerling R., Hattendorf B., Kregel-Rothensee K., Schmidt K.P.* Capabilities and limits of ICP-MS for direct determination of element traces in saline solutions. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997. V. 359. № 4–5. P. 352–356.
- 141.** *Fraser M.M., Beauchemin D.* Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2000. V. 55. № 11. P. 1705–1731.
- 142.** *Park K-S., Kim S-T., Kim Y-M., Kim Y., Lee W.* The matrix effect of biological concomitant element on the signal intensity of Ge, As, and Se in inductively coupled plasma/mass spectrometry. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2002. V. 23. № 10. P. 1389–1393.
- 143.** *Beauchemin D., Mcharen J.W., Berman S.S.* Use of external calibration for the determination of trace metals in biological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1988. V. 3. № 6. P. 775–780.
- 144.** *Xu Q., Balik D., Agnes G.R.* Aerosol static electrification and its effects in inductively coupled plasma spectroscopy. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2001. V. 16. № 6. P. 715–723.
- 145.** *Borowiec J.A., Boorn A.W., Dillard J.H., Cresser M.S., Browner R.F.* Interference effects from aerosol ionic redistribution in analytical atomic spectrometry. // *Anal. Chem.* 1980. V. 52. P. 1054–1059.
- 146.** *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 Part B.* 2003. V. 58. № 11. P. 1927–1944.
- 147.** *Karandashev V.K., Leykin A.Yu., Zhernokleeva K.V.* Reduction of matrix effects in ICP-MS by optimizing settings of ion optics. // *J. Anal. Chem.* 2014. V. 69. № 1. P. 22–30.
- 148.** *Crain J.S., Houk R.S., Smith F.G.* Matrix interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry: some effects of skimmer orifice diameter and ion lens voltages. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1988. V. 43. № 9–11 P. 1355–1364.
- 149.** *Agatemor Ch., Beauchemin D.* Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review. // *Anal. Chim. Acta.* 2011. V. 706. № 1. P. 66–83.

150. *Björn E., Frech W.* Non-spectral interference effects in inductively coupled plasma mass spectrometry using direct injection high efficiency and microconcentric nebulisation. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2001. V. 16. № 1. P. 4–11.
151. *Evans E.H., Giglio J.J.* Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1993. V. 8. № 1. P. 1–18.
152. *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 Part B.* 2011. V. 66. № 1. P. 1–11.
153. *Mora J., Hernandis V., Canals A.* Influence of solvent physical properties on drop size distribution, transport and sensitivity in flame atomic absorption spectrometry with pneumatic nebulization. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1991. V. 6. № 7. P. 573–579.
154. *Bellato A.C.S., Gine M.F., Menegário A.A.* Determination of B in body fluids by isotope dilution inductively coupled mass spectrometry with direct injection nebulization. // *Microchem. J.* 2004. V. 77. № 2. P. 119–122.
155. *Llorente I., Gómez M., Cámara C.* Improvement of selenium determination in water by inductively coupled plasma mass spectrometry through use of organic compounds as matrix modifiers. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1997. V. 52. № 12. P. 1825–1838.
156. *Olivas R.M., Quétel C.R., Donard O.F.X.* Sensitive determination of selenium by inductively coupled plasma mass spectrometry with flow injection and hydride generation in the presence of organic solvents. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1995. V. 10. № 10. P. 865–870.
157. *Boorn A.W., Cresser M.S., Browner R.F.* Evaporation characteristics of organic solvent aerosols used in analytical atomic spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1980. V. 35. № 11–12. P. 823–832.
158. *Todolí J-L., Canals A., Hernandis V.* Behaviour of single-bore high pressure pneumatic nebulizer operating with alcohols in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1996. V. 11. № 10. P. 949–956.
159. *Kralj P., Veber M.* Investigation into Nonspectroscopic effects of organic compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Acta Chim. Slov.* 2003. V. 50. № 4. P. 633–644.
160. *Shuqin C., Hangting Ch., Xianjin Z.* Determination of mercury in biological samples

- using organic compounds as matrix modifiers by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1999. V. 14. № 8. P. 1183–1186.
- 161.** *Beauchemin D., Siu K.W.M., McLaren J.W., Berman S.S.* Determination of arsenic species by high-performance liquid chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1989. V. 4. № 3. P. 285–289.
- 162.** *Larsen E.H., Stürup S.* Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1994. V. 9. № 10. P. 1099–1105.
- 163.** *Hu Zh., Hu Sh., Gao Sh., Liu Y., Lin S.* Volatile organic solvent-induced signal enhancements in inductively coupled plasma-mass spectrometry: a case study of methanol and acetone. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2004. V. 59. № 9. P. 1463–1470.
- 164.** *Xie H., He X., Li Y.* Enhancement effects of oxalic acid for inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Metall. Anal.* 2007. V. 27. № 2. P. 13–17.
- 165.** *Dressler V.L., Pozebon D., Curtius A.J.* Introduction of alcohols in inductively coupled plasma mass spectrometry by a flow injection system. // *Anal. Chim. Acta.* 1999. V. 379 № 1–2. P. 175–183.
- 166.** *Goossens J., Vanhaecke F., Moens L., Dams R.* Elimination of interferences in the determination of arsenic and selenium in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1993. V. 280. № 1. P. 137–143.
- 167.** *Longerich H.R.* Effect of nitric acid, acetic acid and ethanol on inductively coupled plasma mass spectrometric ion signals as a function of nebuliser gas flow, with implications on matrix suppression and enhancements. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1989. V. 4. № 7. P. 665–667.
- 168.** *Allain P., Jaunault L., Mauras Y., Mermet J-M., Delaporte T.* Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Anal. Chem.* 1991. V. 63 P. 1497–1498.
- 169.** *Vanhaecke F., Dams R., Vandecasteele C.* ‘Zone model’ as an explanation for signal behaviour and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1993. V. 8. № 3. P. 433–438.
- 170.** *Tangen A., Lund W.* A multivariate study of the acid effect and the selection of internal standards for inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1999. V. 54. № 13. P. 1831–1838.

171. *Sartoros Ch., Salin E.D.* Automatic selection of internal standards in inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1999. V. 54. № 11. P. 1557–1571.
172. *Thompson J.J., Houk R.S.* A study of internal standardization in inductively coupled plasma – mass spectrometry. // *Appl. Spectrosc.* 1987. V. 41. № 5. P. 801–806.
173. *McLaren J.W., Beauchemin D., Berman S.S.* Analysis of the marine sediment reference material PACS-1 by inductively coupled plasma mass spectrometry. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1988. V. 43. № 4–5. P. 413–420.
174. *Boer J.L.M., Ritsema R., Piso S., Staden H., Beld W.* Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP–MS with special attention to urine and whole blood. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 379. № 5–6. P. 872–880.
175. *Niemelä M., Kola H., Perämäki P., Piispanen J., Poikolainen J.* Comparison of microwave-assisted digestion methods and selection of internal standards for the determination of Rh, Pd and Pt in dust samples by ICP-MS. // *Microchim. Acta.* 2005. V. 150. № 3–4. P. 211–217.
176. *Vanhaecke F., Vanhoe H., Dams R.* The use of internal standards in ICP-MS. // *Talanta.* 1992. V. 39. № 2. P. 131–142.
177. *Vandecasteele C., Nagels M., Vanhoe H., Dams R.* Suppression of analyte signal in inductively coupled plasma/mass spectrometry and the use of an internal standard. // *Anal. Chim. Acta.* 1988. V. 211. P. 91–98.
178. *Finley-Jones H.J., Molloy J.L., Holcombe J.A.* Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP(TOF)MS. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2008. V. 23. № 9. P. 1214–1222.
179. *Marshall J., Franks J.* Matrix interferences from methacrylic acid solutions in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1991. V. 6. № 8. P. 591–600.
180. *Rupprecht M., Probst T.* Development of a method for the systematic use of bilinear multivariate calibration methods for the correction of interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. // *Anal. Chim. Acta.* 1998. V. 358. № 3. P. 205–225.
181. *Chen X., Houk R.S.* Polyatomic ions as internal standards for matrix corrections in inductively coupled plasma mass spectrometry. // *J. Anal. At. Spectrom.* 1995. V. 10. № 10. P. 837–841.

- 182.** *Al-Ammar A.S., Gupta R.K., Barnes R.M.* Correction for non-spectroscopic matrix effects in inductively coupled plasma – mass spectrometry by common analyte internal standardization. // *Spectrochim. Acta Part B.* 1999. V. 54. № 13. P. 1849–1860.
- 183.** *Al-Ammar A.S.* Simultaneous correction for drift and non-spectroscopic matrix effect in the measurement of geological samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry using common analyte internal standardization chemometric technique. // *Spectrochim. Acta Part B.* 2003. V. 58. № 8. P. 1391–1401.
- 184.** *Rodrigues J.L., Nunes J.A., Batista B.L., Souza S.S., Barbosa Jr. F.* A fast method for the determination of 16 elements in hair samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2008. V. 23. № 7. P. 992–996.
- 185.** *Batista B.L., Rodrigues J.L., Oliveira Souza V.C., Barbosa Jr. F.* A fast ultrasound-assisted extraction procedure for trace elements determination in hair samples by ICP-MS for forensic analysis. // *Forensic Sci. Int.* 2009. V. 192. № 1–3. P. 88–93.
- 186.** *Awad S., Allison S. P., Lobo D.N.* The history of 0.9% saline. // *Clin. Nutr.* 2008. V. 27. № 2. P. 179–188.
- 187.** *Chutipongtanate S., Thongboonkerd V.* Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 402. № 1. P. 110–112.
- 188.** *May T.W., Wiedmeyer R.H.* A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. // *Atom. Spectrosc.* 1998. V. 19. P. 150–155.
- 189.** *Скальный А.В.* Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Оникс 21 век. 2004. 216 с.
- 190.** *Lide D. R., Raton B.* CRC handbook of chemistry and physics, 89th edition. UK: CRC Press. 2008. 2736 p.
- 191.** *Grabmann G., Meier S.M., Scaffidi-Domianello Y.Y., Galanski M., Keppler B.K., Hartinger C.G.* Capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry studies on the behavior of anticancer cis- and trans-[dihalidobis(2-propanone oxime)platinum(II)] complexes in aqueous solutions. // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1267. P. 156–161.
- 192.** *Bartel C., Bytzek A.K., Scaffidi-Domianello Y.Y., Grabmann G., Jakupec M.A., Hartinger C.G., Galanski M., Keppler B.K.* Cellular accumulation and DNA interaction studies of cytotoxic trans-platinum anticancer compounds. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2012.



V. 17. № 3. P. 465–474.

- 193.** *Hansch C., Leo A., Hoekman D.H.* Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. W.: American Chemical Society. 1995. 584 p.