

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРАНА В МОЧЕ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ

Иваненко Н.Б., Наволоцкий Д.В., Иваненко А.А., Соловьев Н.Д.* , Блаженникова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»,

*192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1, (812)372-5110, * nickslovev@gmail.com*

Резюме: В работе предложена методика определения урана в моче методом масс-спектрометрии высокого разрешения с индуктивно связанной плазмой. Показана необходимость проведения микроволнового разложения образцов мочи, оптимизированы условия проведения анализа, оценены метрологические характеристики разработанной методики. Полученная градуировочная зависимость для определения урана (диапазон концентраций от 0,01 до 10 мкг/л) характеризуется коэффициентом линейной регрессии равным 0,998. Предел обнаружения (3 σ -критерий, n = 9) составил 2 нг/л. Правильность анализа была доказана анализом стандартного образца состава мочи человека Seronorm™ Trace Elements Urine, а также методом стандартных добавок во всем диапазоне определяемых концентраций. Значения относительных стандартных отклонений (Sr) для диапазона концентраций урана от 0,01 до 1 мкг/л составили от 5 до 10%. При концентрациях свыше 1 мкг/л Sr не превышает 2-3 %. С использованием разработанной методики были проведены доклинические исследования фармацевтических препаратов. На основании данных о концентрации урана в моче на беспородных крысах самцах оценена эффективность экспериментальной терапии, направленной на выведение урана из организма.

Ключевые слова: уран, моча, ИСП-МС, микроволновое разложение, лекарственные средства

DETERMINATION OF URANIUM IN URINE BY SECTOR FIELD ICP-MS

Ivanenko N.B., Navolotskiy D.V., Ivanenko A.A., Solovyev N.D., Blazhennikova I.V.

*«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency,
192019 Saint-Petersburg, ulitza Behtereva, 1, (812)372-5110, * nickslovev@gmail.com*

Abstract: A method of urinary uranium determination based on sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (SF-ICP-MS) has been suggested. For U determination in urine, the necessity of microwave sample digestion was shown. Analytical parameters were optimized, for both sample pretreatment and SF-ICP-MS detection. After the fulfillment of optimization stage, analytical figures of merit were estimated. The linear regression coefficient of the resulting calibration curve (concentration range of 0.01 to 10 µg / L) was found to be 0.998. Detection limit (3σ , $n = 9$) was 2 ng/l. The accuracy of the results was validated by analyzing the reference material Seronorm™ Trace Elements Urine and spiked urine samples for the validation in the whole dynamic range. For uranium concentration range of 0.01 to 1 mg/l, relative standard deviation (R.S.D.) ranged from 5 to 10%. For concentrations above 1 mg / l , R.S.D. did not exceed 2-3%. Preclinical studies of pharmaceuticals were carried out using the designed method. The efficiency of uranium eliminating therapy was evaluated on the basis of urinary uranium measurement in outbred male rats.

Keywords: Uranium, urine, ICP-MS, microwave digestion, pharmaceuticals

Введение

В процессе технического прогресса человечество приобретает возможность использовать новые технологии, новые материалы с уникальными свойствами и характеристиками. Однако побочным эффектом этого развития является появление новых, потенциально опасных воздействий на организм человека. Уран традиционно применяется в атомной и военной промышленности. Обеднённый уран, благодаря высокой плотности (уран — 19,3 г/см³, свинец — 11,3 г/см³) и атомной массе, используется для радиационной защиты, как балластовая масса в аэрокосмических аппаратах, в роторах гироскопов, больших маховиках, клинической технике для защиты при рентгенологических обследованиях. Переработка природного урана, хранение отходов, применение обеднённого урана могут наносить вред здоровью человека [1].

Особенностью вредного воздействия урана на организм является совокупность его радиационной активности и химической токсичности как тяжёлого элемента. При попадании в организм в ранние сроки воздействия преобладает химическая токсичность урана. В

первую очередь поражаются почки. В организме уран в основном связан в карбонатные/бикарбонатные комплексы, например, $[\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2]^{2-}$. Эти комплексы стабильны при нейтральном pH (в крови) и не обладают высокой реакционной способностью. Однако, при низком pH (в моче) выделяется высоко реакционно-способный ион уранила $[\text{UO}_2]^{2+}$. Повышение уровня урана в организме приводит к снижению клубочковой фильтрации в почках, канальцевой секреции органических анионов, реабсорбции глюкозы и аминокислот в проксимальных канальцах [2, 3]. Также развивается урановая нефропатия и некроз почек, происходят изменения ферментативной активности, нарушается функция нервной системы и обмена веществ. В поздний период воздействия сказывается радиационное действие урана — происходит нарушение кроветворения и развивается рак костного мозга.

В организме уран депонируется в основном в почках и костной ткани, замещая кальций в гидроксоапатите, выводится с мочой [4]. Поскольку основным органом-мишенью, как для химического, так и для радиационного поражения ураном, являются почки, то наиболее информативным биоматериалом при проведении исследований является моча [5].

Существующая в настоящее время терапия урановых отравлений недостаточно эффективна. Для создания эффективной фармакологической терапии острых отравлений и хронических интоксикаций соединениями урана необходимы надежные аналитические методики его определения в биологических жидкостях, в первую очередь, в моче для контроля выведения урана из организма.

Содержание урана в моче по разным источникам составляет 0.04-0.4 мкг/л [6], 15-30 нг/день [7], 30-60 нг/л [5], 5-50 нг/л [8]. Концентрация урана в моче, даже при отравлениях, малы, поэтому необходимы высокочувствительные методы определения урана. Для определения урана используют методы спектрофотометрии в видимом и УФ-спектре [9, 10], флуориметрии и фосфориметрии [11, 12], измерение альфа-радиоактивности [13], нейтронно-активационный анализ [14] и масс-спектрометрии [15].

Метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) позволяет наиболее эффективно решать задачу определения микроэлементов в биологических средах [16]. Целью данной работы была разработка методики определения урана в моче методом масс-спектрометрии высокого разрешения с индуктивно связанной плазмой. В ходе работы были поставлены задачи выбора и оптимизации условий проведения анализа, определения метрологических характеристик методики, а также оценки эффективности выведения урана при использовании экспериментальных лекарственных препаратов.

Материалы и методы

Приборы. Измерения проводились на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой высокого разрешения Thermo Scientific™ Element 2 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Разложение образцов мочи проводили с использованием системы микроволновой пробоподготовки Start D (Milestone, Италия). Для получения ультрачистой воды применяли систему MilliQ Advantage A10 (Millipore, Франция). Для приготовления растворов применялись одноканальные пипетки переменного объема 5÷50 мкл и 1000÷5000 мкл, погрешность измерения не более 5%.

Стандартные образцы и реактивы. Стандартный раствор ионов урана 10 мг/л (High-Purity Standards™, ICP-MS Calibration Standard). Стандартный образец состава мочи Seronorm™ Trace Elements Urine (Ref 201205, Lot 0511545, Sero, Норвегия), кислота азотная концентрированная (Merck, Германия).

Построение градуировочных зависимостей. Градуировочные характеристики получали с использованием водных стандартных растворов урана. Для построения градуировочных зависимостей в распылительную камеру подавались градуировочные водные растворы с концентрацией урана 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 и 10 мкг/л. Аналитические сигналы измеряли ($n = 9$) в соответствии с оптимизированными условиями (таблица 2).

Анализируемые образцы. Пробы мочи были разложены с использованием микроволнового излучения в микроволновом минерализаторе Milestone Start D.

Проведение измерений. Анализ проб мочи проводили в соответствии с оптимизированными параметрами. В качестве холостого образца использовали раствор азотной кислоты, прошедший все стадии подготовки аналогично анализируемым пробам.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе методических исследований для определения урана в моче использовали непосредственный ввод разбавленных проб в индуктивно связанную плазму. Однако капилляр распылителя быстро засорялся даже при использовании 100-кратного разбавления проб. Поэтому применяли микроволновое разложение проб. В лайнер для разложения помещали 0,5 мл образца мочи, 2 мл концентрированной азотной кислоты, 6 мл деионизованной воды разлагали в течение 25 минут в соответствии с оптимизированной температурно-временной программой, представленной в таблице 1.

Таблица 1. Температурно-временная программа разложения образцов мочи

Время, мин.	Мощность, Вт	Температура, °C
5,00	350	80
3,30	1000	160

4,30	1100	190
12,00	800	190

При разработке методики было необходимо оптимизировать условия проведения анализа. В первую очередь, выбрать режим разрешения масс-анализатора. Масс-спектрометр высокого разрешения Element 2 с индуктивно связанной плазмой в качестве источника ионов позволяет проводить измерения при 3х уровнях разрешениях масс-спектра: низком ($R=300$), среднем ($R=4000$) и высоком ($R=10000$). Низкое разрешение применяется в основном для определения изотопов, свободных от спектральных наложений изобарных и 2-х зарядных ионов, а также полиатомных ионов различной природы. Данный режим работы прибора обеспечивает наибольшую чувствительность определения. Работа на среднем и высоком разрешении позволяет устранить спектральные помехи, но для этих режимов характерно снижение чувствительности определения.

Поскольку содержание урана в моче мало, то низкое разрешение, при котором чувствительность определения максимальная, наиболее предпочтительно. Однако при определении урана по изотопу с атомной массой 238 на низком разрешении возможно наложение аргидов ртути ($^{198}\text{Hg}^{40}\text{Ar}^+$, $^{200}\text{Hg}^{38}\text{Ar}^+$ и $^{202}\text{Hg}^{36}\text{Ar}^+$). На среднем разрешении, спектральные помехи для определения урана отсутствуют. Оценка распространенности изотопов мешающих ионов ($^{198}\text{Hg} - 10,0\%$, $^{200}\text{Hg} - 23,3\%$, $^{202}\text{Hg} - 29,8\%$, $^{40}\text{Ar} - 99,6\%$, $^{38}\text{Ar} - 0,06\%$, $^{36}\text{Ar} - 0,34\%$) показала, что заметный вклад в аналитический сигнал урана при низком разрешении может вносить только $^{198}\text{Hg}^{40}\text{Ar}^+$.

Подтверждением правильности выбора разрешения может служить сравнение интенсивностей аналитических сигналов при разных уровнях разрешениях, учитывая эмпирическую зависимость, что при переходе от низкого разрешения к среднему, при отсутствии наложений, аналитический сигнал уменьшается примерно в 10 раз. Для стандартного раствора, содержащего ионы урана и ртути равных концентраций, рассчитанное отношение сигналов составило в 10,5. Это подтверждает отсутствие спектральных наложений. Для реальных проб мочи возможно появление систематических погрешностей, обусловленных неучтенными матричными влияниями, т.к. моча является сложным биологическим объектом, который содержит органические и неорганические компоненты: азотистые продукты распада белков, хлориды, сульфаты, фосфаты и др.

Для того чтобы убедиться в отсутствии неучтенных спектральных интерференций, были проанализированы реальные образцы мочи на низком и среднем разрешении. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения урана в моче на среднем и низком разрешении прибора

Маркировка пробы	Концентрация урана $C \pm \Delta C$ ($n=9$, $P=0.95$), мкг/л	
	Среднее разрешение ($R = 4000$)	Низкое разрешение ($R = 300$)
G-2	$6,51 \pm 0,26$	$6,87 \pm 0,13$
K-5	$5,18 \pm 0,24$	$5,41 \pm 0,02$
Ур-9	$21,6 \pm 0,7$	$21,2 \pm 0,3$
R-5	$2,01 \pm 0,20$	$1,98 \pm 0,07$

Получено, что концентрации урана в моче на среднем и низком разрешении сопоставимы, что подтверждает правильность выбранного разрешения. На рисунке 1 представлен масс-спектр урана при среднем и низком разрешении.

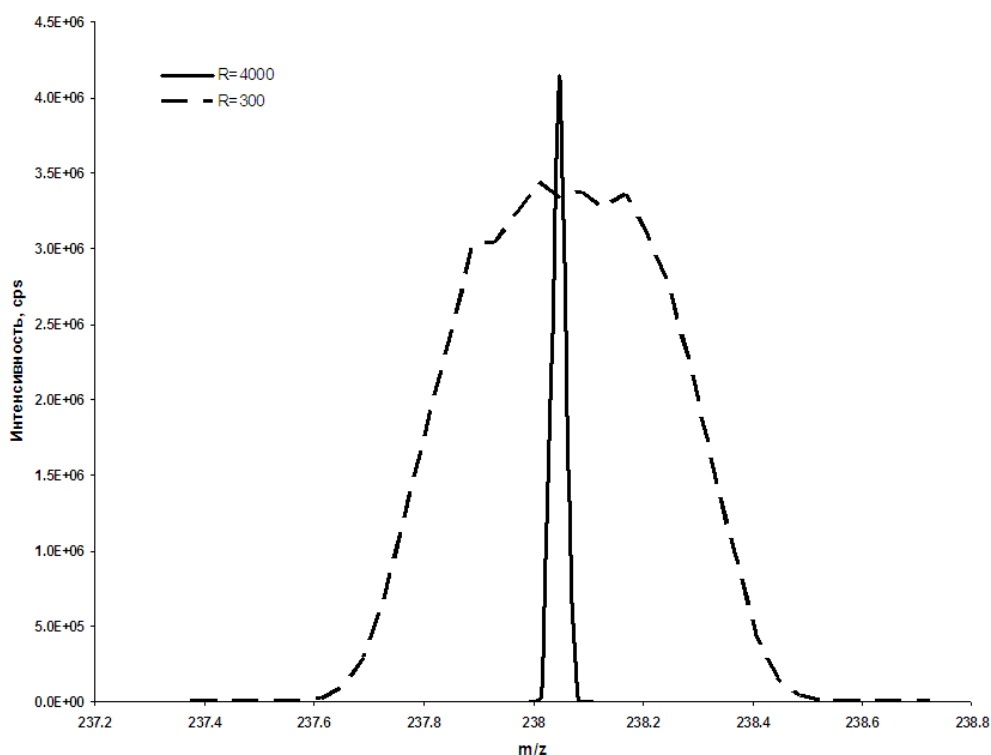


Рис. 1. Масс-спектр образца мочи (после микроволнового разложения проб) для среднего ($R=4000$) и низкого ($R=300$) разрешения масс-анализатора

Помимо выбора разрешения прибора необходима также оптимизация ряда

параметров, которые отражают индивидуальные особенности прибора и не могут быть напрямую перенесены с других приборов данной серии. К таким параметрам относятся положение горелки относительно входного конуса масс-спектрометра, мощность ВЧ-генератора и скорости газовых потоков.

Подача пробы в распылительную камеру осуществляется за счет капиллярных сил и пониженного давления, создаваемого потоком газа носителя. В этой ситуации уникальной характеристикой ввода пробы, определяющей оптимальную скорость газа потока, является динамическое сопротивление капилляра, которое зависит от вязкости анализируемого раствора. Скорость потока не должна быть слишком высокой, поскольку это приводит к отрыву капель пробы с капилляра и, следовательно, пульсации потока и снижению воспроизводимости результатов анализа. Недостаточная скорость потока приводит к образованию капли на конце капилляра и, как следствие, к эффекту памяти и возникновению систематической ошибки. Оптимальная скорость потока газа носителя была выбрана на основе визуальных наблюдений, как максимальная скорость потока, при которой отсутствует пульсация при образовании аэрозоля анализируемого раствора. При анализе использовали скорости плазмообразующего и охлаждающего потоков рекомендованные производителем.

Индуктивно связанная плазма определяет состав ионного пучка, попадающего в масс-спектрометр. Основными параметрами, оказывающие значительное влияние на эффективность ионизации аналита, являются мощность ВЧ-генератора, положение горелки по отношению к входному конусу масс-спектрометра и скорости газовых потоков. Все эти параметры тесно связаны друг с другом и требуют синхронной оптимизации. Так скорости газовых потоков определяют насыщенность плазмы аэрозолем анализируемого раствора, и, следовательно, задают необходимую для оптимальной ионизации анализируемых атомов мощность ВЧ-генератора. Положение горелки относительно конусов определяет зону в плазме, из которой в масс-спектрометр будет поступать поток ионов.

Была проведена оптимизация мощности ВЧ-генератора и положения горелки относительно входных конусов масс-спектрометра. Границы изменения положения горелки определялись особенностями конструкции прибора. За оптимальные принимались значения параметров, которые обеспечивали максимальный аналитический сигнал при минимальном относительном стандартном отклонении результатов. Условия проведения анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3. Оптимальные условия измерений при определении урана.

Параметр	Значение
Разрешение	Низкое ($R=300$)
Мощность ВЧ-генератора	980 Вт
Положение горелки	-6,5 мм
Скорость газа носителя	0,91 мл/мин
Скорость плазмообразующего газа	0,73 мл/мин
Скорость охлаждающего газа	16,40 мл/мин

Коэффициент линейной регрессии для градуировочной зависимости, построенной в интервале концентраций от 0,01 до 10 мкг/л, составил 0,998. Предел обнаружения урана, оценённый по критерию 3σ , составил 2 нг/л.

Правильность определения урана в моче по разработанной методике оценили с использованием стандартного образца состава мочи человека. Был проанализирован стандартный образец состава мочи, паспортная концентрация урана в котором составляла 0,066 мкг/л. Измеренная концентрация составила $0,067 \pm 0,006$ мкг/л. Для больших концентраций использовали метод стандартных добавок. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты оценки воспроизводимости и правильности определения урана в моче.

$C_{\text{моча}}$, мкг/л	$C_{\text{доб.}}$, мкг/л	$C_{\text{моча+доб.}}$, мкг/л	$Sn_{\text{моча}}$, мкг/л	$Sn_{\text{моча+доб.}}$, мкг/л	$t_{\text{рассчит}}$ ($n=9, p=0,95$)	$t_{\text{табл}}$ ($n=9, p=0,95$)
1,02	1,00	1,95	0,01	0,03	1,00	2,31
1,02	2,00	2,92	0,01	0,02	1,44	2,31

Рассчитанные значения коэффициентов Стьюдента не превышают табличного значения, что подтверждает правильность разработанной методики. Также была оценена воспроизводимость результатов анализа проб мочи. Значения относительных стандартных отклонений для диапазона концентраций урана от 0,01 до 1 мкг/л составили от 5 до 10%. При концентрациях свыше 1 мкг/л воспроизводимость (S_r) результатов не превышала 2-3%. С использованием разработанной методики были проведены доклинические исследования фармацевтических препаратов для лечения урановых интоксикаций. На основании данных о концентрации урана в моче на беспородных крысах самцах оценена эффективность экспериментальной терапии, направленной на выведение урана из

организма. Были исследованы два фармпрепарата (зашифровано). Найдено, что содержание урана в моче крыс, получавших экспериментальную терапию, составило 3234 ± 78 нг/(ммоль креатинина) и 1093 ± 35 нг/(ммоль креатинина) для первого и второго препарата соответственно. Нормальное содержание урана составило 42 ± 5 нг/(ммоль креатинина). Количество урана, выведившегося без лечения, составило 796 ± 28 нг/(ммоль креатинина). Таким образом, показана возможность применения разработанной методики для проведения доклинических испытаний лекарственных средств.

Выводы

Разработана методика определения урана в моче методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Выбраны и оптимизированы условия определения урана в моче. Оценена метрологические характеристики разработанной методики. Методика применена для проведения доклинических исследований.

Благодарности

Авторы выражают благодарность лаборатории Лекарственной токсикологии Института токсикологии ФМБА России (зав. лаб. Т.Н. Саватеева-Любимова) за предоставленные образцы.

Литература

1. Bleise A., Danesi P.R., Burkart W. Properties, Use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview // J. Environ. Radioactiv. – 2003. – Vol. 64, № 3 – P. 112.
2. Галибин Г.П., Новиков Ю.В. Токсикология промышленных соединений урана. М.: Атомиздат, 1976. – 175 с.
3. Public health goal for uranium in drinking water // California Environmental Protection Agency, 2001. – 30 P.
4. Taylor D.M., Taylor S.K. Environmental uranium and human health // Rev. Environm. Health. 1997. – Vol. 12. – P. 147-157.
5. Uranium and human biomonitoring // Opinion of the human biomonitoring commission of the german federal environment agency, Gesundheitsschutz, 2005. – Vol. 7. – P. 822-827.
6. Snyder W.S., Cook M.J. Report of task group on reference man, Publication 23 // International Commission on Radiology Protection, Oxford, 1975.
7. Roth P., Werner E., Paretzke H.G., A study of uranium excreted in urine, research report // Federal Ministry of Defense, Neuherberg, 2001. – 36 P.
8. Stolarz A., Alonso A., De Bolle W., Kuhn H., Richter S., Quetel C., Ponzevera E., Verbruggen A., Wellum R. Preparation of simulated urine samples containing certified uranium for the NUSIMEP 4 campaign // Joint Research Centre. Belgium, 2005. – 6 P.

9. Kressin I.K. Spectrophotometric method for the determination of uranium in urine // *Anal. Chem.* – 1984. – Vol. 56. – P. 2269-2271.
10. Nakashima T., Yoshimura K, Taketatsu T. Determination of Uranium (vi) in seawater by ion-exchanger phase absorptiometry with Arsenazo III // *Talanta.* – 1992. – Vol. 39. – P. 523.
11. Centanni E A., Ross A. M., DeSesa M. A, Fluorometric determination of uranium // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 1651.
12. Moore L. L., Williams R. L. A rapid method for determining nanogram quantities of uranium in urine using the kinetic phosphorescence analyzer // *J. Radioanal. Nucl. Ch.* – 1992. – Vol. 156. – P. 223-227.
13. Harley J. H. Radiochemical determination of isotopic uranium, method EU-04 // New York: Environmental Measurements Laboratory, 1979. – 27 p.
14. Ide H.M., Moss W.D. ,Minor M.M., Campbell E.E. Analysis of uranium in urine by delayed neutrons // *Health Physics.* – 1979. – Vol. 37. – P. 405-409.
15. Bogard J. S. Review of uranium bioassay techniques // OAK ridge national laboratory. Tennessee, 1996. – 21 p.
16. Uranium in Urine: Quantification and isotope ratio determination // Thermo Fisher Scientific, Application Note 30008. – 2007. – 4 p.