

УДК 543.51: 621.384.5]: 612.1.001.4

© А. К. Шулипа, А. Д. Андреева, Л. Н. Галль, С. Н. Кольцов, А. Г. Кузьмин

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА БИОПРОБ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ТЛЕЮЩЕГО РАЗРЯДА

В данной статье рассматривается возможность использования масс-спектрометрии тлеющего разряда для элементного анализа солей металлов. Проанализированы способы крепления пробы в газоразрядной ячейке и получены спектры солей никеля и цинка, нанесенных на индиевую подложку.

ВВЕДЕНИЕ

Новые технические возможности в медицинских исследованиях позволили в последние десятилетия существенно расширить понимание роли различных процессов и факторов, отвечающих за здоровое функционирование живого организма. Одним из таких факторов является элементный статус организма. Микроэлементы Fe, J, Cu, Zn, Ni, Se, Mn, F, Si, Li и многие другие принимают активное участие в биохимических процессах, протекающих в организме. В связи с этим зачастую для диагностики различных патологических состояний и ряда заболеваний необходимым и достаточным является точное количественное определение элементного состава микроэлементов, характерного для пациента. В качестве объекта исследования могут использоваться различные ткани и биологические жидкости организма. Количественное определение содержания элементов в биопробах в первую очередь связано с разработкой методик их измерения. Все эти методики включают в себя стадии пробоподготовки и стадии анализа и должны учитывать целый ряд специфических свойств биопробы, таких как неоднородность химического состава и большой набор содержащихся в пробе элементов, имеющих к тому же значительный разброс в концентрациях. На сегодняшний день основными методами элементного анализа биопроб являются: атомно-адсорбционная спектроскопия (ААС) и различные методы эмиссионной спектроскопии, прежде всего с возбуждением в индуктивно связанной плазме (ИСП-АЭС). Среди масс-спектрометрических методов элементного анализа, наиболее информационных и экспрессных, для анализа биопроб использовалась только ИСП-МС — масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой, но анализы этим методом достаточно дорогие и требуют использования особо чистых реактивов. Успехи

масс-спектрометрии с тлеющим разрядом (ТлР-МС) как метода, альтернативного ИСП-МС, не требующего растворения пробы и потребляющего на три порядка меньше аргона, чем ИСП-МС, побудили провести исследования возможности ТлР-МС в задаче определения элементного статуса организма.

1. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования для определения концентраций микро- и макроэлементов, содержащихся в организме, была выбрана нативная кровь. Благодаря большой подвижности и проникающей способности крови, она является информативным показателем состояния организма в течение относительно небольшого отрезка времени перед анализом, в то время как распространенные для такого анализа биопробы, такие как волосы или ногти, являющиеся тканями-накопителями, хорошо представляют элементный статус организма за длительное время. Для проведения анализа необходим перевод исследуемой биологической пробы в однородное состояние с максимально высокой концентрацией микроэлементов. Такой перевод может быть осуществлен с помощью процедуры минерализации¹⁾. В результате минерализации пробы крови, проводимой при высокой температуре в атмосфере инертного газа, образуется смесь солей и окислов элементов, содержащихся в крови. Эта сложная смесь, содержащая в основном соединения железа, натрия

¹⁾ Под минерализацией понимают разложение органических веществ и материалов на их основе с целью выделения определяемых элементов в виде устойчивых неорганических соединений, удобных для последующего анализа [9].

и калия и в виде микропримесей соединения многих других элементов, в дальнейшем может быть проанализирована методом ТЛР-МС.

На первых стадиях разработки методики решения данной задачи достаточно использовать модельные соли тех элементов, присутствие которых в крови представляет наибольший интерес с медицинской точки зрения [1].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования проводились на приборе МСД-650ТЛР, разработанном в ИАП РАН [2]. В приборе используется статический масс-анализатор с двойной фокусировкой прямой геометрии (Е-М), обеспечивающий при ионизации электронным ударом возможность получения высокой рабочей разрешающей способности $R_{10\%}$: порядка 10 000. В рабочем режиме при ионизации электронным ударом давление паров остаточного газа в камере анализатора поддерживается на уровне $0.5-1 \cdot 10^{-4}$ Па. Для реализации ионизации твердых проб методом тлеющего разряда источник ионов с электронным ударом был заменен на источник ионов с тлеющим разрядом.

В этом источнике ионы анализируемого вещества образуются в плазме тлеющего разряда, сконцентрированной в ячейке. На рис. 1 представлена схема газоразрядной ячейки источника ионов с тлеющим разрядом. Основными элементами являются: система подачи аргона в разряд, диафрагма с отверстием для экстракции ионов вещества, анод и катод. Исследуемое вещество представляет собой собственно катод или помещается на его поверхность. При подключении напряжения, составляющего в рабочем режиме ~ 1000 В, в пространстве между анодом и катодом зажигается разряд. Ток разряда составляет 1–2.5 мА, давление газа в ячейке поддерживается на уровне 1 мм рт. ст.

Выходя из газоразрядной ячейки через отверстие в аноде, ионы материала катода и балластного газа ускоряются полем в направлении сетки, ориентированной параллельно анодной поверхности, и, пройдя систему корректирующих линз, входят в масс-анализатор масс-спектрометра. Регистрация сигнала ведется либо на коллекторе Фарадея, либо на электронном умножителе; последующая обработка данных и контроль измерительного процесса ведется на управляющем компьютере. Получение обзорного масс-спектра происходило в два этапа: первый этап — получение серии спектров в режиме автоматической развертки магнитного поля и запись данных в файл; второй этап — проведение статистической обработки серии спектров с помощью специально разработанной для этого программы. Получаемые при

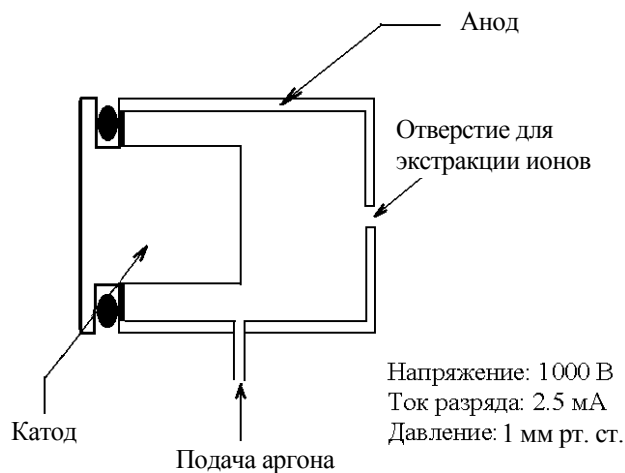


Рис. 1. Схематическое изображение разрядной ячейки источника ионов с тлеющим разрядом

этом данные позволяют судить о степени достоверности и воспроизводимости результатов эксперимента.

Для определения предела обнаружения микропримесей использовался чистый цельнометаллический медный катод. При максимальном пропускании прибора, получаемом за счет снижения разрешающей способности до $R_{10\%}$ порядка 1000, отношение сигнал / шум для изотопов Си составляет не менее 6 порядков, что соответствует возможности достижения пределов обнаружения на уровне 0.1–1 ppm.

Режимы регистрации спектров

Представление масс-спектра возможно осуществить в двух режимах.

- В режиме полного спектра масс-спектрограмма графически представляется в виде набора пиков, снятых с учетом разброса погрешности определения массы иона. Такое представление аналогично наблюдаемому на экране осциллографа в режиме линейного спектра.

- На масс-спектрограмме отображаются только линии, соответствующие максимальному сигналу (максимальной интенсивности) для каждого пика.

Обработка результатов измерений

Из-за нестабильности ряда внешних факто-

ров: ускоряющего напряжения и магнитного поля, подачи рабочего газа, режима горения разряда и т. д. — в серии масс-спектров наблюдались колебания в оцифрованных значениях масс и амплитуд пиков от спектра к спектру. Поэтому для интерпретации масс-спектров использовались спектры, значения интенсивностей и масс в которых находились по следующему алгоритму. Для набора из 50 линейных масс-спектров (сканов), записанных друг за другом через небольшой промежуток времени (величина промежутка задается программно и составляет десятые доли секунды), производится идентификация пиков одного и того же массового числа и составляется набор из 50 соответствующих значений интенсивности (в относительных единицах) и массы для каждого пика. Затем рассчитываются математические ожидания и среднеквадратичные отклонения для каждого пика.

3. ОСОБЕННОСТИ РАСПЫЛЕНИЯ И ИОНИЗАЦИИ ПРОБ В ТЛЕЮЩЕМ РАЗРЯДЕ ПОСТОЯННОГО ТОКА

Традиционно источник ионов с тлеющим разрядом постоянного тока используют при элементном анализе проводящих образцов, как правило металлов. Теоретический анализ показывает, однако, что метод ионизации в тлеющем разряде может быть применим и для анализа плохопроводящих и непроводящих образцов, таких как соли и окислы металлов, хотя на практике это сопряжено с трудностями, о которых будет сказано ниже.

Механизм ионизации вещества проводящей пробы следующий. Ионы аргона, образовавшиеся в плазме отрицательного свечения тлеющего разряда, разгоняясь в темном катодном пространстве под действием поля, достигают катода и производят его распыление. Кроме того, при столкновении с нейтральными атомами аргона в процессе симметричной перезарядки ионы полностью передают атомам свою энергию, в результате чего образуются быстрые атомы, интенсивность которых может на несколько порядков превосходить интенсивность ионов, принимающих участие в распылении. По данным работы [8] вклад ионов аргона и быстрых атомов в распыление катода составляет примерно 30 и 60 %. Распыленные атомы исследуемого вещества (катода), попадая в область отрицательного свечения, ионизируются преимущественно при столкновении с метастабильными атомами аргона. Образовавшиеся таким образом ионы экстрагируются из плазмы за счет градиента давления через отверстие в разрядной ячейке и входят в область ионно-оптической системы источника, затем ускоряются и формируются в пучок, который вводится в аналитическую часть масс-спектрометра.

Механизм распыления диэлектриков несколько

иной. Главное отличие заключается в том, что образец распыляется не в виде нейтральных частиц, как это было в предыдущем случае, а в виде положительных и отрицательных ионов, в связи с тем что в диэлектрике нет свободных электронов, которые могли бы произвести нейтрализацию вылетающей частицы [3]. Вторым отличием является то, что участие ионов в распылении диэлектриков минимально из-за образования положительного заряда на поверхности последних, и поэтому можно считать, что диэлектрики практически распыляются быстрыми атомами. Распыление в виде ионов диэлектрика, нанесенного на катод, создает значительные проблемы при формировании ионного пучка диэлектрической пробы, поскольку положительные ионы стремятся вернуться обратно на катод, а отрицательные осаждаются на аноде.

Помимо трудностей, связанных с получением ионов и их отбором из ячейки, сложность анализа диэлектрических веществ в масс-спектрометрии тлеющего разряда постоянного тока состоит в необходимости предварительной подготовки пробы в соответствии с определенными требованиями. Все они сводятся к приданию анализируемому веществу тем или иным способом проводящих свойств. Из литературы известны два используемых способа: первый — это перемешивание порошка пробы и металлической стружки с последующим прессованием смеси [4]. Второй способ — это организация вторичного катода, которая заключается в размещении металлической диафрагмы на лицевой поверхности исследуемого непроводящего материала [5]. Плохо проводящие образцы также можно исследовать в импульсном или радиочастотном тлеющих разрядах. Однако такие источники ионов, хоть и обладают некоторыми преимуществами перед источниками с тлеющим разрядом при постоянном токе (например, возможностью анализа как проводящих, так и непроводящих материалов, меньшей температурой разогревания катода), до сих пор не реализованы в коммерческих приборах.

4. ЭКСПЕРИМЕНТ

Пробоподготовка

В качестве модельных солей для исследования в тлеющем разряде использовались хлорид цинка и ацетат никеля. Указанные соли были технически чистыми, т. е. содержали набор микропримесей, однако на начальном этапе исследований примеси в этих солях не исследовались. Также не ограничивался размер пробы: навески солей для анализа брались, как правило, большими и составляли примерно 10–20 мг.

Поскольку существенной проблемой было закрепление порошкообразной соли на поверхности

медного катода одновременно с обеспечением ее достаточной проводимости для поддержания разряда, было рассмотрено несколько схем нанесения пробы на катод.

1. Крепление в отверстиях медного катода.

На поверхности катода были проделаны отверстия диаметром 1 мм и глубиной 2–3 мм, в которые прессовалась измельченная проба. Этот метод пробоподготовки аналогичен методике вторичного катода.

2. Применение электропроводящей смазки "Аквадаг" для закрепления пробы.

Основной компонент смазки — углерод. Кроме того, распадаясь на составные части в разряде, "Аквадаг" вносит дополнительные компоненты в масс-спектр. Особенно интенсивные линии проявлялись в области малых (до $M = 40$) масс, что свидетельствует о наличии в составе смазки воды (как растворителя) и легколетучих органических соединений.

3. Крепление соли с помощью индия.

Поскольку температура разогрева катода в источнике ионов с тлеющим разрядом в рабочем режиме не превышает температуры плавления индия ($176\text{ }^\circ\text{C}$), то благодаря своей пластичности индий может быть использован как связующий агент для исследуемых солей. Кроме того, индий — металл и, следовательно, обладает хорошими проводящими свойствами, что является необходимым условием для связывающего агента при подготовке диэлектрической пробы к исследованиям в тлеющем разряде постоянного тока.

При использовании способов крепления 1 и 2 газовый разряд характеризовался нестабильным ионным током, работа источника сопровождалась активным загрязнением ячейки из-за ссыпания пробы с поверхности катода. В ходе экспериментов было показано, что оптимальным способом крепления соли является способ с использованием индия как связывающего агента.

Описание эксперимента и результаты

Калибровка прибора была произведена по известным пикам изотопов меди Cu^{63} , Cu^{65} и аргона Ar^{40} .

Экспериментально было подтверждено, что условия ионизации различны для ионов, образующихся из атомов и молекул материала катода, и для ионов, изначально присутствующих в газовой фазе (ионов аргона и его кластеров, ионов воздуха и воды), что позволяет путем подбора давления аргона и ускоряющего напряжения добиваться увеличения интенсивности пиков материала катода при одновременном снижении интенсивности нежелательных пиков. К подобному выводу пришли авторы работы [6]. В данной работе подбор условий разряда, при которых наблюдается мак-

симально возможный сигнал интересующих нас ионов, производился в каждом эксперименте. При этом главным критерием в таком подборе параметров была форма пика: пики в масс-спектре должны были быть как можно более гладкими, симметричными, с максимальной интенсивностью.

Наиболее простой моделью "пробы" в источнике ионов с тлеющим разрядом является монометаллический катод. Для чистого медного катода после ~ 20 мин очистки в разряде оптимальные параметры газового разряда для получения максимальной интенсивности атомарных ионов меди Cu^{63} , Cu^{65} были определены следующими: давление аргона $P_{\text{арг}} \sim 100$ Па; ток разряда $i_{\text{разр}} \sim 2.5$ мА; напряжение $U_{\text{разр}} \sim 1000$ В. Результаты определения изотопного отношения меди приведены в таблице.

Как видно, в эксперименте получено хорошее соответствие измеренного изотопного отношения табличному, что свидетельствует об отсутствии дискриминационных факторов в источнике ионов и масс-анализаторе. Далее измерение изотопных отношений меди рассматривалось как тестовое и периодически повторялось для подтверждения нормальной работы масс-спектрометра.

Для анализа модельных солей применялся следующий способ пробоподготовки.

Поверхность медного катода предварительно шлифовалась при помощи мелкозернистой наждачной бумаги для придания гладкости и протиралась растворителем. Затем на ней расплавлялась смесь индия с порошком исследуемой соли. Как показали эксперименты, таким способом удалось создать достаточно прочное крепление соли к поверхности катода и обеспечить ее проводимость, тем самым не нарушая условий горения разряда. При внесении пробы в источник ионов и зажигании разряда первоначально наблюдались резкие всплески давления в разрядной ячейке, о чем можно было судить по датчику давления, расположенному в промежуточной области, отделяю-

Сравнение экспериментально измеренных изотопных соотношений с табличными

Изотопные соотношения	Табличные данные	Эксперимент
$\text{Cu}^{63}/\text{Cu}^{65}$	2.24	2.19 ± 0.06
$\text{Zn}^{64}/\text{Zn}^{66}$	1.76	1.53 ± 0.2
$\text{Zn}^{66}/\text{Zn}^{67}$	6.77	5.27 ± 2.1
$\text{Ni}^{58}/\text{Ni}^{60}$	2.59	2.17 ± 0.1

щей источник ионов от остальной части масс-спектрометра. Скорее всего, рост давления был вызван десорбцией газов и испарением влаги, изначально содержащейся в соли из-за ее гигроскопичности. Набор спектров снимался приблизительно через 1 ч после зажигания разряда, когда давление и ток разряда стабилизировались.

Суммарная масс-спектрограмма хлорида цинка на индии, полученная описанным в разделе 2 способом, приведена на рис. 2, а на рис. 3 — анало-

гичная масс-спектрограмма для ацетата никеля. Изотопные отношения для меди, никеля и цинка приведены в таблице.

Значительная погрешность для изотопного отношения Zn^{66}/Zn^{67} связана с нестабильностью пика, соответствующего малораспространенному изотопу Zn^{67} . В масс-спектрах также наблюдались неидентифицированные пики с массами 57, 59 и 62, которые, видимо, связаны с органическими фрагментами солевого остатка.

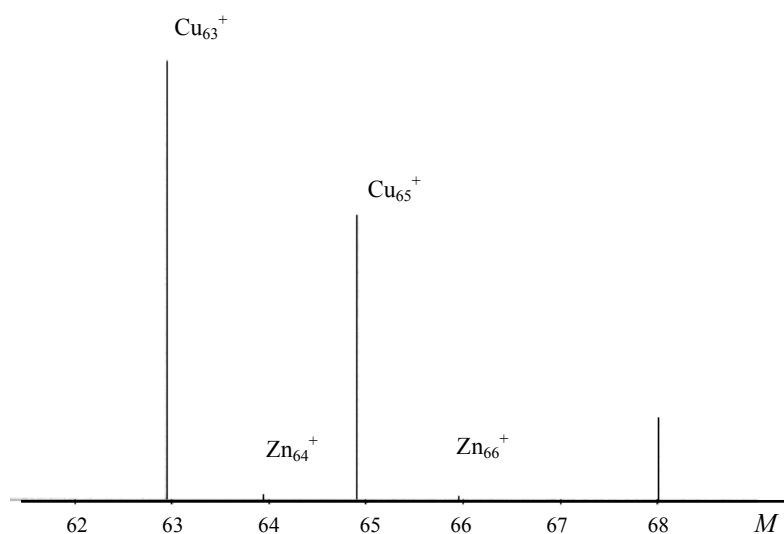


Рис. 2. Масс-спектр хлорида цинка

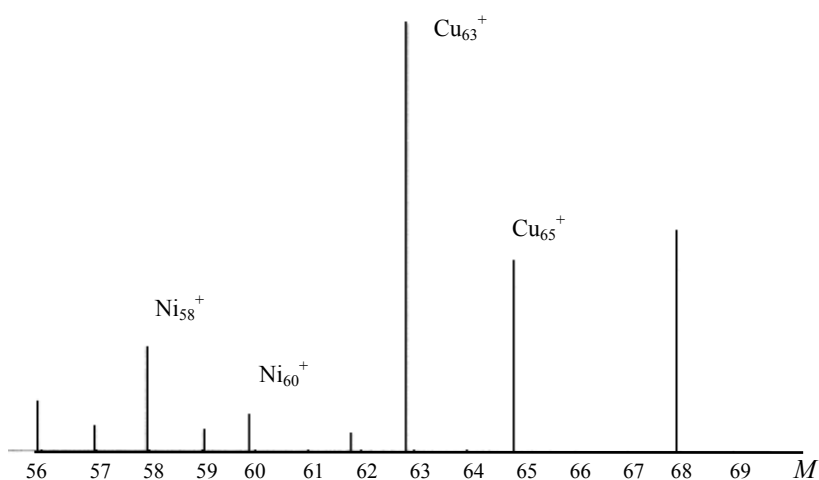


Рис. 3. Масс-спектр ацетата никеля

ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Теоретически и экспериментально показано, что методом тлеющего разряда можно проводить ионизацию непроводящих солей металлов, закрепленных на проводящей подложке.

2. В качестве подложки удобно использовать катод из металлического индия, наплавленного на медную основу.

3. Ионизация солей металлов в тлеющем разряде позволяет получить характерные спектры металлов и определить для них изотопные отношения.

4. Масс-спектрометр МСД-650ТлР с источником ионов с тлеющим разрядом принципиально пригоден для элементного анализа биопроб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшов В.И., Серебряков А.С. Использование физических методов элементного анализа для определения влияния окружающей среды на организм человека // Экологическая химия. 2003. Т. 12, № 3. С. 179–190.
2. Галль Л.Н., Кузьмин А.Г. Масс-спектрометр с тлеющим разрядом МСД-650ТлР — новое развитие масс-спектрометра МСД-650 // Научное приборостроение. 2001. Т. 11, № 1. С. 28–35.
3. Добрецов Л.Н. Эмиссионная электроника. М.: Наука, 1963. 526 с.
4. Betti M., Gianarelli S., Hiernaut T. et al. Detection of trace radioisotopes in soil, sediment and vegetation by glow discharge mass spectrometry // Fre-

- senius J. Anal. Chem. 1996. V. 355. P. 642–646.
5. Milton D.M.P., Hutton R.C. Investigations into the suitability of using a secondary cathode to analyse glass using glow discharge mass spectrometry // Spectrochim. Acta B. 1993. V. 48. P. 39–52.
6. Кузьмин А.Г., Михновец П.В. Исследование особенностей ионизации в масс-спектрометрическом источнике ионов с импульсным тлеющим разрядом // Научное приборостроение. 2002. Т. 12, № 3. С. 31–37.
7. Gobom J., Mueller M., Egelhofer V. et al. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS // Anal Chem. 2002. V. 74, N 15. P. 3915–3923.
8. Bogaerts A., Gijbels R. Mathematical description of a direct current glow discharge in argon // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. V. 355. P. 853–857.
9. ОСТ 10-221-98. Почвы, грунты, удобрения, сельскохозяйственная и пищевая продукция. Минерализация проб в аналитическом автоклаве НПВФ "Анкон-АТ-2" для определения ртути, свинца, кадмия, мышьяка, меди, цинка, железа, олова, марганца, хрома, никеля, селена, теллура, таллия и бериллия. Минсельхозпрод. России, 1998.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург*

Материал поступил в редакцию 18.03.2004.

DEVELOPMENT OF A GLOW DISCHARGE MASS SPECTROMETRY TECHNIQUE FOR ELEMENTAL ANALYSIS OF BIOSAMPLES

A. K. Shulipa, A. D. Andreeva, L. N. Gall, S. N. Koltsov, A. G. Kuzmin

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

The article describes the possibility of using glow discharge mass spectrometry for elemental analysis of metallic salts. The way of sample fixing is investigated and the appropriate one is recommended. The mass spectra of zinc and nickel salts fixed on an indium substrate are shown.