Journal of Siberian Federal University. Chemistry 3 (2012 5) 320-330
~ ~ ~

УДК 543.421:573.3

Определение натрия и калия в биологических объектах методами атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии

Н.В. Мазняк[а], А.П. Верхотурова[а], В.Н. Лосев[а]*, Т.Н. Замай[б]

[а] Научно-исследовательский инженерный центр «Кристалл» Сибирского федерального университета, Россия 660041, Красноярск, Свободный, 79

[б] Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Россия 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1[1]

Received 10.09.2012, received in revised form 17.09.2012, accepted 24.09.2012

Исследовано взаимное влияние калия и натрия при их определении при различных соотношениях методами атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектрометрии. Показано, что ионизационные помехи, мешающие атомно-абсорбционному определению щелочных металлов, устраняются введением спектроскопического буфера – хлорида цезия. Разработана атомно-абсорбционная методика определения калия и натрия в биологических объектах. Проведен сравнительный анализ результатов определения калия и натрия, полученных разными атомно-спектроскопическими методами.

Ключевые слова: калий, натрий, биологические объекты, атомно-спектроскопические методы.

Калий и натрий по содержанию в живых организмах относятся к незаменимым макроэлементам, они активно участвуют в метаболизме, при этом натрий служит основным катионом внеклеточной жидкости. Соотношение натрия во внеклеточном и внутриклеточном пространстве организма определяет изменение осмотического давления и соотношение объемов внутри- и внеклеточной жидкости. Калий является основным катионом внутриклеточной жидкости (в ней содержится 98 % калия всего организма) и обеспечивает осмомолярность цитоплазмы, создает условия для протекания в ней биохимических реакций [1]. Изменение соотношения концентраций ионов калия и натрия свидетельствует о нарушении физиологических процессов, особенно при различных патологиях.

* Corresponding author E-mail address: losevvn@gmail.com
1 © Siberian Federal University. All rights reserved

Для определения содержания ионов натрия и калия в биологических объектах в клинической диагностике используют ферментативные [2], химические, хроматографические, электрохимические и спектроскопические методы [1-3].

Проточные системы с колориметрическим детектированием используются для определения калия и натрия в нанолитровых объемах, но позволяют определять только один ион металла [3, 4]. Ионная хроматография в сочетании с кондуктометрическим детектированием использовалась для определения калия и натрия в образцах сыворотки крови [3, 5]. Для одновременного определения катионов применен капиллярный электрофорез с фотометрическим или кондуктометрическим детектированием [3]. Достоинством метода считают возможность анализа малых объемов пробы (несколько нанолитров) с пределами обнаружения на уровне 0,2 пмоль для натрия и 30 фмоль для калия.

Ион-селективные электроды используют в медицине и клинической диагностике при определении натрия и калия в цельной крови, сыворотке, плазме крови, моче [1, 2]. Применение ультрамикроэлектродов для потенциометрического определения калия и натрия дает возможность анализа малых объемов пробы [3, 6]. Для определения калия и натрия известно применение проточных систем с ион-селективными электродами [3, 7, 8].

Достоинствами атомно-спектроскопических методов – атомно-эмиссионного и атомно-абсорбционного – является универсальность и экспрессность, что особенно важно при анализе большого числа проб. Метод пламенной фотометрии достаточно широко используется в практике клинических лабораторий при определении щелочных металлов в биологических жидкостях ввиду простоты выполнения, экспрессности и доступности оборудования [3, 9]. Широкое применение атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, несмотря на привлекательность метода как многоэлементного, сдерживается высокой стоимостью оборудования [10].

Атомно-абсорбционная спектрометрия для определения калия и натрия в биологических объектах, в том числе в клинических исследованиях, используется довольно редко. Как и в пламенной фотометрии, в атомной абсорбции проявляется эффект взаимного влияния щелочных металлов [11, 15]. С другой стороны, современные атомно-абсорбционные спектрофотометры позволяют регистрировать как поглощение, так и эмиссию атомов.

Цель данной работы – разработка методики атомно-абсорбционного определения натрия и калия в биологических пробах и ее сопоставление с методами пламенной фотометрии и атомно-эмиссионной с индуктивно связанной плазмой спектрометрии.

Экспериментальная часть

Объекты анализа. В качестве объектов анализа использованы биологические жидкости (плазма крови и асцитная жидкость), клетки (раковые клетки карциномы Эрлиха, эритроциты крови) и биопаты ткани молочной железы мыши.

Аппаратура, реактивы. Кислотное разложение проб проводили в системе микроволновой пробоподготовки MARS-5 (CEM Corp.) с использованием HNO_3 особой чистоты, дополнительно очищенной перегонкой в системе BSB-939-IR (BERGHOF). Микроволновое разложение биологических проб проводили по программе нагрева печи (табл. 1).

Содержание калия и натрия в растворах после вскрытия проводили атомно-абсорбционным методом на спектрометре Solaar M6 (ThermoElectronCorporation, USA) с пламенным атомиза-

Таблица 1. Программа микроволнового вскрытия

№ шага программы	Мощность, Вт	Время установки макс. мощности, мин	Давление, psi	Температура, °С	Время удерживания при максимальной мощности, мин
1	400	20	160	210	5

Таблица 2. Условия атомно-эмиссионного с индуктивно связанной плазмой определения калия и натрия

Параметры спектрометра	
Длины волн (нм)	K (766,490); Na (589,592; 818,326)
Обзор плазмы	радиальный
Время измерения	15 с
Мощность генератора	1150 Вт
Газ	аргон: вспомогательный - 0,5 л/мин, охлаждающий - 12 л/мин, распылительный - 0,70 л/мин

тором (ацетилен-воздух), позволяющем проводить измерения в режимах абсорбции и эмиссии на резонансных линиях 766,5 и 589,0 нм для калия и натрия соответственно и атомно-эмиссионным (с индуктивно связанной плазмой) методом на спектрометре iCAP 6500 DUO (ThermoElectron Corp., USA). Условия атомно-эмиссионного с индуктивно связанной плазмой определения калия и натрия приведены в табл. 2.

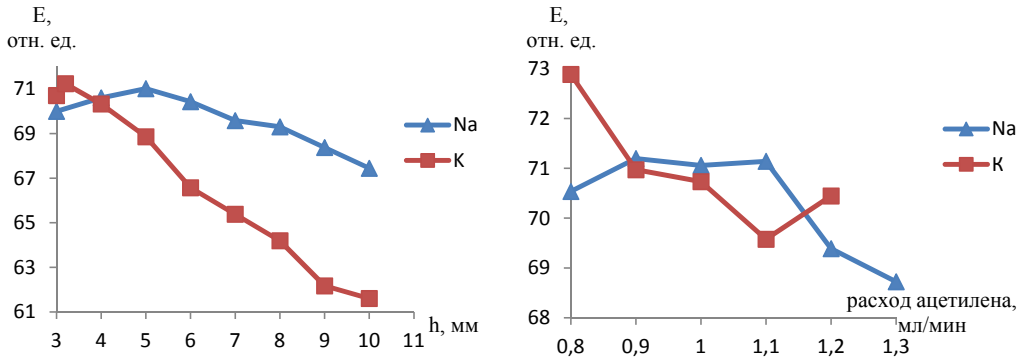
Взвешивание проб проводили на аналитических весах XP205 (Mettler Toledo).

Стандартные растворы калия и натрия (100 мкг/мл) готовили разбавлением ГСО натрия (ГСО № 7474-98) и калия (ГСО № 7771-2000) деионизованной водой. Рабочие растворы с меньшими концентрациями готовили разбавлением стандартных растворов деионизованной водой. Исходный 10 %-ный раствор хлорида цезия готовили растворением его точной навески в деионизованной воде.

Результаты и их обсуждение

Как следует из литературных данных [2, 12, 13], в биологических объектах соотношение натрия к калию колеблется в широком диапазоне от 1:1 до 60:1 и их взаимное влияние друг на друга при определении может быть значительным. Поэтому перед проведением анализа биологических объектов необходимо оценить величину взаимного влияния щелочных металлов при определении натрия и калия в бинарных модельных растворах различными атомно-спектроскопическими методами.

Метод пламенной фотометрии. Для определения калия и натрия в методе пламенной фотометрии используется воздушно-пропановое или воздушно-ацетиленовое пламя [9, 15]. Важными достоинствами воздушно-ацетиленового пламени, использующегося в большинстве атомно-абсорбционных спектрометров, являются его стабильность и слабая собственная эмиссия [9, 14].



А Б

Рис. 1. Зависимость эмиссионного сигнала натрия и калия (E) от высоты горелки (h) (А) и расхода ацетилена (Б) (C(Na)=0,92 мкг/мл, C(K)=0,69 мкг/мл)

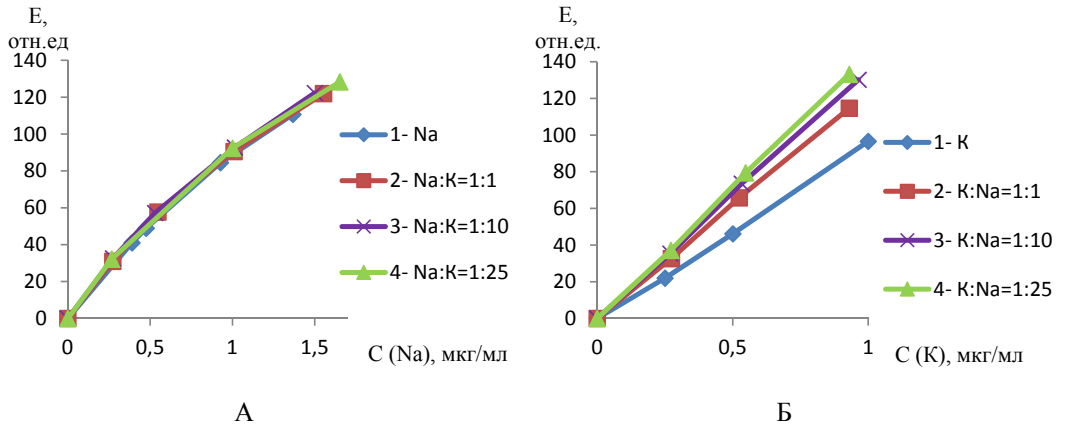
Для оптимизации условий определения калия и натрия в эмиссионном режиме работы атомно-абсорбционного спектрометра в пламени ацетилен-воздух исследовано влияние расхода ацетилена и высоты наблюдения сигнала над краем горелки. Как видно из рис. 1, эмиссионный сигнал калия и натрия зависит от высоты наблюдения над краем горелки и от температуры пламени в зоне наблюдения и имеет наибольшее значение в зоне внутреннего конуса пламени, высота зоны которого зависит от расхода горючего газа и составляет при расходе ацетилена 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 л/мин 3, 5, 8 и 10 мм соответственно.

Оптимальными условиями для эмиссионного определения калия в воздушно-ацетиленовом пламени является h=3,2 мм и расход ацетилена 0,8 л/мин, для натрия – 5 мм и 0,9 л/мин соответственно (рис. 1).

Калий и натрий имеют достаточно низкие потенциалы ионизации (4,34 эВ для калия; 5,14 эВ для натрия), и в пламени ацетилен-воздух происходит их частичная ионизация. В связи с этим они также являются донорами электронов в пламени и влияют на степень ионизации друг друга [16].

Из данных, приведенных на рис. 2, можно видеть, что присутствие натрия увеличивает аналитический сигнал калия (особенно это влияние проявляется при 10- и 25-кратном избытке натрия, где увеличение аналитического сигнала составляет 43,2 и 51,2 % соответственно, при содержании калия 0,5 мкг/мл). При определении натрия методом фотометрии пламени концентрация калия не оказывает заметного влияния на ход градуировочной зависимости вплоть до его 25-кратного избытка.

Коэффициенты селективности, определенные как отношение коэффициентов чувствительности в присутствии мешающего элемента и в его отсутствии, показывают, что эмиссионный сигнал калия значительно зависит от натрия даже при соотношении K:Na=1:1 (табл. 3). При определении натрия в присутствии калия коэффициент селективности близок к 1, а его максимальное изменение не превышает 5 %, что сопоставимо с ошибкой метода анализа и дает возможность определения натрия в присутствии калия, по крайней мере, в присутствии его 25-кратного избытка.



А Б

Рис. 2. Градуировочные графики пламенно-фотометрического определения натрия в присутствии калия (А) и калия в присутствии натрия (Б)

Таблица 3. Коэффициенты селективности определения калия и натрия для атомно-эмиссионного определения в пламени ацетилен-воздух

Калий		Натрий	
Соотношение K:Na	$k_{K/Na}$	Соотношение Na:K	$k_{Na/K}$
1:1	1,27	1:1	0,97
1:10	1,40	1:10	1,00
1:25	1,48	1:25	0,95

Сопоставление полученных результатов со степенями ионизации калия и натрия затруднительно, поскольку степень ионизации зависит не только от энергии ионизации элемента, но и от температуры пламени и концентрации элемента и может изменяться в широком диапазоне от долей до десятков процентов [9, 15-17].

При анализе образцов с неизвестным соотношением калия и натрия применение метода фотометрии пламени для определения калия может давать существенную систематическую ошибку.

Атомно-абсорбционное определение калия и натрия. Для определения калия и натрия методом атомной абсорбции в пламени ацетилен-воздух были найдены оптимальные условия расхода горючего газа и высоты наблюдения сигнала над краем горелки. Оптимальная высота наблюдения для обоих металлов составляет h=4,6 мм при расходе ацетилена 0,9 л/мин для калия и 0,8 л/мин для натрия.

Эффекты ионизации и взаимного влияния калия и натрия в воздушно-ацетиленовом пламени проявляются при их определении методом атомной абсорбции [15]. При содержании определяемого элемента 0,5 мкг/мл увеличение концентрации второго элемента приводит к увеличению абсорбционного сигнала за счет подавления ионизации. При переходе от 10- до 25-кратного избытка натрия абсорбционный сигнал калия увеличивается с 2 до 7 %, а при

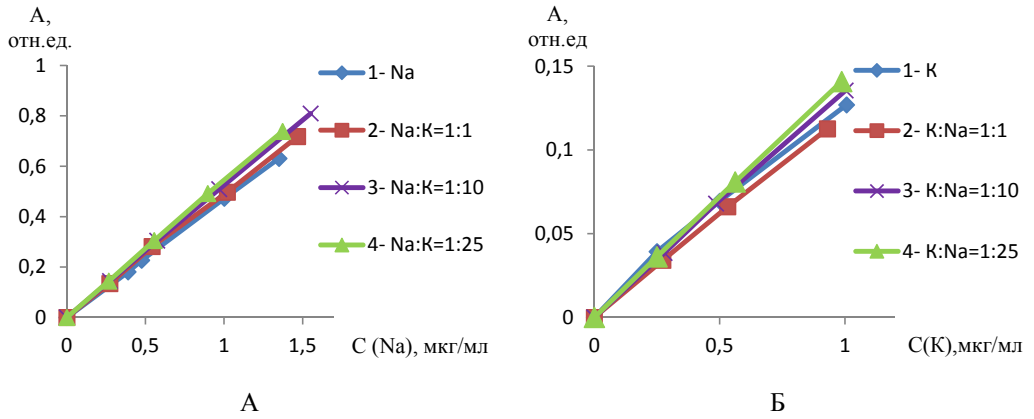


Рис. 3. Градуировочные графики атомно-абсорбционного определения натрия в присутствии калия (А) и калия в присутствии натрия (Б)

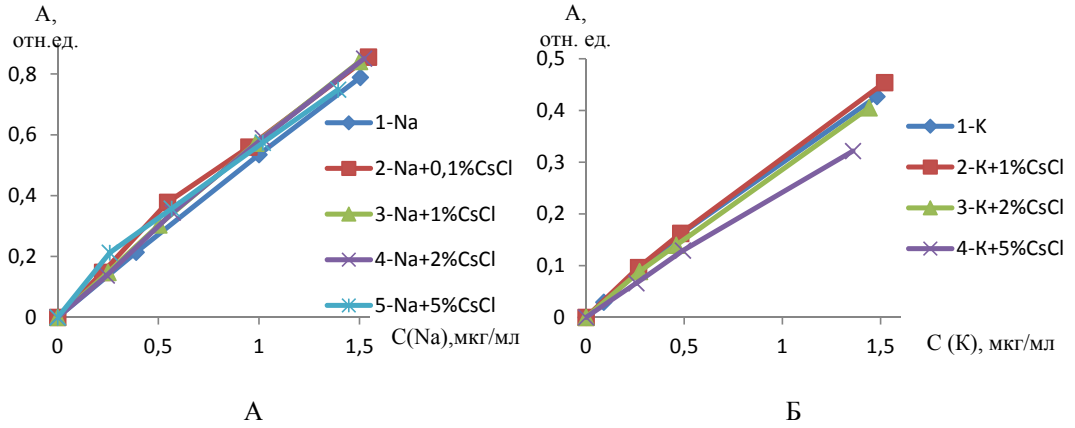
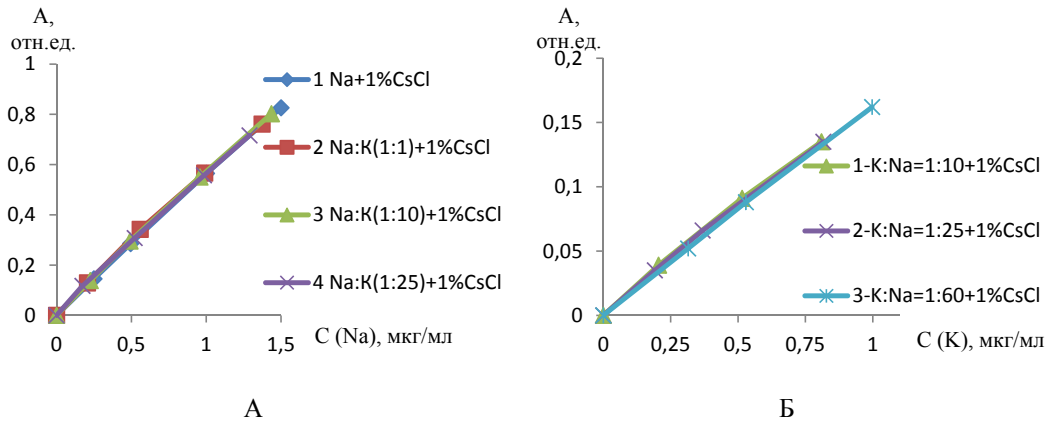


Рис. 4. Градуировочные графики атомно-абсорбционного определения натрия (А) и калия (Б) в присутствии 0,1-5 % мас. хлорида цезия

определении натрия в присутствии калия увеличение аналитического сигнала происходит на 12 и 16 % соответственно (рис. 3). Таким образом, при определении калия или натрия методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии необходимо учитывать их соотношение в пробе или использовать приемы полного подавления ионизации.

Для подавления эффекта ионизации элементов в атомной абсорбции применяют различные ионизационные (спектроскопические) буферы, представляющие собой раствор соли легкоатомизируемого элемента, потенциал ионизации которого меньше потенциала ионизации определяемого элемента. Совместно присутствующие с определяемым элементом другие элементы с более низкими потенциалами ионизации будут являться донорами электронов (вследствие собственной ионизации), что приводит к подавлению ионизации определяемого элемента и, соответственно, к увеличению его абсорбционного сигнала. Для атомно-абсорбционного определения калия в качестве ионизационного буфера описано использование раствора хло-



А Б

Рис. 5. Градуировочные графики атомно-абсорбционного определения натрия в присутствии калия (А) и калия в присутствии натрия (Б) при добавлении 1 % мас. CsCl

рида цезия [11]. Потенциал ионизации цезия составляет 3,89 эВ, поэтому цезий является более легкоионизируемым элементом, чем калий и натрий. Как видно из рис. 4, хлорид цезия при концентрациях 0,1-5 % мас. подавляет ионизацию калия и натрия, что приводит к увеличению их абсорбционного сигнала.

Применение хлорида цезия в концентрациях более 2 % мас. вызывает искривление градуировочных зависимостей калия и натрия. Поэтому в качестве оптимальной выбрана 1 % мас. концентрация CsCl для атомно-абсорбционного определения калия и натрия в воздушно-ацетиленовом пламени (коэффициент корреляции 0,999). В присутствии 1 % ионизационного буфера происходит увеличение аналитического сигнала калия на 5 %, а натрия – на 8 % и позволяет устранить влияние калия на аналитический сигнал натрия до соотношения 1:25, а влияние натрия на аналитический сигнал калия – до соотношения K:Na=1:60 (рис. 5).

Атомно-спектроскопическое определение калия и натрия в биологических объектах. Для подготовки проб биологических жидкостей (асцитной жидкости и плазмы крови) использовали их разбавление деионизованной водой и кислотное разложение проб в микроволновой системе. Микродозатором отбирали аликвотную часть жидкости (200 мкл), помещали в пробирку и разбавляли пробу деионизованной водой до объема 20 мл.

Для микроволнового разложения аликвотные части асцитной жидкости или плазмы крови 200 мкл помещали во фторопластовый вкладыш автоклава, добавляли 2 мл конц. HNO_3, выдерживали 5-7 мин, собирали автоклав и помещали в микроволновую печь. Навески раковых клеток, эритроцитов (0,2000 г), тканей молочной железы (0,0100 г) к микроволновому вскрытию подготавливали аналогично. После микроволнового вскрытия качественно разложенная проба представляет собой прозрачный желтоватый раствор, который количественно переносили в пластиковую пробирку и разбавляли до объема 20 см^3 деионизованной водой. Влияние метода подготовки проб на пламенное атомно-эмиссионное определение натрия приведено в табл. 4.

Как видно из табл. 4, при анализе проб после микроволнового разложения содержание натрия превышает его содержание в растворах после разбавления деионизованной водой, что связано с более полным разложением органических компонентов асцитной жидкости

Таблица 4. Результаты пламенного атомно-эмиссионного определения натрия в пробах асцитной жидкости

Проба асцитной жидкости	Найдено натрия*, мкг/г	
	Способ пробоподготовки № 1	Микроволновое вскрытие
3	3109	3226
4	2683	3014
5	2776	3013
6	2730	3043

* Приведены результаты единичных определений в пробе с ошибкой метода, не превышающей 5 %.

Таблица 5. Результаты определения содержания калия в биологических объектах методами атомной абсорбции (ААС) и атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) (P=0,95)

Объект	ААС			АЭС-ИСП		
	$\bar{x} \pm \frac{t_p S}{\sqrt{n}}$, мкг/г	S_r	n	$\bar{x} \pm \frac{t_p S}{\sqrt{n}}$, мкг/г	S_r	n
Раковые клетки	2639 ± 182	0,03	3	2744 ± 177	0,03	3
Асцитная жидкость 1	457 ± 38	0,07	5	488 ± 23	0,03	4
Асцитная жидкость 2	707 ± 239	0,14	3	753 ± 237	0,13	3
Плазма	380* 348*	-	2	433* 356*	-	2
Эритроциты	3106 ± 250	0,03	3	2997 ± 242	0,06	5
Молочная железа	7607	-	1	7512	-	1

* Приведены результаты параллельных определений.

при микроволновом разложении. В дальнейшем для определения калия и натрия атомно-спектроскопическими методами в пробах асцитной жидкости, плазме крови, эритроцитах, раковых клетках и ткани молочной железы использовали микроволновое разложение. Результаты атомно-спектроскопического определения калия и натрия в биологических объектах приведены в табл. 5, 6. Ввиду ограниченного объема образцов при количестве определений, не превышающих двух, в таблицах приведены результаты параллельных определений.

Ввиду отсутствия стандартных образцов состава биологических объектов для оценки правильности определения калия и натрия использовали метод атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и метод «введено-найдено».

Благодаря высокой температуре (10 000-12 000 К) в индуктивно связанной плазме отсутствует взаимное влияние элементов, а условия возбуждения излучения отличаются высокой стабильностью [9].

Высокое значение относительного стандартного отклонения при определении калия и натрия в пробе асцитной жидкости 2 (табл. 5, 6) связано с высоким содержанием белка.

Статистический анализ сравнения средних значений результатов (модифицированный тест Стьюдента) определения содержания натрия, полученных методами ПАЭС, ААС и АЭС-ИСП, и калия – методами ААС и АЭС-ИСП, показывает, что различие между средними зна-

Таблица 6. Результаты определения содержания натрия в биологических объектах методами пламенной фотометрии (ПАЭС), атомной абсорбции (ААС) и атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) (P=0,95)

Объект	ПАЭС			ААС			АЭС-ИСП		
	$\bar{x} \pm \frac{t_p S}{\sqrt{n}}$, мкг/г	S_r	n	$\bar{x} \pm \frac{t_p S}{\sqrt{n}}$, мкг/г	S_r	n	$\bar{x} \pm \frac{t_p S}{\sqrt{n}}$, мкг/г	S_r	n
Раковые клетки	664 ± 13	0,008	3	642 ± 38	0,02	3	667 ± 26	0,02	3
Асцитная жидкость 2	3160 ± 1143	0,14	3	3223 ± 1219	0,15	3	2732 ± 1106	0,16	3
Плазма	3980* 3765*	-	2	4042* 3726*	-	2	3344* 3025*	-	2
Эритроциты	140 ± 55	0,25	4	139,8* 140,6*	-	2	134 ± 19	0,09	4
Молочная железа	-	-	-	6613	-	1	4296	-	1

* Приведены результаты параллельных определений.

чениями незначимо. Таким образом, методика атомно-абсорбционного определения калия и натрия в присутствии ионизационного буфера (1 % CsCl) в воздушно-ацетиленовом пламени позволяет получить правильные и воспроизводимые результаты.

Пределы обнаружения натрия, полученные методами пламенной фотометрии и атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой, близки и составляют 0,0004 и 0,00006 мкг/мл соответственно, что значительно ниже атомно-абсорбционного предела обнаружения (0,002 мкг/мл). Использование метода АЭС-ИСП позволяет достигать более низких пределов обнаружения для калия (0,0001 мкг/мл) по сравнению с пределом обнаружения, достигаемым при использовании атомной абсорбции (0,02 мкг/мл). Несмотря на более высокие пределы обнаружения, достигаемые атомно-абсорбционным методом, разработанная методика может быть успешно использована для определения калия и натрия, являющихся макрокомпонентами биологических объектов.

Список литературы

1. Бочков В.Н., Добровольский А.Б., Кушлинский Н.Е., Логинов В.А. Клиническая биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 512 с.

2. Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б. Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. М.: Лабпресс, 2001. 176 с.

3. Stocking C.J., Slater J.M., Unwin R., Walter S., Folkerd E. An automated technique for the simultaneous determination of cations in nanoliter volumes // Kidney International. 1999. V. 56. P. 338-343.

4. Terada Y., Knepper M.A. Continuous-flow quantitation of Na^+ and K^+ in nanoliter samples using chromogenic macrocyclic ionophores // Am. J. Physiol. 1989. V. 257. P. F893-F898.

5. Thienpont L.M., Van Nuwenborg J.E., Stockl D. Ion chromatography as potential reference methodology for the determination of total sodium and potassium in human serum // J. Chromatogr. A. 1995. V. 706. P. 443-450.

6. Kaufman J.S., Costello T.P., Hamburger R.J. Measurement of Na and K in nanoliter droplets by ion-specific microelectrodes // Kidney Int. 1990. V. 38. P. 525-528.

7. Garvin G.L. Picomolar quantitation of potassium using a continuous-flow apparatus // Kidney Int. 1989. V. 36. P. 726-729.

8. Garvin G.L. A simple method to determine millimolar concentrations of sodium in nanoliter samples // Kidney Int. 1993. V. 44. P. 875-880.

9. Жуков, А.Ф., Колосова И.Ф., Кузнецов В.В. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа. М.: Химия, 2001. 496 с.

10. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / под ред. Р. Кельнер, Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. М.: Мир, 2004. Т.2. 728 с.

11. Escueta A.V., Appel S.H. Biochemical Studies of Synapses in Vitro. II. Potassium Transport // Biochemistry. 1969. V. 8. №2. P. 725-733.

12. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Завгородний И.В. Клиническая биохимия. М.: Триада – Х, 2002. 504 с.

13. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 544 с.

14. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. Элиста: Джангар, 1998. 250 с.

15. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия, 1983. 144 с.

16. Эмиссионная фотометрия пламени и атомно-абсорбционная спектроскопия / сост. А.Р. Гарифзянов. Казань: Казан.гос. ун-т им. В.И. Ульянова-Ленина, 2009. 94 с.

17. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия. Часть 2. СПб.: АНО НПО «Профессионал» , 2002. 964 с.

Determination of Sodium and Potassium in Biological Samples by Atomic Absorption and Atomic Emission Spectrometry

Natalia V. Maznyak[a], Anna P. Verhoturova[a], Vladimir N. Losev[a] and Tatyana N. Zamaj[b]

[a]Scientifically – research engineering centre "Crystal" of Siberian Federal University, 79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

[b]Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky, 1 Partizan Jeleznyak St., Krasnoyarsk, 660022 Russia

The mutual influence of potassium and sodium at definition of their maintenance by atomic absorption and atomic emission spectrometry has been studied. It is shown, that ionization interferences for atomic absorption determination of alkali metals is eliminated by ionization buffer adding (CsCl).

The procedure of potassium and sodium determination of biological samples by atomic absorption spectroscopy has been developed. The comparative analysis of potassium and sodium determination received by different atomic spectroscopic methods has been carried out.

Keywords: potassium, sodium, biological samples, atomic spectroscopic methods.