

Исследование распределения нанопорошков карбида вольфрама в органах животных с применением метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой

**Ю. В. Цветков, В. И. Баранов, Е. К. Казенас, В. А. Волченкова,
А. В. Самохин, Н. В. Алексеев, Ю. В. Благовещенский, П. А. Герцен,
И. И. Кряжков, Н. Ф. Коровкина**

Количественно исследовано распределение нанопорошков карбидов вольфрама в органах животных (лёгкие, печень, почки, сердце, мозг, селезёнка, гонады) с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой. Показано, что наибольшее количество карбида вольфрама накапливается в лёгких и печени.

Введение

В настоящее время наноматериалы изучаются в самых разнообразных аспектах [1 – 3]. Одна из проблем — влияние наноматериалов на живые организмы.

Из прежних исследований известно, что у рабочих производства твёрдых сплавов, подвергавшихся воздействию повышенных концентраций смешанной пыли титана, карбидов вольфрама и кобальта (с микроразмерами частиц), наблюдались раздражения слизистых, риниты, ринофарингиты. У некоторых возникал обструктивный бронхит, а также развивался невросклероз [4]. Характер воздействия наноматериалов и нанопорошков на человека и другие живые организмы практически мало изучен [5]. Поэтому исследования в этой области составляют одно из приоритетных направлений науки.

Цель работы — изучение степени накопления нанопорошков карбида вольфрама в органах крыс.

Работа состояла из следующих этапов:

1. Получение нанопорошков карбида вольфрама;
2. Интрахеальное введение наночастиц карбида вольфрама в организмы крыс;
3. Препарация крыс;

4. Разработка методики растворения образцов органов;

5. Разработка методики растворения карбида вольфрама, находящегося в органах;

6. Разработка методики и определение вольфрама в органах крыс методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой.

Методика исследования

В исследованиях использовали три вида порошковых материалов системы вольфрам – углерод, полученных разными методами и имеющих различный уровень дисперсности:

1. Порошок системы вольфрам – углерод, полученный плазменным синтезом из оксида вольфрама в водородсодержащей плазме. Порошок имеет сложный состав, характеризуемый набором вольфрамсодержащих фаз (WC_{1-x} , W_2C , WC , W) в смеси с углеродом. Средний размер частиц, рассчитанный по значению удельной поверхности, находится на уровне 15 нм. Порошок получен в ИМЕТ РАН.

2. Порошок монокарбида вольфрама, синтезированный из порошковой системы вольфрам –

углерод, полученной в плазме. Термохимический синтез осуществляли в печи водородного восстановления. Средний размер частиц порошка 60 нм. Порошок получен в ИМЕТ РАН.

3. Порошок монокарбида вольфрама, получаемый промышленно методом карботермического синтеза, марки WC-250 (ТУ 48-19-540-92). Средний размер частиц порошка 1,2 мкм.

Опыты проводили с самцами белых крыс "Linea Vistar".

Нанопорошки вводили интрахеально в легкие крыс. Через определённое время после введения порошков животных выводили из эксперимента и препарировали (по органам). Одновременно проводили опыты с контрольной группой крыс, которую не подвергали воздействию нанопорошков. Эту часть работы проводили в Российской медицинской академии последипломного образования (РМАПО).

Для переведения органов крыс в раствор (в целях последующего исследования методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой (АЭС с ИСП)) были опробованы следующие методы:

1. Сухое озонение при температуре 600 °С;

2. Мокрое озонение различными смесями кислот;

3. Автоклавное растворение.

Сухое озонение оказалось ненадёжным способом, так как приводило к значительным потерям анализируемого материала. Автоклавное растворение оказалось наиболее эффективным, но от него пришлось отказаться, так как у нас имелись автоклавы для растворения небольших образцов (до 1 г), а исследуемые органы имели большую массу. Поэтому в качестве метода растворения в данной работе мы выбрали эффективную классическую схему мокрого озонения.

Растворение органов проводили смесью концентрированных серной и азотной кислот. Полноты растворения добивались нагреванием органов в высоких термостойких стаканах с 10 мл серной кислоты до появления густых белых паров SO_3 с последующим внесением HNO_3 . При этом образуется нитрозилсерная кислота, являющаяся сильным окислителем и позволяющая перевести в раствор любые ткани и органы живых организмов. Внесение азотной кислоты продолжали до получения прозрачных растворов.

Затем полученные растворы переносили в стеклоглеродные чашки и обрабатывали смесью HF и HNO_3 для растворения карбида вольфрама и удаления H_2SiO_3 . Для предотвращения выпадения в осадок солей вольфрама добавляли 2 мл H_3PO_4 . После

этого растворы упаривали до полного удаления из раствора HF и H_2SO_4 (до полного прекращения выделения из растворов густых паров серной кислоты). К полученным сиропообразным растворам добавляли 1 мл концентрированной HNO_3 и 3 мл концентрированной HCl , растворы подогревали, переводили в мерные колбы и дистиллированной водой доводили объём растворов до 25 мл.

В растворах определяли содержание вольфрама, а также минеральный состав методом АЭС с ИСП. Исследования проводили на последовательном спектрометре фирмы "JOBIN YVON" ("ЖОБЕН ИВОН", Франция), модель "ULTIMA 2".

Спектрометр включает в себя монохроматор, высокочастотный генератор с частотой 40,68 МГц, микро-ЭВМ, под контролем которой программируются и осуществляются условия анализа.

Монохроматор — голографическая решетка 2400 штрихов/мм, фокусное расстояние 1 м, диапазон длин волн 160–800 нм. Низкое количество побочного света голографической решетки обеспечивается особой техникой ее приготовления — техникой ионного травления. Побочный свет увеличивает фон и, следовательно, концентрацию, эквивалентную фону, от которой напрямую зависит предел определения. Перемещение решетки осуществляется шаговым мотором с размером шага 0,001 нм и механической воспроизводимостью 0,0004 нм.

Программное обеспечение спектрометра "ULTIMA 2" дает возможность использовать 125000 эмиссионных спектральных линий. Все эти линии достаточно чувствительны 0,1–20 ppb, что, теоретически, позволяет определять элементы на уровне 10^{-5} %. Однако при переходе к реальным пробам мы столкнулись с проблемами ухудшения метрологических характеристик.

Общий минеральный анализ проб проводили по программе, разработанной для природных минеральных объектов на 25 элементов. В табл. 1 представлены полученные результаты по содержанию элементов в органах крыс. В растворах были обнаружены значительные количества калия, натрия, алюминия и железа. Литературные данные о влиянии этих элементов на определение вольфрама методом АЭС с ИСП немногочисленны. В связи с этим был проведён тщательный выбор аналитической длины волны для определения вольфрама. В табл. 2 представлены характеристики различных аналитических линий вольфрама.

Мы выбрали наиболее чувствительную аналитическую длину волны $\lambda = 207,911$ нм с пределом обнаружения 30 ppb ($3 \cdot 10^{-8}$ г/мл). Кроме того, было установлено, что элементы, мешающие определению

Элемент	Содержание элементов в различных органах экспериментальных животных							
	Сердце	Лёгкие	Мозг	Почки	Печень	Селезёнка	Гонады	Кровь
Sn	0,005	0,014	0,003	0,007	0,008	0,004	0,003	0,017
Mo	0,005	0,005	0,015	0,007	0,013	0,004	0,006	0,008
Sb	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
Zn	0,032	0,060	0,074	0,103	0,387	0,051	0,183	0,108
Pb	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
Ni	0,003	0,002	0,020	0,002	0,003	0,003	0,004	0,005
Bi	0,006	0,007	0,005	0,004	0,006	0,004	0,006	0,007
Co	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001
Cd	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
B	1,656	1,287	2,236	2,570	1,261	1,397	2,315	1,308
Mn	0,004	0,003	0,004	0,007	0,028	0,003	0,007	0,005
Fe	0,492	0,716	0,315	0,808	3,626	1,138	0,526	5,150
Cr	0,006	0,005	0,008	0,008	0,006	0,008	0,012	0,010
Mg	0,351	0,475	0,507	0,723	2,578	0,504	0,776	0,477
V	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
Be	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
Ca	0,311	0,710	1,010	0,657	0,815	0,247	0,356	0,567
Cu	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³	0,044	<10 ⁻³	<10 ⁻³	<10 ⁻³
Ti	0,024	0,032	0,031	0,027	0,036	0,015	0,037	0,034
Al	2,264	2,620	2,994	2,813	2,945	1,412	2,569	2,680
Sr	0,002	0,004	0,005	0,004	0,004	0,003	0,003	0,005
Na	1,808	3,201	2,833	3,262	4,828	1,338	3,320	6,645
K	0,558	1,123	1,203	1,017	5,004	1,097	1,872	2,320

Таблица 2

Характеристики аналитических линий вольфрама

λ, нм	Пределы обнаружения, ppb	Интенсивность	Мешающие элементы
207,911	30,0	1300	Cu, Ni, Ti
224,875	44,0	930	Cr, Fe
218,935	46,0	950	Cr, Fe, Ti
209,475	46,0	850	Al, Fe, Ni, Ti, V

вольфрама на этой длине волны (Cu, Ni, Ti), в анализируемых образцах практически отсутствуют [6]. Для корректного учета матричного эффекта использовали калибровочные растворы с таким же содержанием матричных элементов. В нашем распоряжении были растворы различных органов контрольной группы крыс, которую не подвергали воздействию нанопорошков карбида вольфрама. Калибровочные графики для определения вольфрама в интервале от 1 до 10 ppb, полученные с использованием растворов без матрицы и с ней, отличались в пределах инструментальной ошибки. При содержании вольфрама менее 1 ppb, проводили коррекцию матрицы, определяя содержание вольфрама по калибровочной кривой стандартов, содержащих основу.

Было изучено влияние кислот методом определение вольфрама на АЭС с ИСП. На рис. 1 представлены зависимости аналитических сигналов

вольфрама от природы и концентрации кислот, находящихся в анализируемом растворе. Из рис. 1 следует, что повышение концентрации кислоты приводит к понижению интенсивности аналитических сигналов, причём степень изменения зависит и от природы кислоты. Фосфорная кислота (C = 2,5 М) понижает аналитический сигнал на 30%, а соляная и азотная кислоты той же концентрации — на 10%.

Депрессирующее действие кислот связано с понижением температуры плазмы вследствие повышения затрат энергии на атомизацию молекул кислот.

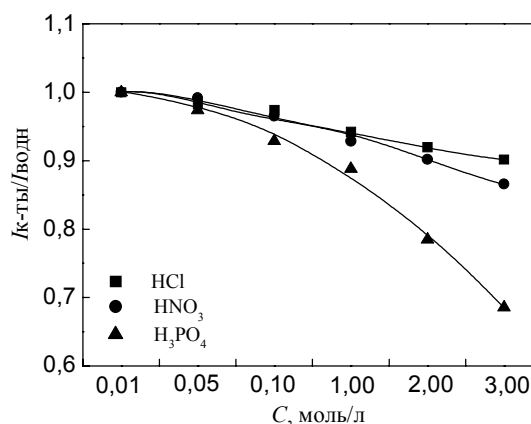


Рис. 1. Зависимость интенсивности сигнала вольфрама от природы и концентрации кислот.

Распределение порошков карбида вольфрама по органам экспериментальных животных

Размер порошка WC	Время*, недели	Количество карбида вольфрама в органе, мкг						
		Лёгкие	Печень	Почки	Сердце	Мозг	Селезёнка	Гонады
15 нм	1	256,0 ± 25	19,0 ± 2,3	8,0 ± 0,7	2,0 ± 0,2	6,0 ± 0,6	8,0 ± 0,6	1,2,0 ± 1
	4	153,0 ± 16,0	12,0 ± 2,1	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	4,0 ± 0,4	5,0 ± 0,4
	25	97,0 ± 9,2	12,0 ± 2,2	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4
60 нм	1	180,0 ± 19,0	15,0 ± 2,0	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	4,0 ± 0,4
	4	88,0 ± 10,0	18,0 ± 1,5	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1
	25	16,0 ± 6,4	14,0 ± 1,3	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
1,2 мкм	1	105,0 ± 15,0	4,0 ± 1,0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2
	4	25,0 ± 6,8	4,0 ± 1,0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2
	25	8,0 ± 1,1	4,0 ± 1,0	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
Контроль 1**	1	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Контроль 2	4	2,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Контроль 3	25	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2

*Сроки выведения животного из эксперимента после затравки.

** Контроль — образцы органов крыс, не подвергавшихся воздействию нанопорошков карбида вольфрама.

В практической работе необходимо учитывать, что неконтролируемые колебания концентрации кислот могут привести к погрешностям, существенно превышающим инструментальные. Кислотность стандартных растворов и проб необходимо поддерживать строго одинаковыми [7, 8].

Результаты работы и их обсуждение

Опыты по интратрахеальному введению наночастиц карбида вольфрама проведены с 96 крысами. Эксперименты отличались размером вводимых наночастиц и временем жизни животных. В каждой экспериментальной и контрольной позиции (каждой точке) исследовали органы 8 параллельных животных.

По разработанной методике определения вольфрама методом АЭС с ИСП нами были проанализированы 12 различных серий органов крыс (лёгкие, печень, почки, сердце, мозг, селезёнка, гонады). Каждый результат определения вольфрама, представленный в таблице 3 — среднее значение 8

параллельных анализов органов крыс. Относительное стандартное отклонение определения вольфрама не превышало 10% при доверительной вероятности 95%.

В результате проведённой работы были получены данные по распределению нанопорошков карбидов вольфрама в органах, представленные в табл.3.

Из полученных результатов следует, что наибольшее количество карбида вольфрама накапливается в лёгких и печени. Степень накопления и сроки выведения нанопорошков зависят от размера его частиц. Чем меньше размер частиц, тем больше они накапливаются в органах и тем хуже выводятся из организма. Частицы размером 1,2 мкм полностью выводятся за 25 недель, а частицы размером 15 нм сохраняются в органах даже через большой промежуток времени (рис. 2).

В отличие от частиц микро размеров, частицы наноразмеров способны преодолевать гематоэнцефалический барьер. Об этом свидетельствует повышенное содержание карбида вольфрама в мозге крыс, которым вводили порошки карбида вольфрама с размером частиц 15 нм и 60 нм, по отношению к контрольным животным. У крыс, которым вводился порошок с размером частиц 1,2 мкм, этого не наблюдается.

Нанопорошок проникает и в гонады, то есть вполне возможно его гонадотропное действие. Наименьшая степень накопления наночастиц карбида вольфрама была установлена в сердце.

Выводы

1. Разработана методика полного растворения органов крыс с использованием концентрированных H_2SO_4 и HNO_3 .

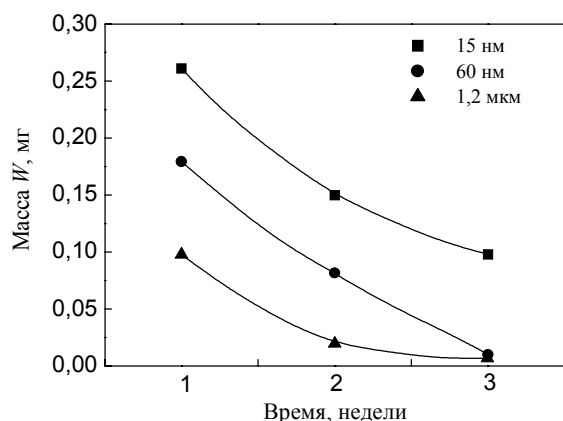


Рис. 2. Выведение карбида вольфрама из лёгких.

2. Найдена смесь кислот ($\text{HF} + \text{HNO}_3 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HCl}$) для перевода карбидов вольфрама, находящихся в органах, в раствор и предотвращения гидролиза вольфрама.

3. Получены данные по минеральному составу органов крыс.

4. Разработана методика определения вольфрама методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой в различных органах крыс:

— выбрана оптимальная аналитическая длина волны;

— изучено влияние природы и концентрации кислот в анализируемых растворах на аналитические сигналы.

5. Получены данные по распределению нанопорошков карбидов вольфрама в органах крыс:

— наибольшее его количество было обнаружено в лёгких и печени, а наименьшее в сердце;

— установлено, что наночастицы накапливаются и в других органах крыс, включая мозг, то есть преодолевают гематоэнцефалический барьер;

— наночастицы попадают и в гонады, то есть могут повлиять на наследственный аппарат животных;

— чем меньше размер частиц, тем больше они накапливаются в органах и тем медленнее выводятся.

6. Результаты исследований свидетельствуют о необходимости разработки критериев гигиенического нормирования наноматериалов в зависимости от размера частиц и физико-химических свойств.

Литература

1. Рит М. Наноконструирование в науке и технике. Введение в мир нанорасчета. Москва-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2005, 160 с.
2. Алферов Ж.И., Асеев А.Л., Гапонов С.В. и др. Наноматериалы и нанотехнологии. Микросистемная техника, 2003, № 8, с. 3 – 13.
3. Филов В.А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения V – VIII групп. Л.: Химия, 1989, 592 с.
4. Герцен П.А., Васина Т.А. Влияние нанопорошков на патогенную микрофлору. «Болезни цивилизации в аспекте учения В.И. Вернадского». Материалы третьей международной конференции. М.: Изд-во Российского университета дружбы народов. 2005, с. 378.
5. Boumans P.W. J.M. Line Coincidence Tables for Inductively coupled plasma Atomic Emission Spectrometry. Oxford Pergamon Press., 1984, v. 1, 2. 902 с.
6. Атомно-эмиссионный анализ с индукционной плазмой. Итоги науки и техники. Сер. Аналитическая химия. Т. 2 М.: ВИНТИ, 1990, 292 с.

Цветков Юрий Владимирович — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, академик РАН. Ведущий специалист в области физикохимии и технологии процессов воздействия высококонцентрированных источников энергии на вещество.

Баранов Владимир Иванович — Российская медицинская академия последипломного образования, кандидат медицинских наук, доцент. Специалист в области медицины и гигиены труда.

Казенас Евгений Константинович — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, доктор технических наук, заведующий лабораторией. Специалист в области термодинамики испарения, диссоциации при высоких температурах.

Волченкова Валентина Анатольевна — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области аналитической химии в том числе атомно-абсорбционного анализа и атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой.

Самохин Андрей Владимирович — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, кандидат технических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области плазмохимических процессов и аппаратов.

Алексеев Николай Васильевич — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области синтеза в термической плазме.

Благовещенский Юрий Вячеславович — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области плазмохимии и наноматериалов.

Герцен Павел Александрович — Российская медицинская академия последипломного образования, аспирант. Специалист в области медицины и гигиены труда.

Кряжков Иван Иванович — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, инженер-исследователь. Специалист в области атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционной плазмой.

Коровкина Наталья Федоровна — Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, научный сотрудник. Специалист в области плазменной нанопорошковой металлургии.