

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Chem. Listy 91, 1059 - 1062 (1997)

PŘÍMÉ STANOVENÍ MĚDI A ZINKU V PLNÉ LIDSKÉ KRVI METODOU ICP-MS

OTO MESTEK^a, EVA ČURDOVÁ^a, RICHARD KOPLÍK^b a TOMÁŠ ZIMA^c

^aÚstav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^cI. ústav lékařské chemie a biochemie, 1. lékařská fakulta, Karlova univerzita, Kateřinská 32, 120 00 Praha 2

Došlo dne 6.III.1997

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) patří v současnosti mezi velice dynamicky se rozvíjející metody prvkové analýzy. Svědčí o tom i situace v České republice. Zatímco ještě v nedávné době byla tato metoda provozována pouze jedinou laboratoří, v dnešní době s ní pracují již laboratoře tři. Mezi přednostmi metody ICP-MS patří zejména vysoká citlivost, široký lineární dynamický rozsah a možnost víceprvkového stanovení. Další předností je i možnost měření izotopových poměrů. Všechny tyto přednosti se využívají i při analýze tělních tekutin, zejména krve, plazmy a krevního séra, a to zejména proto, že metoda ICP-MS dovoluje v řadě případů práci s pouze naředěnými a nerozloženými vzorky. O stavu využití ICP-MS při analýze krve a krevních derivátů podává přehled literární rešerše provedená v Analytical Abstract za období I/80-IX/96. V tabulce I jsou uvedeny počty prací zabývající se touto problematikou. Je z ní patrné, že analýza plazmy a krevního séra je běžnější než analýza plné krve. Důvodem je zřejmě jednodušší manipulace s plazmou a sérem; obě tekutiny jsou oproti plné krvi méně viskózní, navíc odpadají problémy se srážením krve. Historicky první aplikací týkající se využití ICP-MS při analýze krevního séra je práce Van-Deijcka, Balkeho a Maessena¹, ve které

byl srovnán vysokotlaký rozklad, nízkoteplotní spalování a přímá analýza naředěného séra pro stanovení Ca. Již v této první práci byla dána přednost přímé analýze před rozkladem a od té doby byla přímá analýza aplikována na stanovení desítek různých prvků. Plazma nebo sérum bývá ředěno v poměru 1:5 až 1:25 vodou nebo častěji 1 %-ní HNO₃. Podmínky pro stanovení 19-ti prvků v krevním séru jsou popsány v práci² a analýza 36-ti prvků ve stejném materiálu byla popsána v práci³. Případy, kdy je nutné sérum nebo plazmu rozkládat, se týkají pouze stanovení As, Se nebo Sb metodou generování hydridů nebo izotopové analýzy těch prvků, jejichž některý sledovaný izotop je rušen signálem polyatomických iontů vznikajících z prvků obsažených v matrici. V takových případech je analýza doplněna zpravidla i o separaci sledovaného prvku od matrice.

Tabulka I

Počty citací věnující se analýze krve a krevních derivátů metodou ICP-MS

Materiál	Rozklad	Přímá analýza
Krev	16	4
Plazma nebo sérum	9	31

Jak vyplývá z tabulky I, analýza plné krve je prováděna méně často. Je to na škodu věci, protože k popisu stavu pacienta podle zkušeností autorů je nutno znát obsah kovů jak v séru nebo plazmě, tak i v plné krvi. Distribuce kovů mezi dvě složky krve (plazmu a erythrocyty) je regulovaná a změny mezi nimi mohou být obrazem stavu pacienta a mohou být i korelovány s různými diagnózami⁴. Při analýze plné krve je také běžnější použití rozkladu než přímé analýzy, jedná se zejména o rozklad v uzavřených nádobkách, ať již tlakový nebo mikrovlnný. Podmínky pro stanovení 15-ti prvků po rozkladu plné krve byly popsány např. v práci⁵. O tom, že i přímá analýza plné krve metodou ICP-MS je možná, svědčí ale např. práce⁶. Pro stanovení celkového obsahu Pb a zastoupení jednotlivých izotopů Pb byla krev naředěna v poměru 1:10 roztokem obsahujícím NH₃, (NH₄)₂H₂EDTA, NH₄H₂PO₄ a Triton X-100. Stejný

postup byl použit i pro stanovení izotopového zastoupení Fe⁷ a dále byl zjednodušen pro stanovení Pb a Cd na pouhé ředění krve roztokem obsahujícím NH₃ a Triton X-100 (cit. 8). Stejně tak lze ale krev ředit i kyselými roztoky: pro analýzu Pb⁹ byla krev ředěna v poměru 1:25 až 1:100 tak, že konečný roztok obsahovat 0,1 % Tritonu X-100 a 0,2 % HNO₃. Ve všech případech bylo k ředění krve použito povrchově aktivní činidlo pro prevenci srážení krve v tryskách zmlžovače přístroje ICP-MS, které současně zajistí i rychlé vymývání.

V poslední studii¹⁰ bylo ukázáno, že přímá analýza krve metodou ICP-MS je vhodná pro stanovení Se. Plná krev byla naředěna v poměru 1:10 tak, že konečný roztok obsahoval 0,1 % Tritonu X-100 a 0,2 % HNO₃. Pro potlačení interferencí způsobených zejména ionty ArCl⁺, které ruší signál měřeného izotopu ⁷⁷Se, byly kalibrační roztoky obohaceny o důležité doprovodné složky obsažené v lidské krvi¹¹; jednalo se zejména o NaCl, KCl, Ca(NO₃)₂, cystein, FeCl₃ a KBr. Výsledky analýz byly srovnány s analýzami provedenými metodou plamenové AAS s generováním hydridů po totálním rozkladu krve. Korelační koeficient mezi těmito dvěma postupy dosáhl hodnoty 0,96 (*n* = 11). Cílem předložené studie je možnost rozšíření této metody i na stanovení Cu a Zn v lidské krvi.

2. Experimentální část

2.1. Odběr vzorků a zpracování krve

Vzorky krve byly získány od dobrovolných dárců krve a od pacientů hemodialyzačního střediska. Krev byla odbírána do PE zkumavek předem vyčištěných loužením ve zředěné HNO₃ a redestilované vodě a okamžitě po odběru byla stabilizována přidávkou heparinu (0,5 ml heparinu na 10 ml krve). Vzorky byly uchovávány v ledničce při 4 °C, před vlastní analýzou byly vytemperovány na laboratorní teplotu a důkladně protřepány.

2.2. Přímá analýza krve

Vzorky krve byly upraveny podle následujícího schématu: do 10 ml odměrné baňky se odpipetovalo 1 ml 1 %-ního Tritonu X-100 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), 1 ml krve a přidalo se přibližně 5 ml redestilované vody, po promíchání se přidalo 2 ml 1 %-ní HNO₃ a 0,2 ml roztoku In 5 mg.l⁻¹ (vnitřní standard) a roztok byl doplněn po značku a promíchán. Vzniklý roztok je stálý alespoň dva

dny. Tento stupeň ředění je nezbytný v případě, kdy se zároveň analyzuje i Se, v opačném případě je možný stupeň ředění 1:25 (použití 25 ml odměrné baňky).

Tři kalibrační roztoky obsahující 40, 80 resp. 200 μg.l⁻¹ Cu a současně 200, 400 resp. 1 000 μg.l⁻¹ Zn, byly připraveny ze zásobních roztoků kovů 1 000 mg.l⁻¹ (Analytika, Praha). Do těchto standardních roztoků a slepého pokusu byl přidán též Triton X-100, roztok vnitřního standardu a dále byly tyto roztoky obohaceny v poměru 1+99 roztokem modelujícím doprovodné složky v krvi. Složení tohoto roztoku je následující: 8 g NaCl + 0,4 g KCl + 0,6 g Ca(NO₃)₂.4H₂O + 6,6 g cystein.HCl.H₂O + 2,23 g FeCl₃.6H₂O + 0,07 g KBr + H₂O do 100 ml.

Všechny chemikálie byly získány od firmy Merck (Darmstadt, SRN), kromě cysteinu, který byl získán od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Roztok In pro přípravu vnitřního standardu byl získán od firmy Analytika (Praha) a použitá kyselina dusičná byla čistoty p.a. (Lachema, Brno).

2.3. Analýza krve po rozkladu

Vzorky krve byly zpracovány následovně: 1 ml krve byl rozložen s 1 ml HNO₃ a 1 ml H₂O₂ v tlakovém rozkladném zařízení s fokusovaným mikrovlnným polem BM-1S/II (Plazmotronika, Wrocław, Polsko). Postačující doba rozkladu je 10 min. Čirý roztok byl převeden redestilovanou vodou do 25 ml odměrné baňky a po přidání 0,5 ml roztoku vnitřního standardu In (5 mg.l⁻¹) se baňka doplnila redestilovanou vodou na objem a promíchala. Vyšší stupeň ředění byl použit proto, že v tomto případě roztok nesloužil k souběžnému stanovení Se.

Kalibrační roztoky obsahovaly 20, 40 resp. 100 μg.l⁻¹ Cu a současně 100, 200 resp. 500 μg.l⁻¹ Zn a byly připraveny opět ze zásobních roztoků kovů 1 000 mg.l⁻¹ a upraveny přidáním vnitřního standardu In a HNO₃ v takovém množství, aby jejich koncentrace odpovídala vzorkům.

2.4. Měření technikou ICP-MS a výběr izotopu k měření

Všechna měření byla provedena na přístroji Elan 6000 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Optimální podmínky měření Cu a Zn jsou uvedeny dále: Příkon do plazmatu 1000 W, trvání odečtu signálu (dwell time) 50 ms, počet skenů na opakování (sweeps/replicate) 20, počet opakování 3, celkový integrační čas 3 s, způsob měření odečet na vrcholu píku (peak hopping), průtok Ar

zmlžovačem 0,825 l.min⁻¹ a rychlost nasávání vzorku 1 ml.min⁻¹. Protože je obtížné hledat české ekvivalenty anglických termínů používaných při práci s přístrojem, jsou uvedeny i originální názvy použitých přístrojových parametrů.

Měď je tvořena dvěma stálými izotopy: ⁶³Cu (69,1 %) a ⁶⁵Cu (30,9 %). Zinek je tvořen pěti stálými izotopy: ⁶⁴Zn (48,9 %), ⁶⁶Zn (27,8 %), ⁶⁷Zn (4,1 %), ⁶⁸Zn (18,6 %) a ⁷⁰Zn (0,62 %). Pro měření byly vybrány izotopy ⁶⁵Cu a ⁶⁶Zn, které nejsou maticí krve příliš ovlivňovány^{11,12}. Koncentrace doprovodných složek odpovídající desetinasobně naředěné krvi vyvolá zdánlivou odezvu odpovídající přibližně koncentraci 4 μg.l⁻¹ jak Cu, tak Zn. Vhodné složení standardních roztoků (viz výše) pomůže eliminovat i tento poměrně malý vliv.

3. Diskuse výsledků

Srovnání obou výše popsaných metod bylo provedeno analýzou dvanácti různých vzorků krve. Analýzy provedené oběma metodami byly vyhotoveny vždy ve dvou opakováních. Pro stanovení obou prvků byla nejprve vypočtena směrodatná odchylka opakovatelnosti, pro kterou v případě dvou opakování platí vztahu:

$$s_e = \sqrt{\frac{(x_{i1} - x_{i2})^2}{2 \cdot n}} \quad (1)$$

kde x_{i1} a x_{i2} jsou výsledky obou duplicitních analýz a n je počet vzorků ($n = 12$). Zároveň byl proveden i výpočet parametru b regresní závislosti:

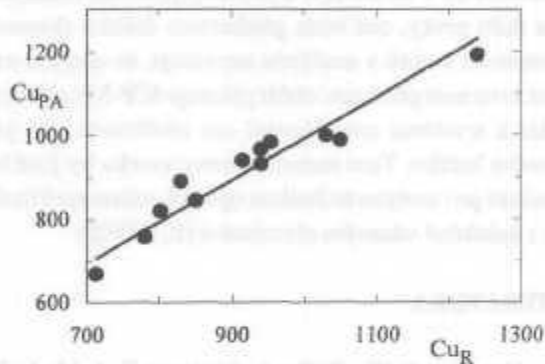
$$[Me]_{PA} = b \cdot [Me]_R \quad (2)$$

kde Me je obsah Cu nebo Zn v μg.l⁻¹ a indexy PA značí přímou analýzu a R analýzu po rozkladu. Regresní závislost procházející počátkem byla zvolena proto, že statistické testy provedené pro oba kovy ukázaly, že posunutí přímky proti počátku (systematická chyba metody) není významné. Tento posun činil 45 ± 233 mg.l⁻¹ pro Cu a 92 ± 700 mg.l⁻¹ pro Zn. Zároveň byl vypočteny i korelační koeficienty r mezi oběma postupy. Výsledky statistických testů jsou shrnuty v tabulce II a průběhy obou regresních závislostí jsou ukázány v obrázcích 1 a 2. Z výsledků testů vyplývá, že směrodatná odchylka opakovatelnosti s_e obou metod je v případě obou stanovovaných prvků srovnatelná a v pře-

Tabulka II

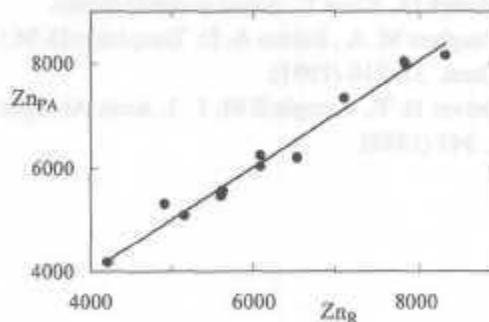
Výsledky statistického porovnání obou metod analýzy krve

Veličina	Cu	Zn
s_e přímá analýza [μg.l ⁻¹]	12	87
s_e rozklad [μg.l ⁻¹]	17	105
b	0,991±0,026	1,001±0,020
r	0,965	0,988



Obr. 1. Srovnání obsahů Cu v lidské krvi nalezených přímou analýzou a analýzou po rozkladu

Cu_R - obsah Cu [mg.l⁻¹], analýza po rozkladu; Cu_{PA} - obsah Cu [mg.l⁻¹], přímá analýza



Obr. 2. Srovnání obsahů Zn v lidské krvi nalezených přímou analýzou a analýzou po rozkladu

Zn_R - obsah Zn [mg.l⁻¹], analýza po rozkladu; Zn_{PA} - obsah Zn [mg.l⁻¹], přímá analýza

počtu na průměrný obsah prvku v lidské krvi činí asi dvě procenta. Koeficienty korelace mezi oběma metodami se jen málo liší od jedné a statisticky se od jedné neliší ani směrnice regresního vztahu mezi výsledky obou metod.

4. Závěr

Porovnáním bylo ukázáno, že pro stanovení Cu a Zn v lidské krvi není nutné provádět rozklad a výsledky získané přímou analýzou jsou v dobré shodě s výsledky metody zahrnující rozklad krve v mikrovlnném zařízení. Tento postup nejenom velice zjednoduší provedení analýzy, ale významně omezí potenciální kontaminace nebo ztráty analytu, ke kterým každý rozklad nepochybně určitým způsobem přispívá¹³. Metoda byla již dříve aplikována na stanovení Se v lidské krvi a je pravděpodobně rozšiřitelná i na další prvky, což bude předmětem dalšího zkoumání. Zkušenosti autorů s analýzou naznačují, že analýza naředěné krve není přílišnou zátěží přístroje ICP-MS a že nedochází k trvalému znečišťování ani zmlžovače, ani plazmového hořáku. Tato metoda úpravy vzorku by jistě byla vhodná i pro analýzu technikou optické emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

LITERATURA

1. Van-Deijck W., Balke 1, Maessen F. J. M. J.: Fresenius' Z. Anal. Chem 317, 121 (1984).
2. Vandecasteele C, Vanhoe H., Dams R.: J. Anal. At. Spectrom. 8, 781 (1993).
3. Morita H., Kita T., Umeno M., Morita M., Yoshinaga J., Okamoto K.: Sci. Total Environ. 151, 9 (1994).
4. Mestek O., Zima T.: dosud nepublikováno.
5. Vaughan M. A., Baines A. D. Templeton D. M.: Clin. Chem. 37, 210 (1991).
6. Delves H. T., Campbell M. J.: J. Anal. At. Spectrom. 3, 343 (1988).
7. Whittaker P. G., Barrett F. J. R., Williams J. G.: J. Anal. At. Spectrom. 7, 109 (1992).
8. Stroh A.: At. Spectrosc. 14, 141 (1993).
9. Laszity A., Viczian M., Wang X., Barnes R. M.: J. Anal. At. Spectrom. 4, 761 (1989).
10. Mestek O., Suchánek M., Vodičková Z., Zemanová B., Zíma T.: J. Anal. At. Spectrom. 12, 85 (1997).
11. Vanhoe H., Vandecasteele C, Versieck J, Dams R.: Anal. Chem. 61, 1851 (1989).
12. Vanhoe H., Goossens J., Moens L., Dams R.: J. Anal. At. Spectrom. 9, 177 (1994).
13. Hoening M., Kersabiec A. M.: Spectrochim. Acta, Part B 51, 1297 (1996).

O. Mestek^a, E. Čurdová^a, R. Koplík^b, and T. Zíma^c

(^aDepartment of Analytical Chemistry, ^bDepartment of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague, ^cFirst Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague): **Direct Determination of Cu and Zn in Whole Human Blood by ICP-MS**

The method of the direct determination of Cu and Zn by ICP-MS in the whole human blood 1:9 diluted with Triton X-100 and HNO₃ (0.1 % Triton X-100 and 0.2 % HNO₃ in the final solution) was compared with the method based on blood decomposition in a microwave apparatus. Correlation coefficients between both methods were 0.965 and 0.988 for Cu and Zn, respectively (n = 12). The relative standard deviation of repeatability was about 2 % for both methods and metals. The direct analysis without sample decomposition is recommended.