

PŘÍMÉ STANOVENÍ CHROMU V KREVNÍM SÉRU METODOU ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE S ELEKTROTHERMICKOU ATOMIZACÍ

OTO MESTEK^a, TOMÁŠ ZIMA^b,
MILOSLAV SUCHÁNEK^a a JANA ŽILKOVÁ^a

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

Došlo dne 29.XII.1997

1. Úvod

Chrom je v organismu obratlovců stopovým prvkem. Zasahuje především do metabolismu sacharidů a lipidů, stimuluje aktivitu enzymů metabolismu glukosy, syntézy mastných kyselin a cholesterolu, zvyšuje také účinek inzulínu. Nedostatek chromu se projevuje glukosovou intolerancí, hypercholesterolemií a hypertriglyceridemií. Nízké koncentrace chromu byly popsány u diabetes mellitus, hyperlipidemií a naopak zvýšené hodnoty byly nalezeny u pacientů s chronickým renálním selháním, kde je změřeno vylučování chromu z organismu^{1,2}.

Při analýze stopových koncentrací prvků v biologických (ale i jiných) matricích je nutno dávat přednost těm metodám, které umožňují přímou analýzu vzorku bez rozkladu a separace analytu. Minimální počet operací prováděných se vzorkem omezuje případné kontaminace nebo ztráty analytu a zároveň i zefektivňuje analytický proces³. Pro stanovení řady prvků v plné krvi i jiných tělních tekutinách se dnes již běžně používá hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)^{4,5}. Vzhledem k obtížně odstranitelným interferencím způsobeným polyatomickými ionty však tato metoda bez odstranění veškerého uhlíku ze vzorku není pro přímou analýzu chromu vhodná⁶⁻⁷. Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETAAS) proto při analýze chromu zůstává nejjvhodnější metodou.

Přímá analýza chromu v krevním séru byla např. prováděna po zředění vzorku roztokem Tritonu X-100 (cit.⁸⁻⁹)

nebo zředěnou HNO₃ (cit.¹⁰), případně směsí těchto činidel¹⁰⁻¹¹. Okyselení séra zajistí nejen ve větší stabilitu roztoků, ale zvýší bezpečnost práce likvidací infekčních agens. Při měření metodou ETAAS je důležitá volba chemického modifikátoru matrice. Mezi používané modifikátory pro stanovení chromu patří např. Mg(NO₃)₂ nebo Ca(NO₃)₂ (cit.^{10,12}), Rh nebo Pt¹⁰, případně NH₄VO₃, Na₂MoO₄ nebo Na₂WO₄ (cit.⁹). Jak však bylo poukázáno v práci¹³, nepřináší použití modifikátoru matrice v případě analýzy chromu žádné zvláštní výhody a při použití atomizace z povrchu ky vety potažené vrstvou pyrolytického grafitu lze dosáhnout dostatečně vysoké teploty pyrolýzy i bez použití modifikátoru. Problém při analýze chromu může nastat s korekcí absorpce způsobené pozadím: linie 357,9 nm používaná pro měření Cr totiž leží na samém okraji použitelnosti běžně používaného deuteriového korektoru pozadí (kontinuální zdroj záření). Univerzální korekce pozadí pomocí Zeemanova jevu (štěpení absorpčních hladin v magnetickém poli) nepatří vzhledem k pořizovacím nákladům k běžnému vybavení laboratoří. Možnost korekce pomocí jiného kontinuálního zdroje, a to wolframové halogenové žárovky popsané např. v práci¹⁴, není v současné době komerčně dostupná. Při pečlivě voleném teplotním programu analýzy lze však velikost absorpce způsobené pozadím značně omezit, takže korekce pomocí deuteriové lampy je dostatečná, případně je možné korekci vůbec neprovádět¹³.

2. Experimentální část

2.1. Instrumentace

Všechna měření byla prováděna na atomovém absorpčním spektrometru GBC 932AA ve spojení s elektrotermickým atomizátorem GBC GF 3000 a automatickým dávkovačem GBC PAL 3000 (vše GBC, Dandenong, Victoria, Austrálie). Měření obsahu chromu bylo prováděno na linii 357,9 nm za korekce pozadí pomocí deuteriového korektoru pozadí. Měřena byla výška atomizačního píku a měření bylo prováděno vždy třikrát. Množství dávkovaného vzorku bylo 20 μl a atomizace byla prováděna ze stěny grafitové ky vety s povlakem pyrolytického grafitu (Z-TEK, Amsterdam, Holandsko). Teplotní program analýzy je patrný z tabulky I.

Tabulka I
Teplotní program stanovení Cr v krevním séru

Krok	Teplotní program ^a	Ochranná atmosféra
Sušení	70/1/60 100/30/0 140/5/5	N ₂
Pyrolýza	600/20/0 1100/10/5	Ar
Atomizace	2400/1,5/3	průtok inertu zastaven
Čištění kvety	2500/1/5	Ar

^a Teplota [°C]/čas nárůstu [s]/čas setrvání [s]

2.2. Reagencie

Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku 1 000 mg. l⁻¹ Cr (Analytika, Praha). Pro přípravu vzorků i kalibračních roztoků byl použit Triton X-100 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), HNO₃ čistoty Suprapur (Merck, Darmstadt, SRN) a redestilovaná voda.

2.3. Odběr a příprava vzorků pro analýzu

Krev byla od dobrovolných dárců odebírána na lačno venupunkcí kubitální žíly pomocí ocelových jehel (Medicor, 38/9) a běžných plastových injekčních stříkaček (Chirana, 10 ml). U hemodialyzovaných pacientů byla krev odebírána před zahájením dialýzy z arteriovenózní fistule. Krev byla převedena do PE zkumavek předem vyčištěných loužením ve zředěné HNO₃ a redestilované vodě a po sražení při pokojové teplotě (cca 20-30 min) bylo krevní sérum odděleno centrifugací (3 000 ot.min⁻¹ podobu 10 min). Oddělené sérum bylo převedeno do dalších čistých PE zkumavek a okamžitě zmrazeno na teplotu -18 °C. Stabilita byla zjišťována pomocí opakovaných analýz a bylo zjištěno, že zmrazené sérum je stabilní alespoň dva týdny. Před analýzou bylo sérum rozmrazeno a po vytemperování bylo naředěno v poměru 1 + 1 roztokem tvořeným zároveň 0,1%-ním Tritonem X-100 a 0,14 mol.l⁻¹ HNO₃. Kalibrační roztok 10 μg.l⁻¹ Cr byl připraven ředěním zásobního roztoku 1 000 mg.l⁻¹ Cr a byl připraven v prostředí obsahující stejnou koncentraci HNO₃ a Tritonu X-100 jako vzorky. Ostatní kalibrační body (2,5, 5 a 7,5 μg.l⁻¹ Cr) byly získány automatickým ředěním tohoto roztoku v automa-

tickém dávkovači vzorků. Při analýze plné krve byly vzorky připraveny ředěním krve ve stejném poměru roztokem obsahujícím pouze 0,1%-ní Triton X-100.

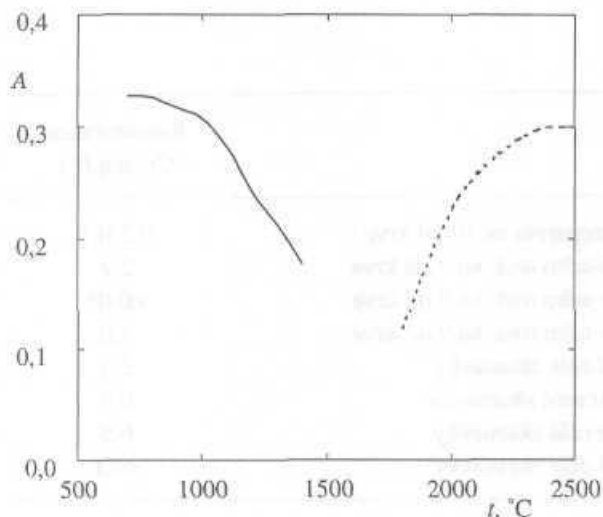
3. Diskuse

3.1. Teplotní program analýzy ETAAS

Konečný teplotní program analýzy je uveden v tabulce I. Opakovatelnost výsledků měření atomovou absorbní spektrometrií je ovlivněna zejména opakovatelností dávkování vzorku a dokonalostí vysušení. Ostatní kroky jako pyrolýza a atomizace mají vliv již pouze na citlivost stanovení, případně na velikost interferencí¹⁵. Sušení vzorku obsahujícího velké množství bílkovin musí být velice pozvolné, jinak hrozí pění vzorku a jeho únik dávkovacím otvorem kvety. Pro analýzu krevního séra se osvědčilo třístupňové sušení: při 70 °C dojde ke ztrátě většiny vody a vytvoří se tuhá pěna vzorku, při 100 °C dojde k dosušení zbylé vody a při 140 °C dojde k odpaření zbytků HNO₃. Dokonalá pyrolýza je zárukou potlačení většiny interferencí. Pro analýzu krevního séra a plné krve je nutné provést dvoustupňovou pyrolýzu: první krok pyrolýzy probíhá při nižší teplotě a slouží k odstranění organických látek, druhý krok pyrolýzy probíhá při vyšší teplotě a slouží k odstranění anorganických solí¹⁴. Pro první krok pyrolýzy byla zvolena teplota 600 °C s pomalým nárůstem teploty. Rozklad organických látek bylo možno pozorovat v podobě dýmu unikajícího z dávkovacího otvoru kvety a uvedená teplota a doba nárůstu 20 s se ukázala jako dostatečná. Optimalizace teploty druhého kroku pyrolýzy a teploty atomizačního kroku je patrná z obr. 1. Absorbance způsobená pozadím takto analyzovaného vzorku krevního séra má hodnotu 0,020-0,030 jednotek absorbance a přestože emisní signál deuteriové výbojky je ve srovnání se signálem chromové výbojky s dutou katodou přibližně poloviční, experimenty ukázaly, že postačuje k úspěšné korekci signálu způsobeného pozadím.

3.2. Mez detekce, správnost a přesnost metody

Porovnání směrnice kalibračních přímek získaných měřením roztoků obsahující chrom pouze v prostředí Tritonu X-100 a HNO₃ a vzorků krevního séra obohaceném přídávky chromu (viz obr. 2) ukázalo, že pro analýzu je možné použití externí kalibrace a není nutná aplikace metody standardních přídávků. Směrnice kalibrační přímky zís-



Obr. 1. Optimalizace teploty pyrolýzy (—) a atomizace (---) ETAAS stanovení Cr v krevním séru

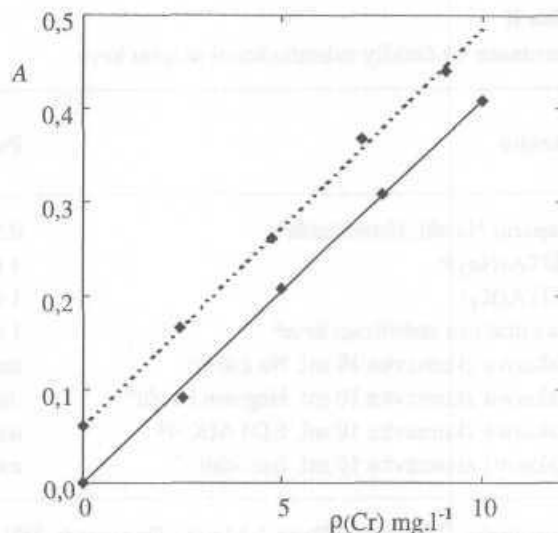
kaná měření vodných roztoků měla hodnotu 0,0409 jednotek absorbance na $\mu\text{g.l}^{-1}$, zatímco hodnota směrnice získaná měřením obohacených vzorků séra měla hodnotu 0,0425 jednotek absorbance na $\mu\text{g.l}^{-1}$. Rozdíl mezi oběma směrnici činil necelé 4 %.

Mez detekce metody byla určena opakovaným měřením signálu slepého pokusu ($n = 10$) a byla vypočtena jako koncentrace odpovídající trojnásobku signálu rovného výběrové směrodatné odchylce slepých roztoků. Pro novou grafitovou kyvetu činila mez detekce $0,24 \mu\text{g.l}^{-1}$ a nezměnila se ani po provedení analýz 15 vzorků. Po provedení zhruba 20 analýz je nutno z kyvety odstranit uhlíkaté úsady vzniklé nedokonalým rozkladem vzorku.

Správnost metody byla ověřena analýzou referenčního materiálu Seronorm Trace Element Serum (Nycomed, Oslo, Norsko), pro který výrobce udává hodnotu $1,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr s rozmezím $1,3-1,9 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr. Hodnoty nalezené analýzou prezentovanou metodou byly $1,6$, $1,7$ a $1,9 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr, všechny výsledky tedy leží v intervalu udávaném výrobcem. Směrodatná odchylka opakovatelnosti výsledků získaná výpočtem z duplicitních stanovení ($n = 9$) vzorků s obsahem $1-2 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr měla hodnotu $0,11 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ostatní zdroje nejistot (koncentrace zásobního kalibračního roztoku, příprava kalibračního roztoku ředěním a odměřování vzorku) přinášejí k celkové nejistotě konečného výsledku analýzy řádově nižší příspěvek¹⁶.

3.3. Odběr vzorků

Koncentrace chromu v krevním séru¹⁷ dosahuje hodnot



Obr. 2. Srovnání analýzy vodných roztoků Cr (—) a obohaceného krevního séra (....)

desetin až jednotek mg.l^{-1} , výsledky analýz proto mohou být snadno znehodnoceny kontaminací z odběrových zařízení. Kontaminace může nastat např. z odběrových ocelových jehel¹⁸⁻¹⁹, tento jev je ale často přeceňován. Testy s opakovaným prosáváním plné krve ocelovou jehlou ukázaly, že množství chromu vylouženého při jednom průchodu krve jehlou je zanedbatelné¹³⁻¹⁴. Stejně tak podobné testy provedené v této studii ukázaly, že loužení chromu z použitých ocelových jehel do krevního séra i možnost kontaminace z použitých plastických injekčních stříkaček jsou zanedbatelné (nižší než mez detekce metody). Oproti tomu kontaminace do $0,14 \text{ mol.l}^{-1}$ HNO_3 může nabýt významných hodnot $0,2-0,3 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr. Tato „obyčejná“ odběrová zařízení mohou způsobit menší kontaminace, než některá zařízení speciální. Tak např. v odběrové injekční stříkačce vybavené kanylou z vnitřním teflonovým povlakem a určené pro odběr krve pro stanovení stopových množství kovů (LH-Metall-Analytik, SARSTEDT Mono-vete), pro kterou výrobce deklaruje maximální obsah 5 ng Cr , toto množství skutečně může být obsaženo. Z náhodně vybraného kusu stříkačky se po naplnění 10 ml $0,1 \%$ roztoku Tritonu a $0,14 \text{ mol.l}^{-1}$ HNO_3 (slepým roztokem) vyloužily 4 ng Cr , což odpovídá zvýšení koncentrace o $0,4 \mu\text{g.l}^{-1}$ Cr.

3.4. Možnost analýzy plné krve

Výše popsaná technika analýzy je aplikovatelná i na analýzu plné krve¹³⁻¹⁴⁻²⁰. Vzorek krve se ředí roztokem Tri-

Tabulka II

Kontaminace Cr činidly zabraňujícími srážení krve

Činidlo	Použití	Kontaminace Cr [mg.l ⁻¹]
Heparin Na sůl, různé šarže ^a	0,5 ml preparátu na 10 ml krve	0,2-0,3
EDTA(Na ₂) ^b	1 ml 1%-ního rozt. na 9 ml krve	2,2
EDTA(K ₂) ^c	1 ml 1%-ního rozt. na 9 ml krve	<0,05
Na citrát pro stabilizaci krve ^c	1 ml 4%-ního rozt. na 9 ml krve	1,0
Vakuová zkumavka 10 ml, Na citrát ^d	naplnění celé zkumavky	2,3
Vakuová zkumavka 10 ml, Heparin Li sůl ^d	naplnění celé zkumavky	0,7
Vakuová zkumavka 10 ml, EDTA(K ₃) ^d	naplnění celé zkumavky	0,5
Vakuová zkumavka 10 ml, bez aditiv*	naplnění celé zkumavky	<0,1

^aLéčiva Praha, ^bLachema Brno, ^cMerck, Darmstadt, SRN, ^dVacutainer, Becton Dickinson

tonu X-100 (bez použití HNO₃), průběh teplotního programu a použití modifikátorů matrice je podobné jako při analýze séra. Při vlastní analýze však může nastat několik vážných problémů. Prvním z nich je množství dehtových sloučenin vznikajících při pyrolyze, které následně mohou kondenzovat na chladnějších částech tělesa elektrotermického atomizátoru. Také množství uhlíkových úsad vznikajících uvnitř atomizátoru je větší než při analýze krevního séra. S tímto problémem se lze vypořádat pyrolyzou v proudě kyslíku, jak bylo popsáno pro stanovení Pb^{21,22} a Cd²². Podle zkušeností autorů se jedná o obtížné hledání teploty pyrolyzy, při které již dochází ke spalování součástí vzorku, ale zároveň ještě nedochází k poškození kyvety a následnému snižování její životnosti. Druhým problémem je možnost kontaminace z činidel zabraňujících srážení krve. V praxi se používají roztoky různých solí heparinu, citrát sodný nebo sodná či draselná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). K odběru nesrážlivé krve se běžně používají vakuové zkumavky, které již obsahují přídavek některého konzervačního činidla. Velice obtížně se hledá taková látka, která nezpůsobuje kontaminace. V tabulce II je uvedeno zvýšení koncentrace chromu při běžném použití daného činidla. Je patrné, že pouze didraselná sůl EDTA (Merck, Darmstadt, SRN) vyhovuje požadavkům na čistotu.

3.5. Chrom v organismu

V provedené úvodní studii byl stanovován obsah chromu ve skupině pacientů s chronickým renálním selháním docházejících pravidelně na dialýzu ($n = 19$). Průměrný obsah chromu v séru u této skupiny byl 3,7 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cr

s rozmezím hodnot 1,4-6,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cr. V kontrolní skupině dobrovolných dárců krve ($n = 17$) byl u sedmi osob nalezený obsah chromu nižší než mez detekce metody, u jedné osoby byl nalezen obsah chromu 2,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$, zatímco u ostatních osob se obsah chromu pohyboval v rozmezí 0,3-0,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (průměr 0,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$).

4. Závěr

Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací je metoda při stanovení obsahu stopových prvků běžně používaná a jak bylo ukázáno, poskytuje spolehlivé výsledky i při analýze chromu. Největší úskalí metody však není typické pouze pro chrom, ale i pro řadu dalších prvků: je jím potenciální kontaminace, která může zcela znehodnotit výsledky analýz. Nezbytnou podmínkou úspěšné analýzy je tedy důkladná kontrola čistoty všech chemikálií a zařízení přicházejících do styku se vzorkem. Optimalizací teplotního programu se podařilo snížit hodnotu absorbance způsobené pozadím, takže i pro chrom méně vhodná korekce pomocí deuteriové výbojky vede k nízké meze detekce.

Metoda stanovení chromu umožní zjistit u pacientů jeho nedostatek a následně může vést k jeho možné suplementaci. Tato suplementace může pozitivně ovlivnit deficit chromu jako jeden z faktorů závažných civilizačních chorob jako je diabetes mellitus a ateroskleróza.

Vznik této práce byl podpořen grantem Ministerstva životního prostředí ČR Monitoring cizorodých látek v po-

LITERATURA

1. Linder M. C., v knize: *Nutritional Biochemistry and Metabolism with Clinical Application* (Linder M. C., ed.), 2. vydání, str. 215. Prentice-Hall, New York 1991.
2. Stoecker B. J.: *Chromium in Present Knowledge in Nutrition* (Ziegler E. E. a Filer L. J. Jr., ed.), 7. vydání, str. 344. ILSI Press, Washington D.C. 1996.
3. Hoening M., Kersabiec A. M.: *Spectrochim. Acta, Part B* 57, 1297(1996).
4. Mestek O., Suchánek M., Vodičková Z., Zemanová B., Zima T.: *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 85 (1997).
5. Mestek O., Čurdová E., Koplík R., Zima T.: *Chem. Listy* 91, 1059(1997).
6. Alimonti A., Petrucci F., Santucci B., Cristaudo A., Caroli S.: *Anal. Chim. Acta* 306, 35 (1995).
7. Lam J. W. H., McLaren J. W., Methven B. A. J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 551 (1995).
8. Manzoori J. L., Saleemi A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 337 (1994).
9. Thomaidis N. S., Piperaki E. A., Polydorou C. K., Efsthathiou C. E.: *J. Anal. At. Spectrom.* 11, 31 (1996).
10. Bulska E., Wróbel K., Hulanicki A.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 342, 740 (1992).
11. Ericson S. P., McHalsky M. L., Rabinow B. A., Kronholm K. G., Arceo C. S., Weltzer J. A., Ayd S. W.: *Clin. Chem.* 32, 1350 (1986).
12. Gong B., Liu Y.: *At. Spectrosc.* 11, 229 (1990).
13. Granadillo V. A., Parra de Machado L., Romero R. A.: *Anal. Chem.* 66, 3624 (1994).
14. McAughy J. J., Smith N. J.: *Anal. Chim. Acta* 193, 37(1987).
15. Hoening M., de Kersabiec A-M.: *Jak zajistit kvalitu výsledků v elektrotermické atomové absorpční spektrometrii?* str. 41. Spektroskopická společnost Jana Marca Marci, Praha 1996.
16. Suchánek M., Plzák Z., Šperková J.: *Sborník konference Uncertainty in Chemicals Analysis, Berlín, září 1997.*
17. Wallach J.: *Interpretation of Diagnostic Tests.* 5. vydání, str. 773. Little, Brown and Co., Boston 1992.
18. Versieck J., Cornelis R.: *Anal. Chim. Acta* 116, 217 (1980).
19. Spěvák V.: *Kurz atomové absorpční spektroskopie (pro pokročilé).* Spektroskopická společnost Jana Marca Marci, Praha 1996.
20. Ajayi O. O., Ansari T. M., Littlejohn D.: *J. Anal. At. Spectrom.* 7,689(1992).
21. Eaton D. K., Holcombe J. A.: *Anal. Chem.* 55, 946 (1983)
22. Maeda T., Nakatani M., Tanimoto Y.: *Bunseki Kagaku* 38, 734 (1989); *Chem. Abstr.* 112, 538662 (1990).

O. Mestek^a, T. Zíma^b, M. Suchánek^c, and J. Žilková^a (^a*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*First Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, First Medical Faculty, Charles University, Prague*): **Direct Determination of Chromium in Blood Serum by Electrothermal-Atomization Atomic Absorption Spectrometry**

The method of direct determination of Cr by ETAAS in blood serum and whole blood after dilution with 0.1% Triton X-100 and 1 % HNO₃ is described. The temperature programme of graphite furnace involved careful drying at 70 °C, two-step pyrolysis at 800 and 1100 °C, and atomization at 2400 °C. No chemical modification was included, background correction was carried out by deuterium arc corrector. The detection limit was 0.24 µg.l⁻¹ Cr. The method was used for analysis of blood serum of patients with chronic renal failure treated by hemodialysis.