

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

Chem. Listy 92, 495 - 498 (1998)

STANOVENIE SELÉNU V SÉRE METÓDOU ATÓMOVEJ ABSORPČNEJ SPEKTROMETRIE S ELEKTROTERMICKOU ATOMIZÁCIOU

MONIKA URSÍNYOVÁ a VLASTA HLADÍKOVÁ

Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14, 833 01 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: ursiny@enigma.upkm.sanet.sk

Došlo dňa 24. VII. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Experimentálna časť
 - 2.1. Použité prístroje a zariadenia
 - 2.2. Podmienky merania
 - 2.3. Chemikálie a roztoky
 - 2.4. Opis analyzovaného materiálu
 - 2.5. Spracovanie vzorky
3. Výsledky a diskusia

1. Úvod

Vedecký názor na funkciu a vplyv selénu na ľudský organizmus sa v priebehu posledných desaťročí výrazne menil a vyvíjal. Z pôvodného hodnotenia selénu ako silne toxického látky sa v súčasnosti zaraďuje k prvkom esenciálnym s relatívne veľmi malým rozptátím medzi priaznivými a toxickými účinkami.

Deficit selénu v organizme zvyšuje riziko ochorení, najmä kardiovaskulárnych a nádorových. Naproti tomu vyšší príjem selénu u človeka je príčinou vážnych selenotoxikóz a niektorých druhov karcinómu¹.

Preto treba k suplementácii poživatin a pri propagácii individuálneho užívania selénu postupovať rozvážne a terapiu prevádzať len za prísnej kontroly. Je etické odporúčať obyvateľstvu výlučne indikovaných a analyticky kontrolovanú aplikáciu selénu. Vhodným biologickým markerom

pre sledovanie statusu selénu v ľudskom organizme je krvné sérum¹. V rámci špeciálnych analýz je využívaná prevažne hydridová technika AAS, ktorá si vyžaduje náročný rozklad pomerne veľkého množstva biologického materiálu^{2,4}. Stanovenie selénu metódou ETA-AAS so Zeemanovou korekciou pozadia si zase vyžaduje drahú prístrojovú techniku⁵. Vzhľadom na závažnosť problematiky je potrebné zaviesť do praxe v rámci klinickej biochémie spoľahlivú a relatívne dostupnú metódu analytického stanovenia selénu v krvnom sére.

2. Experimentálna časť

2.1. Použité prístroje a zariadenia

Na stanovenie selénu v sére bola použitá metóda bezplameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie na prístroji AAS PU 9400 X fy. Unicam s elektrotermickým atomizátorom GF-90 a automatickým dávkovačom FS-90.

2.2. Podmienky merania

Pre stanovenie selénu v sére bola použitá katódová výbojka, prúd lampy 12,0 mA, vlnová dĺžka 196,0 nm, šírka štrbiny 0,5 nm, deutériová kompenzácia pozadia a elektrolytická trubička. Dávkovaný objem upravenej vzorky 20 μ l, integračný čas 3 s, vyhodnotenie výšky signálu. Pre vyhodnotenie sa použila metóda štandardného prídavku.

Pre určenie optimálnych parametrov nastavenia prístroja boli sledované priebehy kriviek rozkladu a atomizácie a pomery signálu prvku k signálu pozadia. Ďalej sa študoval vplyv vybraných modifikátorov (Pd, kyselina askorbová, hydroxylamónium chlorid) na priebeh kriviek termického rozkladu a atomizácie. Priebeh kriviek je uvedený na obr. 1 a 2.

Vzhľadom na priebeh rozkladnej, atomizačnej krivky a atomizačného signálu sa ako optimálne javí pre stanovenie Se v sére použitie zmesného modifikátora: Pd - kyselina askorbová.

Optimálny teplotný program stanovenia selénu v sére s použitím zmesného modifikátora: Pd - kyselina askorbová je uvedený v tabuľke I.

Pri stanovení medze detekcie sa vychádzalo z trojná-

sobku a pri stanovení medze stanoviteľnosti z desaťnásobku smerodajnej odchýlky slepého pokusu. Základné analytické charakteristiky sú uvedené v tabuľke II.

Tabuľka I

Teplotný program stanovenia selénu

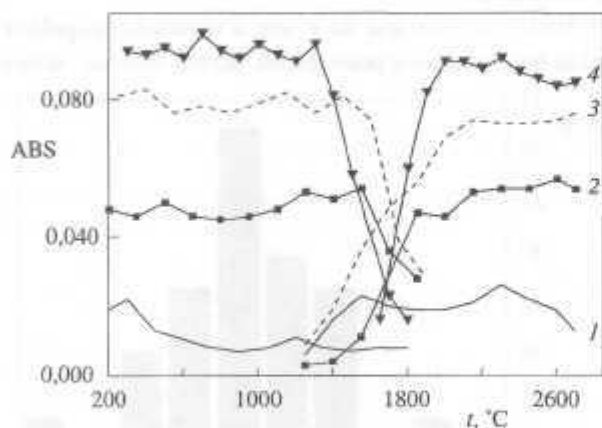
Fáza	Teplota [°C]	Čas [s]	Nárast [°C/s]	Prietok argónu [ml.s ⁻¹]
1	90	15,0	10	200
2	100	15,0	1	300
3	130	10,0	5	300
4	1300	15,0	80	300
5	2100 ^{a,b}	3,0	0	0
6	2600 ^a	2,0	0	300

^a Kontrola teploty, ^b zaznamenávanie signálu

Tabuľka II

Základné analytické charakteristiky stanovenia selénu

Parameter	Hodnoty
Medza detekcie	0,35 µg.l ⁻¹
Medza stanoviteľnosti	1,16 µg.l ⁻¹
Charakteristická koncentrácia (pre dávkovaný objem vzorky 20 µl)	0,65 µg.l ⁻¹
Charakteristická hmotnosť	12,9 pg



Obr. 1. Krivka termického rozkladu a atomizácie selénu v upravenej vzorke séra; 1 - sérum: Triton X-100 (1:7), 2 - sérum: Triton X-100: Pd: HoNH₃Cl (1:3:2:2), 3 - sérum: Triton X-100: Pd (1:5:2), 4 - sérum: Triton X-100: Pd: kyselina askorbová (1:3:2:2)

2.3. Chemikálie a roztoky

Základný roztok selénu (FSA Laboratory Supplies, Loughbrough, Veľká Británia) o koncentrácii 1 000 mg.l⁻¹. Pracovný roztok (1 000 µg.l⁻¹) bol pripravený riedením základného roztoku v Tritone X-100 (0,2 % V/V v redestilovanej vode)

Triton X-100 (0,2 % V/V v redestilovanej vode)

Redestilovaná voda

Kyselina dusičná 65 %-ná p.a.

Paládium pre ETA-AAS (0,1 % V/V v 1 % V/V HNO₃)

Kyselina askorbová p.a. (1 % m/V v redestilovanej vode)

Hydroxylamónium chlorid p.a. (2 % m/V v redestilovanej vode)

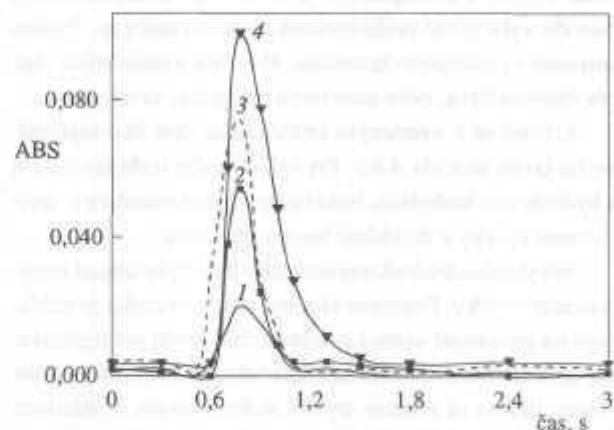
Referenčný materiál: SeronormTM Trace Elements Serum, NYCOMED PHARMA AS, Nórsko

2.4. Opis analyzovaného materiálu

Vzorky krvi boli odoberané v rokoch 1995-1996 od darcov vo veku 20-60 rokov žijúcich v Bratislave. Po odbere sa vzorky krvi centrifugovali štandardným biochemickým postupom. Vzorky séra sa prelievali do suchých skúmaviek vopred vymáčaných v 10 % HNO₃ a oplachovaných v redestilovanej vode, zmrazili pri -20 °C a takto skladovali do doby analýzy.

2.5. Spracovanie vzorky

Vzorky rozmrazených séra sa homogenizovali na rotačnej trepačke cca 30 sekúnd. Objem 100 µl séra sa riedil



Obr. 2. Priebeh atomizačného signálu selénu v upravenej vzorke séra; 1 - sérum: Triton X-100 (1:7), 2 - sérum: Triton X-100: Pd: HONH₃Cl (1:3:2:2), 3 - sérum: Triton X-100: Pd (1:5:2), 4 - sérum: Triton X-100: Pd: kyselina askorbová (1:3:2:2)

s 300 μl 0,2 %-ného Tritonu X-100, s 200 μl 0,1 % Pd a 200 μl 1 % kyseliny askorbovej, opäť homogenizoval na rotačnej trepačke a prelieval do nádobiek v dávkovači AAS. (pozn.: pri riedení je potrebné dodržať postup a pridávať chemikálie v uvedenom poradí).

Pre stanovenie obsahu Se v sére sa použila metóda štandardných prídavkov 10 μl a 20 μl roztoku 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Se k upravenej vzorke.

3. Výsledky a diskusia

Pre stanovenie nízkych hladín selénu vo vzorkách biologických materiálov sú v literatúre^{1,6} popisované viaceré metódy:

1. spektrofotometrické:
 - atómová absorpčná spektrometria - AAS (bezplameňová technika - ETA, generácia hydridov - HG), fluorescenčná spektrometria
2. elektrochemické:
 - pulzná polarografie,
 - katodická rozpúšťacia voltampérometria,
3. rádiochemické:
 - neutrónová aktivačná analýza,
 - röntgenfluorescenčná analýza,
4. separačné:
 - plynová chromatografia,
 - kvapalinová chromatografia.

Pre praktické stanovenie selénu v sére bolo potrebné vypracovať metodický postup, ktorý by svojimi podmienkami prípravy vzorky nespôsobil zbytočné riziko kontaminácie vzorky a dostupnosťou a citlivosťou inštrumentálnej metódy vyhovoval podmienkam stopovej analýzy. Ďalším nemenej významným kritériom, obzvlášť u rizikových skupín obyvateľstva, bolo množstvo odobratej vzorky krvi.

Vzhľadom k uvedeným kritériám sa nám ako najvhodnejšia javila metóda AAS. Pri voľbe medzi technikou ETA a hydridovou technikou bolo rozhodujúce množstvo, spracovanie vzorky a detekčný limit stanovenia.

Nevýhodou hydridovej techniky je nevyhnutnosť mineralizácie vzorky. Pomerne zložitý rozklad vzorky je vzhľadom na prchavosť selénu potrebné realizovať pri regulovanej teplote. Čas rozkladu na elektrickej platni je až 5 hodín. Mineralizácia sa značne urýchli mikrovlnným rozkladom. Ďalšou nevýhodou hydridovej techniky je reálne množstvo vzorky potrebnej na analýzu (cca 1,5 ml séra oproti 200 μl pri technike ETA pre paralelné stanovenie, pričom zostatok séra je možné použiť na stanovenia ďalších biologicky v-

znamných prvkov) a lepšia citlivosť stanovenia (0,46 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pri hydridovej technike a 0,35 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pri ETA-AAS).

Vzhľadom k uvedeným výhodám stanovenia selénu metódou ETA-AAS bola uvedená metóda rozpracovaná a použitá pre stanovenie obsahu selénu v sére u vybranej skupiny zdravej populácie z Bratislavy. Ako referenčný materiál sme použili lyofilizované sérum SeronormTM - Trace Elements Serum. Zistené obsahy SE v referenčnom materiáli v priebehu sledovania boli $96,5 \pm 5,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ oproti certifikovanej hodnote 96 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Distribúcia obsahu selénu v sére u sledovanej skupiny darcov z Bratislavy je uvedená na obr. 3.

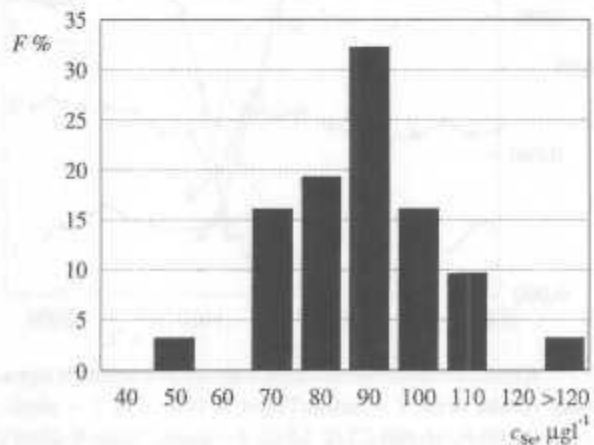
Koncentrácie selénu v sére u obyvateľov rozličných krajín sveta dokumentuje tabuľka III (cit.^{7,9}).

Na základe literárnych údajov sú považované obsahy 45 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Se v sére za prahové hodnoty zvýšeného rizika vývinu kardiovaskulárnych a karcinogénnych ochorení a pri obsahoch Se pod 30 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ sa prejavujú klinické syndromy¹⁶.

Priemerný obsah Se v sére u zdravých darcov z Bratislavy bol 83,4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a mediánový obsah 83,6 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pričom rozpätie zistených hodnôt bolo 46,2-122,8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. U mužov boli zistené vyššie mediánové koncentrácie Se (85,7 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) oproti hodnotám stanoveným vo vekovo zrovnateľnej ženskej populácii (80,1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Zistený minimálny obsah selénu v sére v sledovanej skupine bol 46,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

V porovnaní s obsahmi Se v sére uvedenými v literatúre sú zistené údaje zo SR zrovnateľné so stavom v krajinách strednej Európy. Stanovované koncentrácie Se sú však výrazne nižšie oproti hladinám zisteným v japonskej populácii a nižšie i v porovnaní so stavom v Anglicku, krajinách západnej (Belgicko, Holandsko) a juhozápadnej Európy (Portugalsko).

Nižšie koncentrácie Se v sére u slovenskej populácie môžu byť spôsobené prirodzenou nižšou úrovňou selénu



Obr. 3. Distribúcia koncentrácie c v sére, F frekvencia

Tabuľka III
Koncentrácie selénu v ľudskom sére

Krajina	Mesto	n	Se $\mu\text{g.l}^{-1}$
Anglicko	Ipswich	20	107 ± 13
	Londýn	22	109 ± 14
Belgicko		30	100 ± 9
Česko		287	77 ± 18
		65	46-63
Dánsko		58	78 ± 15
Francúzsko	Grenoble	27	79 ± 15
	Paríž	38	82 ± 11
Grécko		21	63 ± 14
Holandsko		36	93 ± 12
Japonsko		304	127 ± 23 (muži)
		223	111 ± 16 (ženy)
Nemecko	Bavaria	40	70 ± 10
	Gissen	19	68 ± 10
	Heidelber	23	76 ± 9
Portugalsko	Lissabon	27	102 ± 10
Španielsko	Barcelona	28	87 ± 14
Švédsko	Göteborg	28	77 ± 11
	Malmö	52	90 ± 14
	Umea	21	82 ± 8
	Uppsala	22	81 ± 15

v zložkách životného prostredia (hlavne pôda) v SR a jeho následným nižším transportom do vegetácie, genetickou dispozíciou našej populácie a nakoniec dietetickými návykmi a trendami, ktoré ozačujú konzumáciu prirodzených zdrojov selénu (hrúbky, vnútornosti, bravčové maso a vajcia) za nevhodnú.

Autori zaoberajúci sa touto problematikou však upozorňujú na skutočnosť, že existujú značné rozdiely medzi prívodom potrebným na udržanie rovnovážneho metabolického stavu medzi populáciami žijúcimi v rôznych geografických oblastiach a individuálnymi diferenciami. Stav populácií je natoľko odlišný, že napr. len najnižšia patina hodnôt u americkej populácie sa prekrýva s najvyššou patinou hodnôt obyvateľov Fínska¹⁰. Z tohoto hľadiska môže v určitej geografickej oblasti nižšia koncentrácia selénu v sére u časti obyvateľstva v porovnaní s ostatnou populáciou znamenať prediagnostický stav zvýšeného rizika ochorenia. Z týchto dôvodov je potrebné zmapovať stav obsahu selénu u našej populácie v jednotlivých regiónoch

dostupnou štandardnou metódou, ktorá by umožnila získané výsledky spoľahlivo porovnať.

Vzhľadom k faktu, že pracoviská vlastniace AAS sú skôr vybavené bezplameňovou technikou AAS ako hydridovou technikou a metóda rozpracovaná v tejto práci spĺňa požiadavky pre rutinnú biochemickú prax, považujeme ju za vhodnú pre zavedenie do výskumnej a klinickej praxe hlavne na úsekoch kardiovaskulárnej a karcinogénnej prevencie.

LITERATÚRA

1. *Selenium. Environmental Health Criteria 58*. WHO, Geneva 1987.
2. McLaughlin K., Dadgar D., Smyth M. R., McMaster D.: *Analyst* 775, 275 (1990).
3. Hansson L., Pettersson I., Olin A.: *Talanta* 34, 829 (1987).
4. Oster O., Prellwitz W.: *Clin. Chim. Acta* 124, 277 (1982).
5. Hogberg J., Alexander J., v knihe: *Handbook on the Toxicology of Metals* (Friberg L., Nordberg G. F., Vouk V. B., ed.), sv. II, str. 482. Elsevier, Amsterdam 1986.
6. Kopicová Z., Turek B., Jersáková V., Vrána A., Kсандrová I.: *Cesko-Slov. Hyg.* 37, 101 (1982).
7. Thorling E. B., Overvad K., Geboers J.: *Ann. Clin. Res.* 18, 3 (1986).
8. Kvičala J., Zamrazil V., Čerňovská J., Bednář J., Janda J.: *Biol. Trace Elem. Res.* 47, 365 (1995).
9. Deguchi Y., Ogata A.: *Tohoku J. Exp. Med.* 165, 247 (1991).
10. Kalousková J., Dědina J., Pavlík L., Beneš J.: *Cas. Lek. Ces.* 126, 277 (1987).

M. Ursínyová and V. Hladíková (Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, Slovak Republic): Determination of Selenium in Serum Using Atomic Absorption Spectrometry

The determination of Se in serum by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization is presented. The method has the detection limit of 12.9 pg Se, which was determined with 100 μl samples. The method was verified using the standard reference material - SeronormTM Trace Element Serum, NYCOMED PHARMA AS, Norway. The median level of Se in the serum of healthy volunteers from Bratislava (Slovakia) was 83.6 $\mu\text{g.l}^{-1}$. The median concentrations of Se in the serum of male donors were higher (85.7 $\mu\text{g.l}^{-1}$) than in female donors of the similar age (80.1 $\mu\text{g.l}^{-1}$).