

PRVKOVÁ ANALÝZA KLINICKÝCH MATERIÁLŮ - APLIKACE ELEKTROTERMICKÉ ATOMOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE

VĚRA SPĚVÁČKOVÁ a JANA KNOTKOVÁ

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Došlo dne 23.V. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Elektrotermická atomizace pro účely analýz biologických vzorků
3. Požadavky na odběr a přípravu vzorků
4. Analýza klinických vzorků
 - 4.1. Analýza krve
 - 4.2. Analýza moče
 - 4.3. Analýza dalších vzorků
5. Specifická stanovení

1. Úvod

Přes značný pokrok v oblasti moderních multielementárních analytických metod jako jsou např. metoda neutronové aktivační analýzy, elektrochemické metody, metoda emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP AES) nebo metoda ICP-MS, která spojuje výhody ICP a hmotnostní spektrometrie, zůstává metoda atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETAAS) stále jednou z nejužívanějších technik pro prvkovou analýzu klinických materiálů. Její velkou výhodou je malá potřeba vzorku, což je důležité zejména při analýzách raalobjemových vzorků, které jsou v případě klinických materiálů velmi časté. Dalšími výhodami jsou citlivost, specifická, relativně vyšší tolerance k obsahu rozpuštěných solí oproti výše uvedeným metodám a v neposlední řadě i relativní cenová dostupnost. Nevýhodou ETAAS je vyšší časová náročnost, menší rozsah lineární kalibrace, menší dynamický rozsah a donedávna i nemožnost simultánního stanovení více prvků vedle sebe.

2. Elektrotermická atomizace pro účely analýz biologických vzorků

Elektrotermické atomizátory se v atomové absorpční spektrometrii začaly používat rutinně v sedmdesátých letech. Jejich hlavní částí je trubice (kyveta), většinou grafitová, která je elektricky vyhřívána na požadovanou teplotu a do které se dává vzorek. Pro analyty stanovené v klinických vzorcích se nejčastěji používá pyrolyticky upravovaný grafit, vyznačující se vysokou chemickou odolností a nižší porozitou oproti kyvetám z běžného grafitu. Vzhledem k tomu, že se analyty v klinických vzorcích vyskytují v různých chemických formách (anorganicky nebo organicky vázané), je nutné v kyvetě zajistit takové izotermické podmínky, při kterých by nedocházelo k postupnému uvolňování analytu ze sloučeniny. Řešením tohoto problému se již v sedmdesátých letech zabýval L'vov¹, který navrhl použití podložky (platformy) do kyvety, na kterou byl vzorek dávkován. Použití platformy vede k rovnoměrnému odpařování vzorku, což ve většině případů zlepšuje podmínky atomizace a zároveň snižuje vliv matrice. Navíc, vzhledem k tomu, že použitý materiál platformy je pyrolytický uhlík, má platforma jako atomizační podložka delší životnost. Pokud jde o uspořádání vyhřívání trubice, většina přístrojů má trubice vyhřívání podélně. Nevýhodou tohoto způsobu je skutečnost, že podél trubice vzniká teplotní gradient, a na chladnějších koncích může docházet k nežádoucí kondenzaci analytu. K odstranění tohoto jevu se v posledních letech začaly vyrábět přístroje s příčně vyhříváními trubicemi (THGA) s integrovanou platformou, u kterých je rozložení teploty podél trubice rovnoměrné. Současný stav vývoje elektrotermických atomizátorů pro AAS shrnuje práce².

Jak bylo již uvedeno, jednou z nevýhod elektrotermické atomizace je její relativní časová náročnost při stanovení více analytů v jednom vzorku, neboť jednotlivé analyty se měří postupně. K zefektivnění práce při elektrotermické atomizaci byly již v sedmdesátých letech uvedeny na trh dvoukanálové spektrometry firem Jarrel Ash a Instrumentation Laboratory a v osmdesátých letech pak čtyřkanálový spektrometr firmy Hitachi. V posledních letech

se objevil na trhu šestikanálový spektrometr firmy Perkin Elmer SIMAA 6000, a tím se otevřely širší možnosti simultánního stanovení více prvků při jedné atomizaci³. Tento spektrometr je možné používat jak pro stanovení jednoho prvku, tak jako přístroj pro simultánní stanovení až šesti prvků při zachované citlivosti metody. Při tvorbě společného teplotního programu je důležité kvalifikovaně posoudit kombinace stanovovaných prvků vzhledem k jejich chování při termickém zpracování vzorku v atomizátoru. Společný teplotní program, sestávající z fází sušení, termického rozkladu a vlastní atomizace, je pak nutným kompromisem mezi optimálními podmínkami teplotních programů pro jednotlivé analyty. Další neméně důležitou podmínkou při simultánním stanovení je vyloučení možných vzájemných spektrálních interferencí na měřených vlnových délkách.

V porovnání s plamenovou technikou je ETAAS o dva až tři řády citlivější, a to ji předurčuje pro stanovení stopových a ultrastopových koncentrací prvků, které se vyskytují zejména v krvi a moči. Vzhledem k podstatně většímu vlivu biologické matrice na stanovení nízkých obsahů analytů bezplamenovou technikou (který je výrazný např. při analýze moči) je používání korekce pozadí nutností. Rušivé vlivy bývají nejčastěji způsobeny přítomností nedisociovaných molekul, radikálů a vysokých koncentrací solí, zejména chloridů, případně fosforečnanů. Nespecifickou absorpcí způsobenou rozptylem světla, která se při měření přičítá k signálu analytu, je ve velké většině případů možno korigovat všemi známými systémy korekce pozadí⁴. Běžně používané přístroje bývají nejčastěji vybaveny korektorem s deuteriovou výbojkou. Tento způsob korekce je účinný u analytů, jejichž rezonanční čáry leží v UV oblasti vlnových délek nižších než 350 nm, avšak při vysokých koncentracích solí již není postačující. Pro korekci pozadí při vyšších vlnových délkách jsou některé přístroje vybaveny např. halogenovou žárovkou s wolframovým vláknem. Další možnost korekce pozadí je využití rozšíření čáry zdroje záření (Smith-Hieftje), avšak tento princip většina současných výrobců atomových absorpčních spektrometrů nepoužívá. Vzhledem ke komplikovanosti a vysoké solnosti biologických matric se velmi často používá korekce pozadí na principu Zeemana jevu (štěpení energetických hladin atomu a tedy i spektrální čáry v magnetickém poli), která umožňuje korigovat pozadí až do hodnot absorbance dvě. V tomto případě je však nutné znát průběh kalibrační křivky, která při vyšších hodnotách koncentrací prochází maximem (rollover), takže jedna hodnota absorbance odpovídá dvěma hodnotám koncentrace. Problémy kompli-

kovaných matric bohužel neřeší v celém rozsahu ani Zeemanova korekce pozadí, a proto je vždy nutné používanou metodu předem ověřit (metodou standardního přidavku, porovnáváním výsledků pro různě ředěný vzorek, či prověřením platnosti celého postupu za pomoci referenčního materiálu stejného nebo podobného složení jako analyzovaný vzorek).

3. Požadavky na odběr a přípravu vzorků

Jak již bylo zmíněno v úvodu, metoda ETAAS se vyznačuje vysokou citlivostí a specifíčností. Stanovení stopových a ultrastopových koncentrací prvků v biologickém materiálu nespočívá jen v pouhém použití AAS, ale jedná se o proces, zahrnující také fáze odběru, skladování a přípravy vzorků, které předcházejí vlastnímu měření. Vzhledem k nízkým obsahům většiny stanovovaných analytů je právě v těchto fázích největší riziko kontaminace. Chyby, které vznikají nesprávnou manipulací se vzorky, bývají podstatně větší než chyby, vznikající při měření, a proto je nutné kromě obecných zásad při manipulaci se vzorky respektovat i další požadavky s přihlednutím k analytu, který je předmětem analýzy. Analýza každého typu klinických vzorků je provázena problémy specifickými pro danou matici a některé z nich budou dále uvedeny na konkrétních příkladech.

Jedním z obecných problémů stanovení stopových prvků v biologickém materiálu je způsob odběru vzorků, zajištění podmínek čistoty laboratoří, nádobí, chemikálií, úschovy vzorků a v neposlední řadě i jejich stabilizace. Např. výsledky stanovení hliníku v klinických maticích, kde se tento prvek vyskytuje v nízkých koncentracích, bývají v běžných laboratořích nadhodnoceny. Vzhledem k tomu, že hliník je běžným kontaminantem v prachu, je při jeho stanovení nutné pracovat v kontrolovaných podmínkách. Při stanovení Cr, Ni, Mn v krvi je nutné zajistit, aby odběry byly prováděny odpovídajícími kanylymi nebo vnitřně posilikovanými jehlami, kdyje nebezpečí kontaminace vzorku odběrovým materiálem sníženo na minimum. Při analýzách klinických materiálů je nutné vždy zařazovat slepé pokusy a pokud možno používat vhodné dostupné referenční materiály, účastnit se mezilaboratorních porovnávacích testů a používat regulační diagramy⁵⁻⁶. V každém případě by měl být analytik přítomen odběru nebo alespoň být v úzkém kontaktu s pracovníky, kteří odběry provádějí. Vzhledem k závažnosti tohoto problému a v návaznosti na mezinárodní programy sledování hladin stopových prvků

v lidské populaci, byly jednotlivé kroky, předcházející vlastnímu měření, diskutovány v několika studiích. Ze závěru těchto studií byla pro odběry vzorků krve a moče vypracována zpráva, publikovaná v roce 1995 (cit.⁷), jejímž účelem je harmonizace postupů pro odběry, přípravu a analýzu vzorků a zajištění kontroly kvality výsledků. Důvodem k vypracování této zprávy je vytvoření podmínek pro získávání porovnatelných dat nejen v oblastním nebo národním, ale i mezinárodním měřítku. Je zaměřena na nejčastěji stanovované stopové prvky v uvedených matrikách, a to Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Li, Mn, Hg, Ni, Se a Zn. Jednotlivé odstavce tohoto dokumentu se týkají historie subjektu, odběru a uchování vzorků, zpracování a měření vzorků včetně zabezpečení jakosti výsledků a zpracování dat a udávají typická rozmezí koncentrací jednotlivých prvků. Kromě doporučení pro přípravu vzorků je zde rovněž uveden přehled dostupných referenčních materiálů krve a moče, které je možno použít při vývoji a ověřování metod a při kontrole jejich správnosti.

V následujících odstavcích budou stručně shrnuta některá doporučení pro odběry krve a moče z dokumentu⁷, a dále doporučení pro odběry vlasů, převzaté z knihy autorů Chatta a Katze⁸.

Odběry vzorků pro stanovení stopových prvků v krvi. Vzorky krve se odebírají většinou do komerčních nádobek, které jsou určeny pro analýzu stopových prvků (např. Vacutainer Becton Dickinson nebo Monovette Sarstedt, s přísávkem antikoagulantu nebo bez něj) s příslušnými kanylymi nebo vnitřně posilikovanými jehlami. Materiál nádobek je volen podle analytů, které mají být stanoveny. Např. pro stanovení Al v séru nelze doporučit skleněné nádobky, pro stanovení Cd je nevhodný plastový materiál, obsahující jako změkčovadlo kadmium apod. Testování vyluhovatelnosti příslušných prvků z materiálu nádobky není jednoduché, neboť krev je složitá matrice, obsahující různé komplexující ligandy s rozdílnou afinitou vůči kovům. Z tohoto důvodu testování např. pouhým použitím vody nebo zředěné kyseliny nemusí odpovídat skutečnosti. Vhodný test pro ověřování nádobek lze provést tak, že do kontrolované nádobky je odebrán referenční vzorek o známé, velmi nízké koncentraci analytu, a po době, která odpovídá délce předpokládaného uchování vzorku, je provedeno měření. Jestliže rozdíl mezi certifikovanou a nalezenou hodnotou není statisticky významný, můžeme předpokládat, že proces vzorkování a uchování vzorků je pod kontrolou. Bohužel doposud neexistují pro všechny analyty certifikované referenční materiály, a proto je tento způsob testování limitován jen na

určité prvky. Pro kontrolu analytů, které nemají vhodný referenční materiál, je nutné použít jiného kontrolního vzorku, který byl před testem vícekrát analyzován a výsledky jednotlivých stanovení se od sebe statisticky nelišily.

Pokud odebíráme vzorky do jiných typů nádobek, je nutné tyto nádobky předem čistit. Čisticích postupů je popsána řada, nejpoužívanější je loužení nádobek v 10 % HNO₃ (v/v, p.a.) po dobu 24 hod a následné mytí demineralizovanou vodou.

Používání jehel z nerezové oceli k odběrům není obecně vhodné, a pro stanovení Cr a Ni vzhledem k možné kontaminaci z materiálu jehly je nutné použít alternativní řešení (polypropylénové kanyly, zevnitř posilikované jehly), jak vyplývá z tabulky I, převzaté z práce C. Minoiy⁹.

Tabulka I
Vliv odběrového materiálu na analýzu stopových prvků v plné krvi⁹ (koncentrace $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Prvek	Počet vzorků	Koncentrace	
		jehla z nerezové oceli	teflonová kanyla
Ag	18	0,29±0,09	0,29±0,06
Al	18	^a	^a
Bi	18	0,45±0,12	0,47±0,13
Cd	18	0,55±0,24	0,57±0,26
Co	16	0,38±0,19	0,39±0,16
Cr	18	5,65±2,13	0,19±0,08
Cu	18	1260±150	1275±166
Hg	15	5,20±1,9	4,90±1,75
Mn	17	8,8±2,1	8,4±2,9
Ni	17	7,3±0,6	2,3±0,7
Pb	18	161±32	159±37
Se	18	108±19	110±18
Zn	18	6345±585	6290±569

^a Pod mezí stanovitelnosti

Pokud je přidáváno do odběrových nádobek antikoagulační činidlo (heparin, EDTA, citrát), je nutné tato činidla testovat na hodnotu slepého pokusu, neboť vzhledem k jejich schopnosti vázatkovy je nebezpečí vnější kontaminace vzorků těmito činidly velké.

Je-li možné analyzovat v krátké době po odběru, ucho-

vávají se vzorky v ledničce při teplotě okolo 4 °C (krátkodobé skladování, tj. do 3-5 dnů). Při delším skladování je nutné vzorky umístit do mrazničky (teplota okolo -20 °C) v uzavřených plastových nádobkách.

Odběry vzorků pro stanovení stopových prvků v moči. Odběry vzorků moči se provádějí podle okolností buď jednorázově (nejlépe odběry ranní moči) nebo po dobu 24 hodin, kde je však nebezpečí kontaminace podstatně větší. K odběrům se používají nejčastěji polyethylenové nádoby, předem loužené v 10 % HNO₃ (v/v, p.a., 24 hod) a myté demineralizovanou vodou. Přípustná doba uchovávání vzorků závisí na stanovovaném analytu, při 4 °C by měla být co nejkratší. Studie stability¹⁰ prokázala, že při pokojové teplotě většina analytů (Co, Cu, Mn, Se, Zn, Ca, Cr, Cs, K, Na a Rb) nevykázala významný rozdíl po 3 dnech uchovávání, avšak u As byly nalezeny 15 % ztráty, způsobené sorpcí na stěnách nádoby. Naše zkušenosti ukazují na nebezpečí ztrát Pb a Hg při skladování vzorků při teplotě laboratoře. Pro dlouhodobé uchovávání je nutné opět vzorky skladovat v mrazničce při teplotách okolo -20 °C.

Odběry vzorků vlasů. Vzhledem k tomu, že u vlasů je velmi nesnadné (v některých případech přímo nemožné) rozlišit exogenní vlivy od endogenních, je velmi důležité při studiích standardizovat způsob odběru i přípravy vzorků pro analýzu. Např. vzdálenější části vlasů, které jsou déle ovlivňovány vnější kontaminací, mohou obsahovat podstatně vyšší obsahy analytů než vlasy těsně u hlavy. Protokol, doporučující proceduru pro odběr a mytí vzorků vlasů, je shrnut v monografii⁸ v sedmé kapitole. Z tohoto protokolu vyplývá, že vzorky vlasů by se měly odebírat z tylní oblasti do vzdálenosti asi 5 cm od hlavy v množství 0,5–1 g vzorků. Odběr vzorků i jejich uchovávání (při pokojové teplotě) je nutné provádět tak, aby se co nejvíce zamezilo vnější kontaminaci. Pokud jde o mytí vlasů před vlastní analýzou, v monografii⁸ jsou porovnávány různé mycí procedury a je uveden způsob mytí vlasů, který byl doporučen Mezinárodní agenturou pro atomovou energii a Světovou zdravotní organizací. Tento postup sestává z následného mytí vlasů acetonem (čistoty p.a.), 3x demineralizovanou vodou a opět acetonem (přibližně vždy 10-ti minutová dekantace vlasů daným činidlem v takovém objemu, aby vlasy byly vždy zcela pod hladinou).

Dalšími faktory, které je obecně při stanovení stopových a ultrastopových koncentrací prvků nutné vzít v úvahu, jsou kvalita vody i veškerých používaných chemikálií.

Kvalita používané vody musí být zaručena účinnou

demineralizací, případně následnou destilací, a musí se pravidelně kontrolovat s ohledem na koncentraci stanovovaných prvků. Pro účely klinických analýz vyhovuje svou kvalitou voda získávaná např. dvoustupňovým čištěním na přístroji Milli-Q firmy Millipore a podobnými čisticími zařízeními, která poskytují vodu s měrnou vodivostí menší než $0,5 \cdot 10^{-6} \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Veškeré chemické látky, používané nejen k rozkladu, ale i modifikátory, eventuálně látky používané k přípravě modelových kalibračních roztoků, mohou být rovněž zdrojem kontaminací, zvláště používají-li se ve velkém množství. Současný trh nabízí chemikálie vysoké čistoty, které jsou sice cenově nákladné (Merck Suprapur, Johnson Matthey Specpure, apod.), jejich použití by však mělo být pro analýzu stopových a ultrastopových prvků samozřejmostí.

Některá stanovení analytů v určitých maticích je možné provádět přímo bez mineralizačního kroku, ve většině případů se však bez mineralizace neobejdeme. Mineralizaci je možné provádět na mokré nebo na suché cestě, v posledních letech se rozšiřuje zejména mikrovlnný rozklad směsí kyselin a oxidačních činidel. Podmínky mineralizace se volí podle typu matrice a podle stanovovaného analytu. Pro některé matrice, kde nehrozí ztráty analytů, se s úspěchem může použít i suchý rozklad, kdy se organická matrice opatrně spálí při kontrolovaných teplotních podmínkách. Podrobný přehled mineralizačních postupů biologického materiálu pro účely stanovení arzenu, který se však dá zobecnit i na další analyty, je uveden v práci^{11,23}.

Specifickým problémem při analýze biologických materiálů je stanovení rtuti, která bývá vázána i v těkavých organických sloučeninách (methylrtuť, dimethylrtuť, aj.), u kterých je reálné nebezpečí ztrát při rozkladu vzorků. Z toho důvodu je výhodnější pro stanovení použít přímo buď techniky studených par nebo lépe jednoúčelového analyzátoru AMA 254 (výrobce Altec Praha), kdy se dává vzorek v původní formě přímo na lodičku.

Metody AAS s přímým dávkováním tuhých vzorků ve formě suspenzí („slurry sampling“)¹², vyžadují vysokou homogenitu vzorku a zatím nenalezly širšího uplatnění pro rutinní analýzy biologického materiálu.

4. Analýza klinických vzorků

Z klinických vzorků se nejčastěji metodou ETAAS analyzují vzorky krve, moči, vlasů (srsti) a různých tkání. Při řešení vlastní analýzy klinických vzorků je nutné vycházet z toho, že každá matrice se vyznačuje určitými

specifickými znaky. např. krev má po stránce variability matrice relativně konstantní složení na rozdíl od moče, jejíž složení je velice proměnlivé (rozdílné obsahy solí, hustota apod.). Naopak velké množství proteinů v krvi má vliv na její viskozitu a srážlivost, což působí negativně při dávkování vzorku. Navíc při nedokonalé oxidaci ve fázi termického rozkladu zůstává v kyvetě zbytkový uhlík, jehož odstraňování narušuje seriovost analýz. Rozdíly mezi jednotlivými typy vzorků je nutné vzít v úvahu při hledání optimálních podmínek elektrotermické atomizace, tj. při tvorbě teplotních programů pro sušení, pyrolýzu a atomizaci. Při volbě podmínek sušení se chování roztoku v kyvetě sleduje pomocí zrcátka, případně lze dobu sušení zjišťovat pomocí zrcátka nad dávkovacím otvorem (orosení). Optimální teploty pyrolýzy a atomizace se stanoví pomocí tzv. křivky rozkladu a křivky atomizace, kdy proměřujeme závislost absorbance analytu na teplotě pyrolýzy resp. atomizace¹³. Zjišťování křivek rozkladu a atomizace se zvláště u klinických matric nesmí opomíjet, neboť různé organické komponenty matrice vytvářejí s analyty těkavé sloučeniny, které mohou při termické úpravě vzorků uniknout z atomizátoru dříve, než nastane vlastní atomizace. Proto při stanovení takových analytů, u kterých je nebezpečí ztrát při termické úpravě vzorků (jedná se zejména o As, Cd, Hg, Pb, Se), je nutná jejich stabilizace přidávkem modifikátorů, nejčastěji $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, Ni nebo Pd. Při analýze klinických vzorků se použití modifikátorů většinou vyhnout nelze. Jejich funkce je různá a výběr se opět řídí typem matrice a analytem, který je sledován. Kromě změny (většinou zvýšení) termické stability analytu lze vhodným výběrem modifikátoru např. zvýšit těkavost nežádoucí matrice, popř. kombinovat oba tyto vlivy. Podrobně jsou funkce a použití různých modifikátorů diskutovány v práci¹⁴.

V poslední době byly publikovány práce, používající tzv. rychlé programy, které snižují časovou náročnost analýzy. V těchto programech je fáze termického rozkladu zkrácena na minimum, případně je zcela vypuštěna. V práci¹⁵ je diskutována možnost použití rychlých programů pro různé typy matric a analytů včetně vzorků krve. Ze závěru této práce však vyplynulo, že tyto programy nejsou vzhledem k převážně organickému charakteru biologických matric vhodné.

4.1. Analýza krve

Krev je jednou z matric, ve které je možné stanovení stopových prvků provádět jak přímo, tak po mineralizaci. Při přímém stanovení se používá nejčastěji pouhé ředění

vzorků 0,2 % roztokem Tritonu X-100. Při tomto postupu je však velkým problémem tvorba uhlíkových zbytků, které se usazují během teplotního programu v grafitové kyvetě nebo na platformě. Po každém čištění kyvety je nutné provést recalibraci, čímž se prodlužuje doba stanovení. Jednou z možností, jak odstranit výše uvedený problém je použití přidavku kyslíku nebo přídavného vzduchu při pyrolýze vzorků. Dosáhne se tím dokonalejšího rozkladu organické matrice, ovšem za cenu snížení životnosti kyvety. Stanovuje-li se více analytů v jednom vzorku je proto výhodnější použít mineralizaci, která však musí splňovat požadavky na kvantitativnost postupu (minimalizace možnosti ztrát a kontaminací). Ne vždy je nutné provádět úplnou mineralizaci vzorků (při termickém rozkladu v atomizátoru dochází k dalšímu spálení organické matrice) a postačuje pouze deproteinace vzorků, tj. zahřátí vzorku s přidávkem kyseliny (většinou HNO_3). Obsahy některých velmi často sledovaných analytů, zejména Cd a Cr, se pohybují většinou na úrovni desetin až jednotek $\mu\text{g.l}^{-1}$ a při jejich stanovení je nutné přísně dodržovat podmínky odběru i přípravy vzorků.

4.2. Analýza moče

Z hlediska stanovení stopových prvků moč představuje komplikovanou matici s vysokým obsahem solí. Navíc koncentrace těchto solí se od sebe v jednotlivých vzorcích podstatně liší, a proto se vliv matrice může projevovat nestejně. Pro většinu prvků běžně v moči stanovených je možné použít vícenásobné ředění (nejlépe demineralizovanou vodou, mírně okyselenou kyselinou dusičnou pro zamezení sorpce Pb a dalších prvků na stěnách nádobek), vlastní stanovení je však nutné prověřit např. porovnáním výsledků, získaných pro různě ředěný vzorek, metodou standardního přídatku a pod. Někdy bývá ve vzorcích přítomen sediment, který se z větší části rozpustí zahřátím vzorků na vodní lázni na teplotu přibližně 50-60 °C (zahřívání se nedoporučuje při stanovení rtuti, kdy mohou nastat ztráty těkáním organických sloučenin rtuti). Za přítomnosti sraženiny je před vlastním pipetováním nutné vzorek roztřepat po dobu asi 1 minuty. Vzhledem k rozdílnému režimu příjmu tekutin u jednotlivců jsou koncentrace prvků v moči velmi proměnlivé. Pro vzájemné porovnání výsledků je nutné stanovit v moči kreatinin, případně její hustotu a zjištěné koncentrace analytů na tyto parametry přepočítat¹⁶. Obsahy některých analytů (Cd, Cr aj.) bývají v močích velmi nízké, a proto zde platí totéž, co se týká odběru a přípravy vzorků krve.

4.3. Analýza dalších vzorků

Při analýze vlasů se vychází většinou z mineralizátů, přičemž nejčastěji užívaná mineralizační směs je kyselina dusičná¹⁷, případně její směsi s kyselinou chloristou^{18,19}, peroxidem vodíku nebo kyselinou sírovou¹⁸. Samostatnou kapitolou je stanovení rtuti, kde se s výhodou může použít přímého navažování vzorků a následné analýzy pomocí analyzátoru TMA (AMA) 254 (cit.²⁰). Vzhledem k tomu, že obsahy analytů ve vlasech jsou vyšší než v krvi a moči, nebývá zde tolik problémů s kontaminací při přípravě vzorků pro měření.

Rovněž při analýze tkání se vychází z mineralizátů, přičemž mineralizace se provádí většinou na mokré cestě, případně kombinací suché i mokré cesty^{11,21-23}. Závažným problémem u analýzy těchto typů vzorků je jejich značná heterogenita, neboť nutná homogenizace sebou vždy nese značné riziko kontaminace z otěru homogenizačního zařízení. Další důležitou součástí přípravy biologických tkání k analýze je v některých případech jejich sušení. Je prokázáno, že sušení již při 60-80 °C může vést ke značným ztrátám těkavých prvků a především jejich organokovových sloučenin. Byly studovány různé typy sušení biolo-

gického materiálu a za nejvhodnější metodu se stále považuje lyofilizace¹³.

Kosti se rozkládají nejčastěji směsí kyseliny dusičné a kyseliny chlorovodíkové²⁴⁻²⁵, pro rozkladů zubů postačí kyselina dusičná²⁶⁻²⁷. Tyto analýzy nebývají tak časté jako analýzy krve a moče, při stanovení některých analytů je nutné kontrolovat matricový efekt vápníku a fosforečnanů, které mohou výsledky silně ovlivnit.

5. Specifická stanovení

Stanovení některých analytů, zejména As, Se, Sn a Hg, vyžaduje vzhledem k těkavosti některých jejich forem specifické podmínky zpracování. Jejich obsahy zejména v tělních tekutinách se pohybují na hranici mezi stanovitelností a měření při vlnových délkách pod 200 nm vyžaduje účinnou korekci pozadí. Např. pro stanovení As nebo Se je výhodnější provést úplnou mineralizaci a stanovit tyto analyty hydridovou technikou, která je citlivější a méně zatížená rušivými vlivy matrice. Při stanovení těchto analytů je však velice důležité dosáhnout při mineralizaci úplné destrukce organické osnovy vzorku, neboť některé organické formy

Tabulka II

Příklady stanovení vybraných analytů v běžných klinických vzorcích²⁹

Prvek	Matrice	Příprava	Modifikátor	Metodika
As	krev krev, moč	ředění Triton X-100 mineralizace	Ni	ETA-Zeeman generování hydridu
Be	moč	ředění 1+3	Mg(NO) ₃	ETA-Zeeman
Cd	moč	ředění 1+4	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA-Zeeman
	krev	ředění Triton X-100	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA-Zeeman
Cr	krev	mineralizace	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA
	moč, krev	ředění 1+3 Triton X-100	Mg(NO) ₃	ETA-Zeeman
Cu	moč, krev	ředění		ETA
Pb	krev	ředění 1+9 Triton X-100	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA-Zeeman
	krev	mineralizace	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA
Mn	moč	ředění 1+3	NH ₄ H ₂ PO ₄	ETA-Zeeman
	serum	1+2 Triton X-100	Pd	ETA-Zeeman
Ni	tkáně, vlasy	mineralizace	Pd	ETA-Zeeman
	moč	extrakce		ETA
Se	krev	ředění Triton X-100		ETA
	krev, serum	Triton X-100	Ni	ETA-Zeeman
	moč	ředění 1+4	Pd	ETA-Zeeman

arzenu a selenu nepodléhají redukcí tetrahydridoboritanem sodným na příslušné hydridy, takže při neúplném rozkladu jsou výsledky stanovení zatíženy negativní chybou. Ze stejných důvodů je nutné převedení těchto analytů na nižší formy (As^{3+} , Se^{4+}) (cit.²⁸). Naopak pro stanovení rtuti je při mineralizaci reálné nebezpečí, že těkavé sloučeniny rtuti nebudou zachyceny, a proto je výhodnější použití buď techniky studených par nebo, jak bylo uvedeno dříve, jednocíselového analyzátoru AMA 254.

Pokud jde o další postupy při analýzách klinických vzorků, stručně souhrny pro stanovení různých analytů jsou uvedeny v monografii⁵ a publikaci²⁹. V tabulce II jsou uvedeny příklady stanovení vybraných analytů v běžných klinických vzorcích podle cit.²⁹.

LITERATURA

- L'vov B. V.: *Spectrochim. Acta* 33B, 153 (1978).
- Frech W.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 355, 475 (1996).
- Harnly J. M.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 355, 501 (1996).
- Kolihová D.: Soubor přednášek pro Kurs AAS (pro pokročilé). Spektroskopická společnost J. M. M., Praha 1996.
- Seiler H. G., Sigel A., Sigel H.: *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. Marcel Dekker, New York 1994.
- Thompson M., Wood R.: *Pure Appl. Chem.* 67, 649 (1995).
- Cornelis R., Heinzow B., Herber R. F. M., Molin Christensen J., Paulse O. M., Sabbioni E., Templeton D. M., Thomassen Y., Vahter M., Vesterberg O.: *Pure Appl. Chem.* 67, 1575(1995).
- Chatt A., Katz S. A.: *Hair Analysis*. VCH Publishers, New York 1988.
- Minoia C, Pietra R., Sabbioni E., Ronchi A., Gatti A., Cavalleri A., Manzo L.: *Sci. Total Environ.* 120, 63 (1992).
- Cornelis R., Speecke A., Hoste J.: *Anal. Chim. Acta* 78, 317 (1975).
- Száková J., Mader P.: *Chem. Listy* 88, 164(1994).
- Hoenig M.: Soubor přednášek pro Kurs AAS (pro pokročilé). Spektroskopická společnost J. M. M., Praha 1996.
- Pavelka J.: *Využití AAS v potravinářské a zemědělské praxi*. VÚPP - STI PP, Praha 1990.
- Tsalev D. L., Slaveykova V. I., Mandjukov P. B.: *Spektrochim. Acta Rev.* 13, 225 (1990).
- Hoenig M., Cilissen A.: *Spectrochimica Acta* 48B, 1003(1993).
- Elinder C. G., Friberg L., Kjellström T., Nordberg G., Oberdoerster G.: *Biological Monitoring of Metals*, WHO/EHG/94.2, (1994).
- Bosque M. A., Domingo J. L., Llobet J. M., Corbella: *Biol. Trace Elem. Res.* 28, 147 (1991).
- Revich B. A.: *Arch. Environ. Health* 49, 59 (1994).
- Sukumar A., Subramanian R.: *Sci. Total Environ.* 114, 161 (1992).
- Kratzer K., Beneš P., Spěváčková V., Kolihová D., Žilková J.: *JAAS* 9, 303 (1994).
- Charvát B., Mališ J., Bébarová H., Podstatová H., Kubačková J., Mudra R., Bystroňová D., Vojkovský D.: *Cesko-Slov. Hyg.* 38, 289 (1993).
- Schuhmacher M., Bosque M. A., Domingo J. L., Corbella J.: *Trace Elements Med.* 10, 115 (1993).
- Mader P., Čurdová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
- Kotulán J., Totušek J., Šefflová A., Polách J.: *Centr. Eur. J. Publ. Hlth* 2, 42(1994).
- Tauferová J.: *Cesko-Slov. Hyg.* 36, 163 (1991).
- Cikrt M., Lepší P., Handzel J., Kratochvíl J., Hanáková H.: *Cesko-Slov. Hyg.* 28, 525 (1983).
- Bercovitz K., Laufer D.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 724(1993).
- Dědina J., Tsalev D.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley, Chichester 1995.
- Slavin W.: *Sci. Total Environ.* 71, 17 (1988).

V. Spěváčková and J. Knotková (State Institute of Health, Prague): Elemental Analysis of Clinical Materials - Application of Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry

Atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization still remains one of the important techniques for elemental analysis of clinical materials. The correct sampling procedure, sample handling, stabilization and storage are integral components of the analysis. The paper summarizes recent knowledge concerning, above all, harmonization of the procedures of sampling, sample preparation, and analysis of blood and urine and the inspection of result quality. The conditions of analysis of the most frequently determined elements in the above matrixes and the rules for sampling of hairs and their preparation for analysis are discussed.