

## Metodika speciální analýzy stopových prvků v lidském séru

Jana Komínková  
Ústav analytické chemie



VŠCHT PRAHA

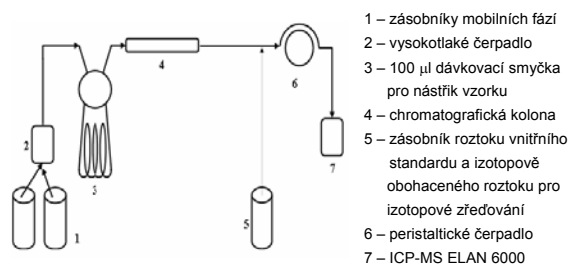
## Sledované prvky v organismu

- **Esenciální prvky**
- **Měď**
  - Transportní proteiny
  - Enzymy
  - Nedostatek vede k anémii, poklesu obsahu ceruloplasminu, hypercholesterolemii
- **Selen**
  - Syntéza thyroïdních hormonů
  - Účast při produkci prostaglandinů
  - Podpora růstu a plodnosti
  - Esenciální pouze ve stopovém množství, nadměrný příjem vede k poškození jater, kostí, srdečního svalu
  - Nedostatek může vést ke svalové degradaci
- **Zinek**
  - Enzymy
- **Železo**
  - Transportní proteiny
  - Cytochromy dýchacího řetězce
  - Pigmenty
  - Enzymy
- **Jód**
  - Thyroïdní hormony
  - Nedostatek jódu a selenu může vést ke vzniku kretenismu

## Cíle práce

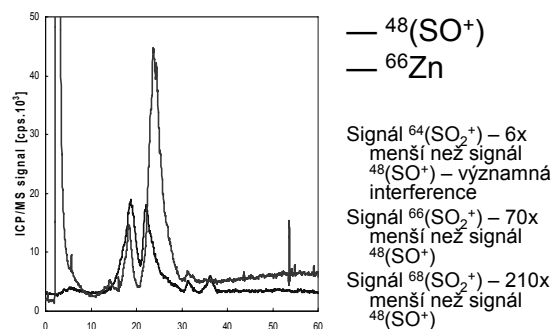
- Optimalizace metody IEC
- Srovnání metod SEC a IEC
- Kvantifikace IEC – vnitřní normalizace
  - Správnost – porovnání s metodou ID (Cu, Zn)
  - Odhad nejistot
- Identifikace vybraných specií

## Uspořádání aparatury pro IEC a SEC

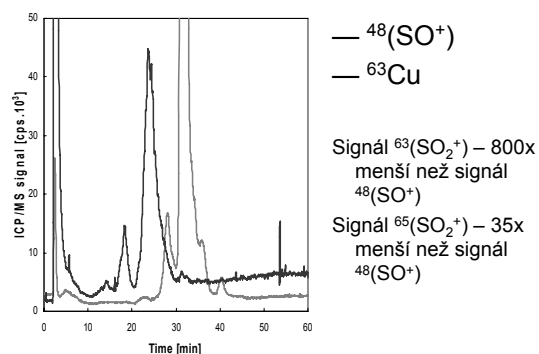


- **Kolona:** Mono Q HR 5/5
- **Mobilní fáze:**
  - A – TRIS, 0,05 mol/l, pH=7,4
  - B – TRIS-HNO<sub>3</sub> 0,05 mol/l, pH=7,4 + HCOONH<sub>4</sub>
    - Vše předčištěno na koloně Superformance 150 x 10 mm, náplň Chelex 100
- **Průtok mobilní fáze:** 0,5 ml/min
  - 0 min 100 % A
  - 5 min 100 % A
  - 45 min 50 % A + 50 % B
  - 60 min 50 % A + 50 % B
  - 61 min 100 % B
  - 70 min 100 % B
- **Objem vzorku:** 100  $\mu$ l, neředěný
- **ICP-MS:** <sup>57</sup>Fe, <sup>65</sup>Cu, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>68</sup>Zn, <sup>82</sup>Se, <sup>127</sup>I, <sup>137</sup>La, <sup>103</sup>Rh, <sup>130</sup>Te

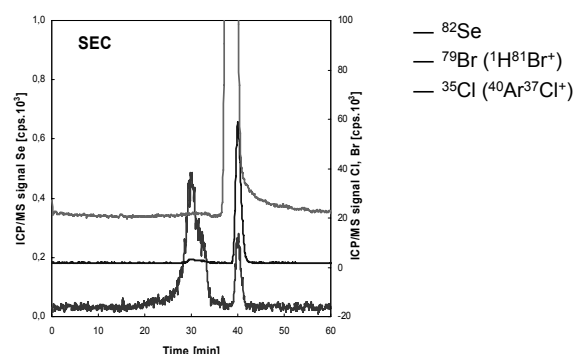
## Výběr izotopů



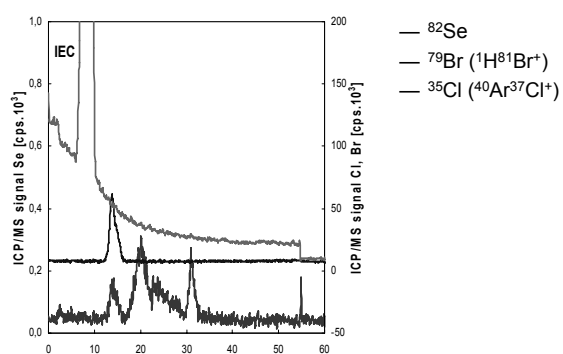
## Výběr izotopů



## Výběr izotopů



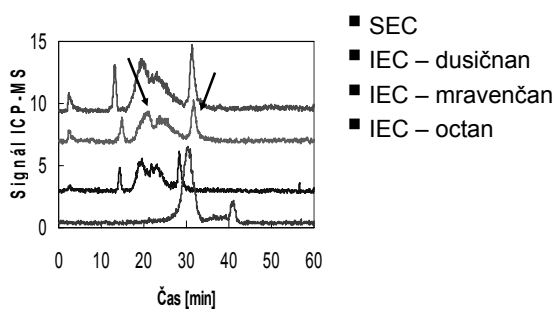
## Výběr izotopů



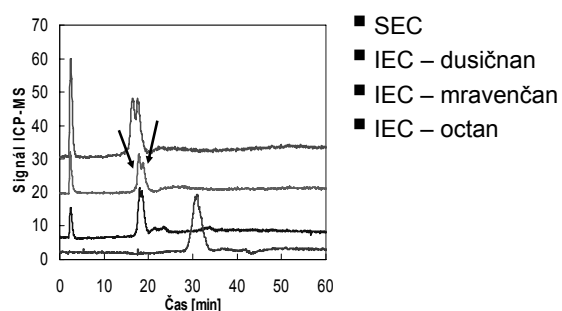
## Optimalizace

- Volba vhodné mobilní fáze:
  - Dobré chromatografické dělení
    - Určení koncentrace protiontu nezbytné pro eluci veškerého množství sledovaných prvků
    - Vzájemná separace různých specií jednoho prvku
    - Vzájemná separace různých specií různých prvků
  - Přijatelnost pro ICP-MS
    - Znečištění vzorkovacího systému ICP-MS
    - Ovlivnění citlivosti ICP-MS stanovení

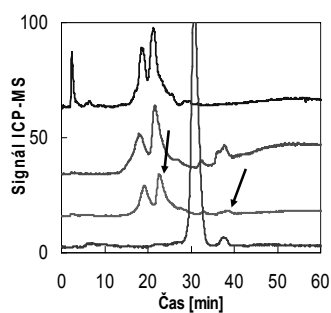
## Selen



## Železo

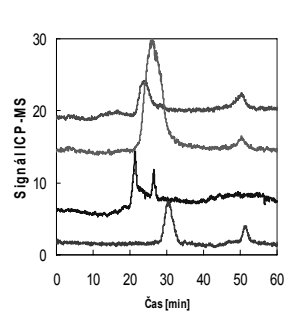


## Zinek



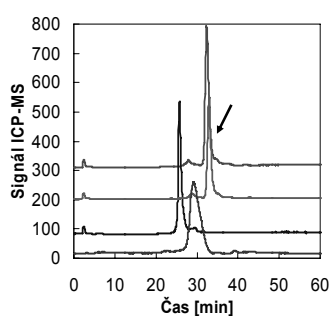
- SEC
- IEC – dusičnan
- IEC – mravenčan
- IEC – octan

## Jód



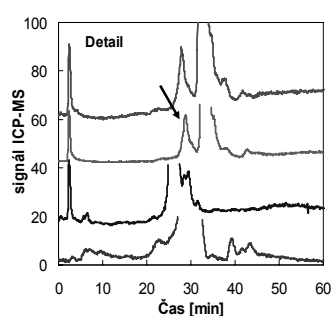
- SEC
- IEC – dusičnan
- IEC – mravenčan
- IEC – octan

## Měď



- SEC
- IEC – dusičnan
- IEC – mravenčan
- IEC – octan

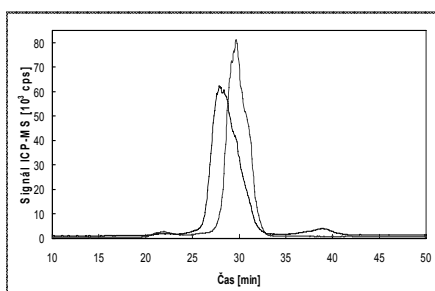
## Měď



- SEC
- IEC – dusičnan
- IEC – mravenčan
- IEC – octan

## Příklady elučních profilů

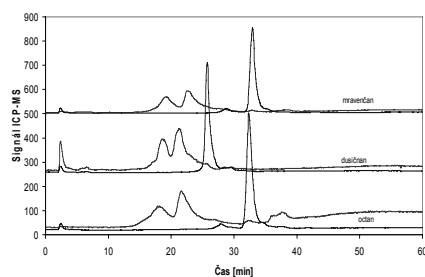
- Separace na koloně Superdex 200 HR 10/30



- Zn
- Cu

## Příklady elučních profilů

- Separace na koloně Mono Q 5/5



- Zn
- Cu

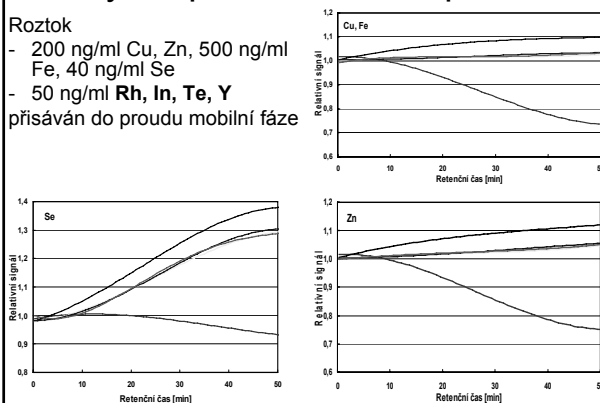
Typ chromatografie	Separace jednotlivých specií	Meziprvková separace	Znečištění vzorkovacího systému ICP-MS	Ovlivnění citlivosti měření ICP-MS
SEC	Nedostatečný	Nedostatečný	Dobrý	Dobrý
IEC – dusičnan	Dobrý	Dostatečný	Dobrý	Dostatečný
IEC – octan	Dobrý	Dobrý	Nedostatečný	Nedostatečný
IEC – mravenčan	Dobrý	Dobrý	Dostatečný	Dostatečný

## Výběr porovnávacího prvku

Roztok

- 200 ng/ml Cu, Zn, 500 ng/ml Fe, 40 ng/ml Se
- 50 ng/ml Rh, In, Te, Y

přisávání do proudu mobilní fáze



## Vzorky

- 7 zdravých dobrovolníků (4 ženy, věk 23 – 61 let)
- Odběr krve: nalačno venepunkcí kubitální žíly
- Po koagulaci krev centrifugována (3000 ot/min, 10 min, 4°C), sérum přechováváno v PE zkumavkách při 4°C
- Analýzy provedeny během několika hodin po odběru

## Stanovení celkového obsahu prvků

ICP-MS: Metoda externí kalibrace

- Zředění vzorku zředěnou kyselinou dusičnou a roztokem Tritonu X-100

	Měď	Železo	Selen	Zinek
Celk. konc. [μg/l]	1130	1680	95	1050
Rozsah	740 - 2200	1100 - 2800	65 - 130	700 - 1600
Rel. stand. nejistota $u_r$	0,020	0,020	0,030	0,020

## Kvantifikace prvků – přesnost a nejistota

- Studie zaměřena na aplikaci metody vnitřní normalizace píků (VN)

$$\rho_i = \frac{A_i \cdot f_i}{A_{tot}} \cdot \rho_{tot} \quad f_i \dots \text{empirické korekce pro Zn (1,00 - 0,95) a Se (1,00 - 1,05)}$$

$$s_r(\rho) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^7 ((\rho_{i1} - \rho_{i2}) / \bar{\rho}_i)^2}{2 \cdot 7}} \quad 7 \text{ vzorků séra analyzováno ve dvou opakováních}$$

Parametr	Měď	Železo	Selen	Zinek
<b>Frakce I</b>				
Průměr	1060	555	46	565
Rozsah	620 - 2030	230 - 1000	25 - 60	410 - 820
Rel. opakovatelnost $s_r$	0,031	0,042	0,044	0,035
<b>Frakce II</b>				
Průměr	54	350	13	23
Rozsah	40 - 80	170 - 480	10 - 16	15 - 39
Rel. opakovatelnost $s_r$	0,155	0,062	0,055	0,060

## Kvantifikace prvků – přesnost a nejistota

- Formální rovnice měření:

$$\rho = \rho_{\text{nal}} \cdot f_{\text{nonspekt}} \cdot f_{\text{tot}}$$

Označení	Zdroj	Relativní nejistota
$\rho_{\text{nal}}$	Opakovatelnost	0,03 – 0,07 (0,16)
$f_{\text{nonspekt}}$	Nespektrální interference	0,01
$f_{\text{tot}}$	Celkový obsah prvku v séru	0,02

- Kombinovaná nejistota:  $u(\rho) = \rho \cdot \sqrt{s_r^2(\rho_{\text{nal}})/n + u(f_{\text{nonspekt}})^2 + u(f_{\text{total}})^2}$

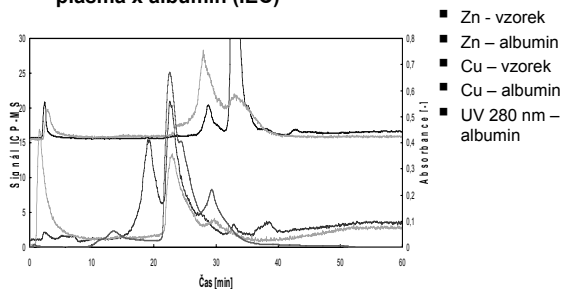
## Kvantifikace prvků – správnost

- Správnost byla ověřena srovnáním s výsledky izotopového zředování
- Vzájemné porovnání obou metod provedeno pomocí Wilcoxonova párového T testu

Vzorek	Cu frakce I [µg/l]		Cu frakce II [µg/l]		Zn frakce I [µg/l]		Zn frakce II [µg/l]	
	VN	ID	VN	ID	VN	ID	VN	ID
1	622±37	634±32	40±9	42±5	525±35	497±25	17±2	16±2
2	1000±60	950±48	44±10	47±6	818±55	790±40	39±4	34±3
3	825±50	873±44	64±14	71±9	408±27	425±21	18±2	14±2
4	2030±120	1960±98	81±18	80±10	461±31	458±23	18±2	19±2
5	1130±68	1130±57	59±13	59±7	532±36	481±24	23±2	21±2
6	955±57	984±49	48±11	50±6	560±38	544±27	15±2	14±2
7	880±53	932±47	40±9	42±5	653±44	618±31	29±3	25±3

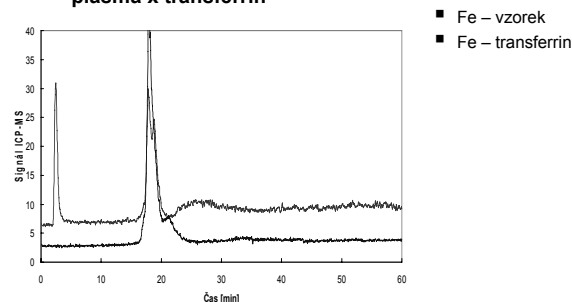
## Identifikace

- Porovnání retenčních časů vybraných specií:  
**plasma x albumin (IEC)**



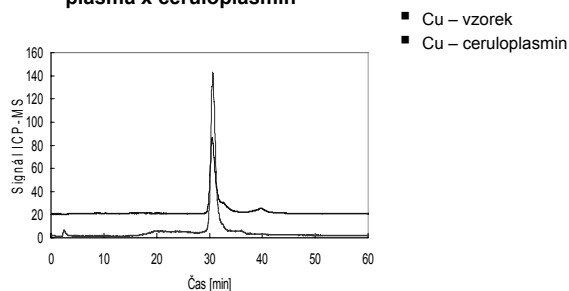
## Identifikace

- Porovnání retenčních časů vybraných specií:  
**plasma x transferrin**



## Identifikace

- Porovnání retenčních časů vybraných specií:  
**plasma x ceruloplasmin**



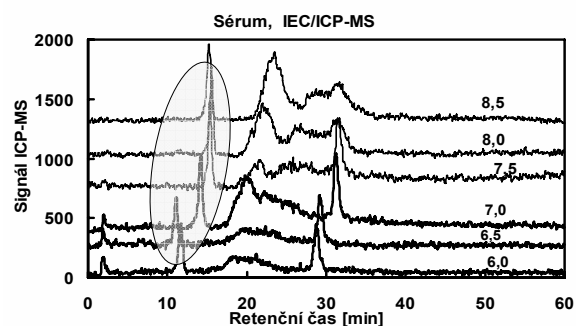
## Majoritní sloučeniny Se v séru

	$M_r$	IEB
Albumin	67 kDa	4,8 4,9 5,2
Glutathionperoxidáza	23-25 kDa	4,9 5,1
Selenoprotein P	57 kDa	5,2-5,3

## Chromatografické podmínky

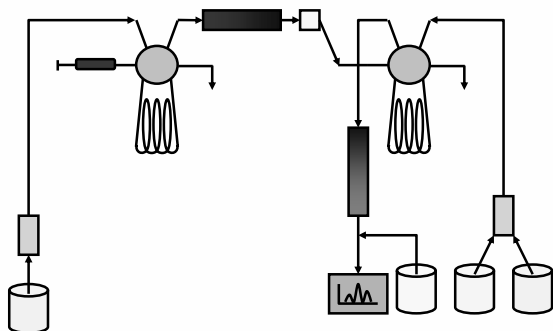
- Kolona: silně bazický anex Mono Q
- Gradientová eluce: 0,05 mol/l TRIS – HNO<sub>3</sub> + 1 mol/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
  - 0 – 5 min 100% TRIS
  - 5 – 40 min 100 – 50% TRIS + 0 – 50% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
  - 40 – 60 min 50% TRIS + 50% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- Nástržková smyčka: 200 µl
- pH ?

## Sérum, speciace Se



## Uspořádání aparatury

Identifikace specií: spojení afinitní a iontové výměnné chromatografie



## Identifikace

