NOTA APLIKACYJNA

Absorpcja atomowa

Autor:

Cynthia Bosnak

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT 06484 USA

Zastosowanie pieca THGA oraz korekcji Zeeman'a do oznaczania ołowiu w próbkach krwi pełnej

Wprowadzenie

Potrzeba posiadania sprawdzonego aparatu, który pozwala na dokładny pomiar poziomów ołowiu we krwi jest wymagana przez przepisy dotyczące bezpieczeństwa pracy oraz zdrowia publicznego. CDC (Centrum Kontroli Chorób) aktualnie wymaga podjęcia działania, jeżeli stężenie ołowiu we krwi wynosi ponad 10 µg/dL.[1] Z drugiej strony nie jest znany bezpieczny poziom dla ołowiu we krwi, a zatem jest bardzo ważne posiadanie zwalidowanego aparatu, który dostarcza dokładnych i precyzyjnych pomiarów.

Walidowane aplikacje oznaczania poziomów ołowiu w pełnej krwi są zwykle wykonywane za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z kuwetą grafitową (GFAAS). Technika ta pozwala na osiąganie granic wykrywalności znacznie poniżej wymaganych przepisami stężeń ołowiu we krwi i wymaga prostszego szkolenia operatora niż bardziej zaawansowane techniki analizy elementarnej.[2] W tej publikacji zademonstrowane jest zastosowanie spektrometru AAS PinAAcle™ 900T firmy PerkinElmer (Rysunek 1) z użyciem techniki STPF (stabilizowany temperaturowo piec grafitowy z platformą) oraz poprzecznie grzanej kuwety grafitowej (THGA) do oznaczania stężenia ołowiu w próbkach krwi. Wodne roztwory wzorcowe były stosowane zamiast standardów z dopasowaną matrycą krwi lub metoda dodatków wzorca. To upraszcza procedurę oraz minimalizuje czas wykonania analizy.

PerkinElmer®
For the Better

Część doświadczalna

Przygotowanie odczynników

Wszystkie odczynniki, standardy i próbki były przygotowane w wodzie dejonizowanej ASTM® Type I (18 MΩ • cm). Stężony kwas azotowy (69-70%), HNO_3, był o śladowym zanieczyszczeniu metalami lub lepszy.[3]

- **Wyjściowy 10% roztwór Triton® X-100:** Odważyć 10 gramów Triton® X-100 (Nr kat. N9300260) bezpośrednio do butelki LDPE o pojemności 125 mL LDPE bottle. Dodać wody dejonizowanej do 100 gramów. Dobrze wymieszać.
- **Roztwór płuczący podajnika:** Napełnić prawie całkowicie e 2 L butlę podajnika wodą dejonizowaną. Dodać 4 mL stężonego kwasu azotowego i 100 µL 10% roztworu Triton® X-100 . Dobrze wymieszać.
- **Rozieńczalnik/modyfikator matrycy:** Do butelki LDPE o pojemności 60 mL dodać 1 mL 10% roztworu modyfikatora kwaśnego fosforanui amonu $NH_4H_2PO_4$, (Nr kat. N9303445), 2.5 mL 10% roztworu Triton® X-100 oraz 0.1 mL stężonego kwasu azotowego. Rozcieńczyć do 50 mL wodą dejonizowaną.
- **1% roztwór HNO_3 :** Dodać około 500 mL wody dejonizowanej do plastikowej kolby miarowej o pojemności 1 L . Dodać 10 mL stężonego kwasu azotowego i uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną.
- **Pośredni roztwór wzorca (10 mg/L):** Dodać 1 mL roztworu standardu ołowiu 1000 mg/L (PerkinElmer Pure, Nr kat. N9300175) do butelki LDPE o pojemności 125 mL LDPE i dopełnić do 100 g 1% HNO_3. Świeży roztwór co miesiąc.

Przygotowanie standardów i próbek

Rozcieńczyć pośredni standard 10 mg/L tak, aby otrzymać standardy 100, 200, 400 oraz 600 µg/L przez dodanie odpowiednio 1, 2, 4 i 6 mL standardu10 mg/L i dopełnienie w plastikowych kolbkach do 100 mL 1% HNO_3.

Aby przygotować standardy kalibracyjne: do czystych naczynek podajnika o pojemności 1.2 mL (Nr kat.. B0510397) dodać 100 µL każdego standardu do 900 µL oroztworu rozcieńczalnika/modyfikatora. Wymieszać zawartość naczynka przez 5-10 krotne zassanie i dozowanie. Powtórzyć tę procedurę stosując 1% HNO_3 dla próby slepej.

Standardy NIST® Trace Elements in Caprine Blood (SRM 955c) oraz LyphoChek Whole Blood Metals Controls Levels 1, 2 i 3 (BioRad, Hercules, CA) były stosowane jako próbki. Próbki były rozcieńczane bezpośrednio w naczynkach podajnika 1.2 mL przez pipetowanie 100 µL każdej próbki krwi do 900 µL roztworu rozcieńczalnika/ modyfikatora mieszając jak powyżej.

Aparatura

Spektrometr PinAAcle 900T płomieniowy oraz z piecem grfaitowym z korekcja tła Zeeman'a był stosowany we wszystkich pomiarów. Lampa HCL Pb PerkinElmer Lumina™ (Nr kat.. N3050157) była stosowana jako źródło światła a argon był stosowany jako gaz nośny. Ustawienia spektrometru PinAAcle 900T są pokazane w Tablicy 1 a program temperaturowy stosowany dla wszystkich próbek jest przedstawiony Tablicy 2.

Rysunek1. Spektrometr absorpcji atomowej PinAAcle 900T z podajnikiem pieca AS 900 furnace autosampler.

***Tablica1.* Ustawienia spektrometru PinAAcle 900T.**

Parametr	Wartość
Długość fali:	283.3 nm
Szczelina:	0.7 nm
Prąd lampy:	10 mA
Czas integracji:	4 sek
Typ krzywej kalibracji:	Linear through zero
Powtórzenia:	2
Jednostki standardów:	µg/dL
Jednostki próbek:	µg/dL
Objętość próbki:	12 µL
BOC:	2 s

***Tablica2.* Program pieca dla pomiarów Pb w próbkach krwi w spektrometrze PinAAcle 900T z kuwetami THGA.**

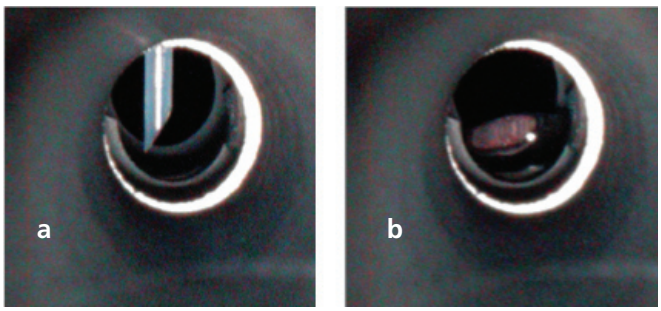
Krok	Temp. (˚C)	Ramp (sek)	Hold (sek)	Przepływ wewn.	Krok pomiaru	Typ gazu
1	120	5	10	250		Normal
2	140	5	10	250		Normal
3	200	10	10	250		Normal
4	700	10	20	250		Normal
5	1500	0	4	0	X	Normal
6	2450	1	3	250		Normal

**Temperatura dozowania: 110 ˚C*

W analizach stosowano standardowe kuwety THGA powlekane pyrolitycznie (Nr kat.. B0504033) ze zintegrowaną platformą. Unikalna opatentowana konstrukcja kuwet THGA zapewnia stałe grzanie i wysoką wydajność atomizacji dla wszystkich pierwaistków właczając pierwiastki trudnotopliwe. Kuwet oraz platforma wykonywane z pojedynczego bloku grafitu wyłącznie dla firmy PerkinElmer.

Poprzecznie grzana kuweta zapewnia jednolity rozkład temperatury wzdłuż całej długości kuwety znacząco redukując kondensację składników matrycy oraz efekty pamięci. Korekcja tła wykorzystująca równoległy do sił pola magnetycznego effekt Zeeman'a zapewnia dokładną korekcję bez straty światła związanego z korekcją tła efektem Zeeman'a prostopadłym.

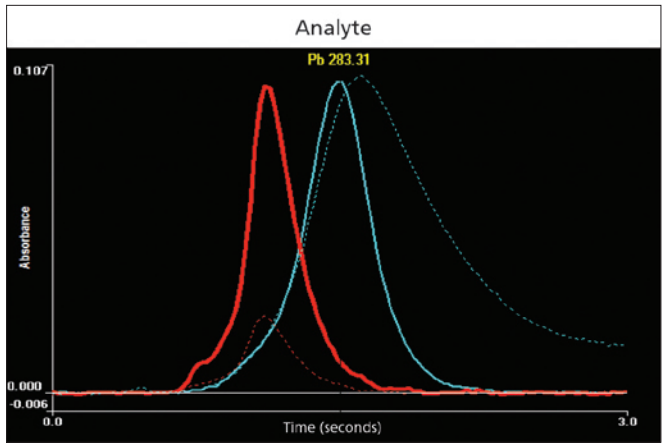
Kamera pieca TubeView™ w spektrometrze PinAAcle 900T była stosowana do ustawienia głębokości zanurzenia końcówki pipety (Rysunek 2a) oraz do kontroli zanieczyszczenia platformy przez matrycę próbki o ile miała miejscer. Kamera była także stosowana podczas opracowania metody do weryfikacji kroków suszenia oraz zapewnienia, że nie ma wrzenia i rozpryskiwania próbki (Rysunek 2b).



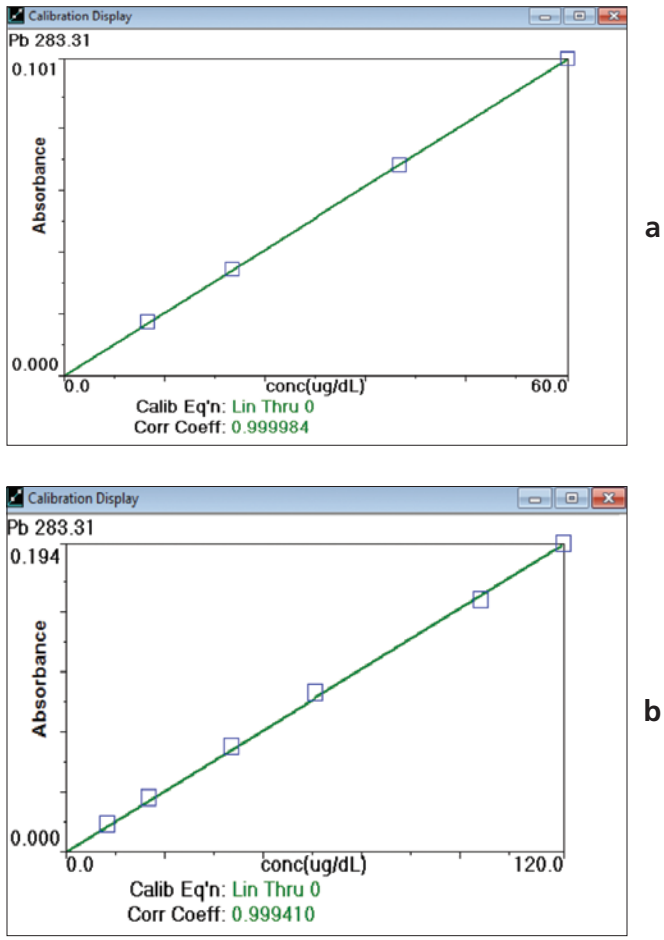
Rysunek 2. a) Ustawienie podajnika AS 900 za pomocą kamery pieca TubeView; b) Próbka ślepa wewnątrz THGA podczas opracowania metody.

Wyniki i dyskusja

Wodne standardy kalibracyjne są lepsze do stosowania niż metoda dodatków w analizie Pb w próbkach krwi. Zapewniają one mniejsze pomyłki peratora, niższe koszty analizy i krótsze czasy jej wykonnia niż w wypadki metody dodatków lub wzorców z dopasowana matrycą.[4] Nałożenie dwóch pików: wodnego standardu Pb (czerwony) i próbki krwi referencyjnej (niebieski) zmierzone PinAAcle 900T są pokazane na Rysunku 3. Jak oczekiwano w matryc krwi odparowanie Pb volatilization następuje później niż w standardzie, stosowane warunki STPF powodują, że wszystkie atomy Pb są odparowywane do środowiska o stałej temperaturze, niezależnie od czasu ich pojawienia. To powoduje, że wkład każdego atomu Pb w sygnał analityczny jest taki sam co pozwala na stosowanie wodnych roztworów kalibracyjnych z zachowaniem jednocześnie dokładności i precyzji.



Rysunek 3. Nałożone spiki standardu (czerwona linia) oraz próbki referencyjnej krwi (niebieska linia). Linie ciągłe pokazują sygnał analityczny po korekcji tła (AA-BG); przerywane linie są sygnałami tła (BG).



Rysunek 4. a) Liniowa krzywa kalibracyjna dla próbek Pb do 60 µg/dL. b) Liniowa krzywa kalibracyjna dla próbek Pb do 120 µg/dL.

W wypadku tej analizy aparat był kalibrowany do 60 µg/dL (Rysunek 4a), jednak można okazać, że krzywa jest liniowa zw zakresie do 120 µg/dL lub nawet wyżej (Rysunek 4b). To powoduje minimalizację kroków rozcieńczenia próbek, które są wymagane dla próbek o wysokich zawarościach. Wielokrotne pomiary roztworu rozcieńczalnika dały granicę wykrywalności na poziomie 0.23 µg/dL (3SD).

Odzysk dla materiału referencyjnego NIST® 955c, Toxic Metals in Caprine Blood, był w zakresie od 98-102% dla wszystkich czterech poziomów stężeń (Tablica 3). Dla trzech poziomów próbek materiału BioRad LyphoChek odzysk wynosił od 100-106% (Tablica 4). Wszystkie watrości eksperymentalne z łatwością mieściły się w granicach referencyjnych.

Tablica 3. **Wyniki pomiarów NIST® SRM 955c z zastosowaniem wodnych standardów i techniki GFAAS.**

Próbka	Wartość referencyjna (µg/dL)	Wartość otrzymana (µg/dL)	Odzysk (%)
Poziom 1	0.424 ±0.011	0.431	102
Poziom 2	13.950 ±0.080	13.8	99
Poziom 3	27.76 ±0.16	27.6	100
Poziom 4	45.53 ±0.27	44.8	98

Tablica 4. **Wyniki dla próbek BioRad LyphoChek Control (trzy poziomy stężenia).**

Próbka	Wartość refer* (µg/dL)	Zakres (µg/dL)	Wartość otrzymana (µg/dL)	Odzysk (%)
Poziom 1	9.58	7.67-11.5	9.83	103
Poziom 2	27.7	22.2-33.3	29.4	106
Poziom 3	54.0	43.2-64.8	54.0	100

** Wartośc materiału BioRad są średnią wyników otrzymanych metodą ICP-MS.*

Podajnik próbek AS 900 był stosowany do zapewnienia dokładnego dozowania próbki. Końcówka pipety automatycznego dozowanika AS 900 nie wymagała żadnego czyszczenia lub innej obsługi pomiędzy wykonywanymi pomiarami w celu uniknięcia przenoszenia zanieczyszczenia od próbek o wysokiej zawartości ołowiu. Można także wykonywać, jeżeli pojawi się taka konieczność, automatyczne rozcieńczenie próbek o sygnałach leżących powyżej zakresu krzywej kalibracji.

Podsumowanie

W niniejszej publikacji zaprezentowano przykład w jaki sposób nasz aparat może być wyorzystany w wypadku walidowanej metody oznaczania ołowiu w próbkach krwi pełnej. Szybkość i dokładność możliwa jest dzięki stosowaniu konceptu STPF, systemu THGA oraz pomiarów spektrometrem absorpcji atomowej PinAAcle 900T. Liniowy zakres dynamiczny pozwala na pomiary w szerokim zakresie stężeń olowiu w próbkach od poziomów dużo poniżej krytycznej wartościl 10 µL/dL do dużo więszych stężeń, które mogą być potrzebne nie tylko w badaniach klinicznych, ale także w badaniach naukowych. Spektrometr absorpcji atomowej PinAAcle 900T jest odpowiednim aparatem do analiz klinicznych oznaczania ołowiu we krwi.

Literatura

1. "Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopic Measurements of Blood Lead in Matrix-Matched Standards", Bannon, D.I., Murashchik, C., Zapf, C.R., Farfel, M.R., Chisollm, J.J. Jr. Clinical Chemistry • Automation and Analytical Techniques, Vol. 40, No. 9, pp. 1730-1734, 1994.

2. "An Assessment of Contemporary Atomic Spectroscopic Techniques for the Determination of Lead in Blood and Urine Matrices", Patrick J. Parsons, Ciaran Geraghty, Mary Frances Verostek, Spectrochimica Acta Part B, Vol. 56, pp. 1593-1604, 2001.

3. "Blood Lead Determination by Electro-thermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry with PerkinElmer 4100ZL AAS", New York State Department of Health, May 19, 1992.

4. "A Rapid Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric Method for the Determination of Lead in Blood", Patrick J. Parsons and Walter Slavin, Spectrochimica Acta, Vol. 48B, No. 6/7, pp. 925-939, 1993.

PerkinElmer, Inc.
940 Winter Street
Waltham, MA 02451 USA
P: (800) 762-4000 or
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com

PerkinElmer®

For a complete listing of our global offices, visit www.perkinelmer.com/ContactUs

Copyright ©2011, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.

009635_01