

Beata Janasik

Małgorzata Trzcinka-Ochocka

Renata Brodzka

## OZNACZANIE SELENU W SUROWICY/OSOCZU TECHNIKĄ SPEKTROMETRII MAS Z PLAZMĄ INDUKCYJNIE SPRZĘŻONĄ (ICP-MS): PORÓWNANIE Z TECHNIKĄ BEZPŁOMIENIOWEJ ABSORPCYJNEJ SPEKTROMETRII ATOMOWEJ (GF-AAS)

SELENIUM DETERMINATION IN PLASMA/SERUM

BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY (ICP-MS):

COMPARISON WITH GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY (GF-AAS)

Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera, Łódź

Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego

### STRESZCZENIE

**Wstęp:** Celem pracy było porównanie metod oznaczania selenu w surowicy/osoczu technikami bezpłomieniowej spektrometrii atomowej z odparowaniem w kuwecie grafitowej (GF-AAS) oraz spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS).

**Materiał i metody:** Oznaczenia wykonywano w surowicy/osoczu krwi pobranej z żyły łokciowej przy użyciu technik GF-AAS na aparacie Unicam Solar 989 QZ oraz ICP-MS na aparacie Elan DRC-e PerkinElmer (SCIEX, USA). Oznaczenia weryfikowano, stosując wewnętrzną kontrolę jakości oznaczeń z użyciem materiałów odniesienia Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany) oraz zewnętrznej kontroli jakości opierającej się na systematycznym udziale w niemieckim programie kontroli jakości oznaczeń (G-EQUAS). **Wyniki:** Wyznaczone parametry walidacyjne dla obu technik wynoszą odpowiednio: GF-AAS — precyzja 8%, granica wykrywalności 3,4 µg/l, powtarzalność 7,2%, poprawność 6,8%, odzysk 93,2%; ICP-MS — precyzja 5,9%, granica wykrywalności 0,19 µg/l, powtarzalność 5,5%, poprawność 2,4%, odzysk 97,6%. **Wnioski:** Porównanie obu technik wskazuje, że zarówno technika GF-AAS, jak i ICP-MS charakteryzują się wysoką selektywnością i precyzją oznaczeń selenu w surowicy, jednak technika ICP-MS pozwala uzyskać niższe granice wykrywalności i można ją wykorzystywać do równoległego oznaczania obok selenu innych metali, np. miedzi (Cu) i cynku (Zn) (analiza wieloelementowa). Med. Pr. 2011;62(5):489–498

Słowa kluczowe: monitoring biologiczny, selen, ICP-MS, GF-AAS, surowica/osocze

### ABSTRACT

**Background:** The present study was aimed at comparing two techniques of selenium (Se) determination in serum/plasma samples: inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and graphite furnace atomic absorption (GF-AAS). **Materials and methods:** Blood samples were collected by venipuncture, using Venosafe® closed blood sampling system. The samples were centrifuged. The measurements were performed by Elan DRC-e mass spectrometry, Perkin Elmer, SCIEX, USA and Unicam Solar 989 QZ atomic absorption spectrometry. Reference material, Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany), was used to verify the determinations. The Laboratory participates in external quality control (G-EQUAS). **Results:** Analytical parameters for both techniques are respectively: ICP-MS — precision 5.9%, limit of detection 0.19 µg/l, repeatability 5.5%, trueness 2.4%, bias 97.6%, GF-AAS — precision 8%, limit of detection 3.4 µg/l, repeatability 7.2%, trueness 6.8%, bias 93.2%. **Conclusions:** The benefits of the ICP-MS technique are high accuracy, low detection limits and the possibility of multi-element analysis. Med Pr 2011;62(5):489–498

Key words: biological monitoring, selenium, ICP-MS, GF-AAS, plasma/serum

Adres 1. autorki: Zakład Bezpieczeństwa Chemicznego, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera,  
ul. św. Teresy 8, 91-348 Łódź; e-mail: beatajan@imp.lodz.pl

Nadesłano: 20 lipca 2011

Zatwierdzono: 5 września 2011



## WSTĘP

Selen (Se) jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. W środowisku występuje zarówno w wyniku naturalnych procesów, jak i działalności człowieka. Pierwiastek ten należy do grupy elementów śladowych niezbędnych w organizmie, które odgrywają wiele biologicznych funkcji. Ujawnienie biologicznej roli tego pierwiastka związane było z odkryciem jego obecności w centrum aktywnym peroksydazy glutationowej (glutathione peroxidase — GSHPx). Istotna jest także jego rola w procesach peroksydacji lipidów, kwasów DNA i RNA oraz w syntezie przeciwciał i aktywacji witaminy E (1–3). Do organizmu dostarczany jest głównie z żywnością oraz suplementami diety, jednak biodostępność jest ściśle zależna od formy chemicznej, w jakiej selen występuje (4,5).

Istotna fizjologicznie rola selenu u człowieka spowodowała, że na przestrzeni ostatnich lat pierwiastek ten stał się przedmiotem intensywnych badań naukowych związanych z jego działaniem. Uważa się, że niedobór selenu jest przyczyną chorób naczyniowo-sercowych, obniżenia sprawności układu odpornościowego, reumatoidalnego zapalenia stawów czy cukrzycy. Badania epidemiologiczne wskazują na istnienie zależności między niedoborem selenu a rozwojem niektórych nowotworów oraz chorób naczyniowo-kръżeniowych (6,7). Szkodliwy dla zdrowia człowieka może być również nadmiar selenu w organizmie. Wysokie stężenia tego pierwiastka wywołują selenozę, chorobę o charakterystycznych symptomach — wypadanie włosów, charakterystyczną woń oddechu, zmęczenie i metaliczny posmak w ustach. Niewielka granica między dawką niezbędną dla organizmu a dawką toksyczną zwraca uwagę na konieczność monitorowania stężeń tego pierwiastka w organizmie.

Ocenę wpływu środowiska i stosowanej diety na zawartość Se w organizmie ludzkim przeprowadza się najczęściej w oparciu o oznaczanie stężenia tego metalu we krwi lub surowicy/osoczu. Oznaczanie selenu w próbkach materiału biologicznego następuje wiele trudności. Wynika to głównie z różnorodności form selenu, a także z bogatej matrycy, która jest przyczyną występowania licznych interferencji. Do oznaczeń selenu w materiale biologicznym wykorzystuje się szeroki zakres technik analitycznych, takich jak aktywacyjna analiza neutronowa (neutron activation analysis — NAA), spektrofлуorymetria, bezpłomieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa z wykorzystaniem kuwety grafitowej (graphite furnace atomic absorp-

tion spectrometry — GF-AAS) lub metoda wzbudzenia wodoroków i elektrotermicznej atomizacji (hydride generation electrothermal atomization atomic absorption — HG-ET-AAS) (8–15).

Szczególnie szerokie zastosowanie znalazły metody spektrofлуorymetryczna oraz GF-AAS. W technice spektrofлуorymetrycznej selen oznaczany jest metodą Watkinsona, która polega na rozkładzie organicznej matrycy przy użyciu mieszaniny kwasów utleniających. Selen przeprowadzany jest w  $\text{Se}^{+4}$ , a następnie kompleksowany przez 2,3-dwumono-naftalen (2,3-diamonaphtalene — DAN). Utworzony kompleks ekstrahowany cykloheksanem oznaczany jest fluorometrycznie (15). Metoda szeroko stosowana w latach 80.–90., jako niezwykle czasochłonna i pracochłonna ze względu na cykl przygotowania prób została zastąpiona z powodzeniem przez technikę bezpłomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej z wykorzystaniem kuwety grafitowej (GF-AAS) oraz metodę wzbudzenia wodoroków i elektrotermicznej atomizacji (HG-ET-AAS).

Oznaczanie selenu techniką HG-AAS polega na redukcji jonów selenu (generacji selenowodoru) borowodorkiem sodu w kwaśnym środowisku, a następnie atomizacji selenu w kuwecie kwarcowej. Jest to technika pozwalająca uzyskać niskie granice wykrywalności, wymaga jednak dodatkowego wyposażenia współpracującego z absorpcjometrem atomowym, a także wstępnej mineralizacji mieszaniną silnych kwasów (10). Na szybką i bezpośrednią analizę selenu w materiale biologicznym pozwala technika bezpłomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej z wykorzystaniem GF-AAS. Ze względu jednak na trudności z pozbyciem się matrycy organicznej, wysoką lotność selenu i interferencje spektralne pochodzące od żelaza i fosforu technika ta przysparza wielu problemów analitycznych. Na ich uniknięcie pozwala dodatek modyfikatora matrycy, który podnosi temperaturę etapu spopielenia do 1250–1400°C i zapewnia całkowity rozkład organicznej matrycy bez strat oznaczanego pierwiastka. Jednym z bardziej korzystnych modyfikatorów matrycy, stabilizujących wszystkie połączenia selenu obecne w biologicznej matrycy, jest mieszanina octanu miedzi i azotanu magnezu (16,17). Inne trudności, takie jak interferencje spektralne, są skutecznie eliminowane przy stosowaniu jako korektora tła tzw. efektu Zeemana (8,9,11–14,16–20).

W ostatnich latach istotną rolę w laboratoriach analitycznych odgrywa technika spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS), która jest najnowszej generacji, nowoczesnym i automatycz-



nym układem służącym do oznaczania pierwiastków w wielu matrycach. Jest to technika, w której wykorzystuje się pomiar intensywności strumienia jonów powstałych w plazmie. Wytworzone jony w plazmie sprzężonej indukcyjnie są następnie rozdzielane za pomocą analizatora mas ze względu na stosunek wartości ich masy do ładunku. Stężenie pierwiastka jest proporcjonalne do liczby jonów. Do niewątpliwych zalet ICP-MS należą bardzo niskie granice wykrywalności wielu pierwiastków na poziomie pg/l uzyskiwane dzięki blisko 100-procentowej wydajności jonizacji w plazmie ICP, duża selektywność i doskonała czułość, które umożliwiają oznaczenie całego spektrum pierwiastków w tym samym czasie, a także określenie stężeń poszczególnych izotopów danego pierwiastka w złożonych matrycach (21–25).

Liczba prac dotyczących oznaczania selenu w surowicy/osoczu techniką ICP-MS jest ograniczona ze względu na trudności eliminacji wpływu matrycy. W większości prac proponuje się jedynie rozcieńczanie próbek wodą dejonizowaną (26), jednak część autorów w celu usunięcia efektów matrycy proponuje 10–20-krotne rozcieńczanie surowicy/osocza roztworami zawierającymi 2-propanol, sole wersenianu sodowego, amoniak i Triton X-100 (25) lub butanol, kwas azotowy i surfaktant TAMA Chemicals (23,27). Metoda spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową (high performance liquid chromatography — inductively coupled plasma — mass spectrometry — HPLC-ICP-MS) może być również doskonałym narzędziem analitycznym do analizy specyficznego selenu.

Celem pracy było porównanie metod oznaczania selenu w surowicy/osoczu technikami spektrometrii mas z ICP-MS oraz absorpcyjnej spektrometrii atomowej

z wykorzystaniem GF-AAS jako techniki referencyjnej, której zgodność z normą europejską (30) została potwierdzona certyfikatem akredytacji PCA AB 215.

## MATERIAŁ I METODY

### Próbki badane

Próbkami do badań były surowice krwi ludzkiej ( $n = 27$ ) pobrane od osób zawodowo narażonych na arsen. Surowice otrzymano z krwi pobranej z żyły łokciowej do próbki próżniowej w systemie zamkniętym (Venosafe®, Terumo) przeznaczonym do oznaczeń metali śladowych. Pobraną próbkę krwi po 1 godzinie odwirowywano przez 15 minut przy 4000 rpm na wirówce Beckman. Surowicę przenoszono do czystej próbki i przechowywano w temperaturze lodówki ( $< 6^{\circ}\text{C}$ ) do czasu analizy. W przypadku analiz w czasie późniejszym niż 7 dni próbki zamrażano.

### Stosowane techniki

W badaniu wykorzystano:

- spektrometr absorpcji atomowej Unicam Solar 989 QZ, wyposażony w kuwetę grafitową GF 90, autosampler typu FS 90 i korekcję tła typu Zeeman (GF-AAS);
- spektrometr masowy z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-MS) Elan DRC-e, PerkinElmer, SCIEX, USA, wyposażony w komorę reakcyjną DRC (Dynamic Reaction Cell), system wprowadzania próbki składający się z komory cyklonicznej i nebulizera (Mainharda, typ A quartz).

Warunki pomiarów stosowane przy oznaczaniu selenu w surowicy technikami GF-AAS oraz ICP-MS prezentują tabele 1–3.

**Tabela 1.** Parametry pracy spektrometru Unicam Solar 989 QZ

**Table 1.** Optimized operating conditions for Unicam Solar 989 QZ spectrometer

| Parametr<br>Parameter                         | Ustawienia/typ<br>Settings/Type |
|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| Lampa HCL / HCL lamp                          | Se-Unicam                       |
| Natężenie prądu lampy / Lamp current          | 15 mA (100%)                    |
| Kuweta grafitowa / Graphite cuvettes          | powlekana / coated              |
| Szerokość szczeliny monochromatora / Bandpass | 0,5 nm                          |
| L — długość fali / Wavelengths                | 196 nm                          |
| Przepływ argonu przez kuwetę / Ar flow        | 0,2 l/min                       |
| Czas pomiaru / Measurement time               | 3,0 sek.                        |
| Objętość nastrzykiwana / Injection volume     | 20 $\mu\text{l}$                |



**Tabela 2.** Parametry pracy kuwety**Table 2.** Optimized operating conditions of graphite furnace

| Faza<br>Phase | Temperatura<br>Temperature<br>[°C] | Czas<br>Time<br>[s] | Przyrost<br>Rate<br>[°C/s] | Gaz/typ<br>Gas/type | Przepływ gazu<br>Gas flow<br>[dm <sup>3</sup> /min] | Komendy<br>Commands |
|---------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|
| 1             | 85                                 | 60,0                | 10                         | argon / argon       | 0,2                                                 | RS                  |
| 2             | 700                                | 30,0                | 0                          |                     | 0,2                                                 | –                   |
| 3             | 1 050                              | 30,0                | 0                          |                     | 0,2                                                 | –                   |
| 4             | 2 100                              | 3,0                 | 0                          |                     | wyłączony / off                                     | RD TC               |
| 5             | 2 700                              | 2,0                 | 0                          |                     | 0,2                                                 | TC                  |

RS — powrót do stanu czuwania / return to standby, RD — odczyt / read, TC — kontrola temperatury / temperature control.

**Tabela 3.** Parametry pracy spektrometru ICP-MS**Table 3.** Optimized operating conditions of ICP-MS

| Parametr<br>Parameter                                    | Ustawienia/typ<br>Settings/Type                                                                                               |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RF moc / RF power                                        | 1,075 Kw                                                                                                                      |
| Przepływ Ar przez rozpylacz / Nebulizer Ar gas flow rate | typowy 0,8–1,0 l×min <sup>-1</sup> (optymalizowany codziennie) /<br>/ typical 0.8–1.0 l×min <sup>-1</sup> (daily performance) |
| Przepływ gazu w płazmie / Plasma gas flow rate           | 15 l×min <sup>-1</sup>                                                                                                        |
| Przepływ gazu wspomagającego / Auxiliary gas flow rate   | 1,2 l×min <sup>-1</sup>                                                                                                       |
| Ustawienia detektora / Detector mode                     | dwustopniowy / dual                                                                                                           |
| Jednostka zliczeń / Reading unit                         | zliczenia na sekundę / counts per second (cps)                                                                                |
| Soczewki / Lens                                          | włączone / on                                                                                                                 |
| Typ krzywej / Curve type                                 | liniowa przez zero / linear through zero                                                                                      |
| Jednostka oznaczeń / Measurement unit                    | µg×l <sup>-1</sup>                                                                                                            |
| Liczba skanowań próbki / Sweeps per reading              | 20                                                                                                                            |
| Powtórzenia / Replicates                                 | 3                                                                                                                             |
| Rozpylacz / Nebulizer                                    | mainhard / główny dysk                                                                                                        |
| Komora mgielna / Spray chamber                           | cykloniczna / cyclonic                                                                                                        |
| Monitorowane jony m/z / Selected isotopes                | 78 (Se)                                                                                                                       |
| CeO <sup>+</sup> / Ce <sup>+</sup>                       | < 2%                                                                                                                          |
| Przepływ metanu przez komorę DRC / DRC methane flow      | 0,4 ml/min                                                                                                                    |

RF — moc generatora / generator power, ICP-MS — spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną / inductively coupled plasma mass spectrometry, m/z — stosunek masy do ładunku / mass:load ratio, DRC — dynamiczna komora reakcyjna / dynamic reaction chamber.

## Procedura analityczna

### GF-AAS

Do oznaczenia selenu w surowicy techniką GF-AAS zastosowano metodę według Neve (16,17) po licznych własnych modyfikacjach (18,28). Metoda polega na rozcieńczeniu próbki surowicy (0,3 ml) w proporcjach 1:3 roztworem modyfikatora matrycy: 0,5 g/l Cu (CH<sub>3</sub>COOH)<sub>2</sub>; 1,0 g/l Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0,15% m/v Triton X-100 w 2% (m/v) HNO<sub>3</sub>. Tak przygotowaną próbkę nanoszo-

no do kuwety grafitowej impregnowanej z wykorzystaniem 10 µl MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) przed każdym właściwym cyklem pomiarowymi i oznaczano w warunkach pracy absorpcjometru atomowego (tab. 1, 2). Zakres pomiarowy metody wynosi 6,8–120 µg/l. Roztwory robocze selenu o końcowym stężeniu 0, 20, 40, 60, 80, 120 µg Se/l uzyskano poprzez dodanie odpowiednich ilości wodnych roztworów pośrednich selenu do osocza krwi ludzkiej. Osocze uzyskano z krwi pobranej od wolontariuszy.



## ICP-MS

Do oznaczenia selenu w surowicy techniką ICP-MS zastosowano własną procedurę, będącą luźną adaptacją licznych prac dotyczących oznaczania elementów śladowych w surowicy techniką ICP-MS. Metoda polega na 150-krotnym rozcieńczeniu próbki surowicy w 0,1% HNO<sub>3</sub>. Tak przygotowaną próbkę oznaczano w warunkach pracy spektrometru masowego (tab. 3).

## Kontrola jakości oznaczeń

Prawidłowość wykonywanych oznaczeń weryfikowano poprzez stosowanie wewnętrznej i zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń. Do wewnętrznej kontroli jakości wykonywanych oznaczeń stosowano materiał odniesienia Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany) o stężeniu 83,3 µg/l (tab. 4). Zewnętrzną

kontrolę jakości weryfikowano poprzez udział laboratorium w międzynarodowym systemie badań biegłości, German External Quality Assessment (G-EQUAS) organizowanej przez Institute of Occupational Social and Environmental Medicine of the University of Erlangen, Nuremberg (tab. 5). Laboratorium posiada certyfikat akredytacji Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) dla metody oznaczania selenu w surowicy/osoczu techniką GF-AAS (AB 215) otrzymany 15 grudnia 2000 r.

## WYNIKI

Wyniki porównań oznaczeń selenu w surowicy przy użyciu technik GF-AAS (jako techniki referencyjnej) oraz ICP-MS zestawiono w tabelach 4–7 oraz rycinie 1.

**Tabela 4.** Poprawność metody oznaczania selenu techniką GF-AAS oraz ICP-MS

**Table 4.** Selenium determinations in reference material Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany) by GF-AAS and ICP-MS techniques

| Materiał odniesienia<br>Reference material | Oznaczenia<br>Determinations<br>[n] | Wartość referencyjna<br>Reference value<br>[µg/l] | Wartość oznaczona<br>Determined value<br>[µg/l] | Poprawność<br>Trueness<br>[%]        | Odzysk<br>Recovery<br>[%]        | Powtarzalność/Precyzja<br>Reapetability/Precision<br>[%] |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Clincheck® level 1                         | –                                   | x                                                 | $\bar{x} \pm s_x$                               | $\frac{x - \bar{x}}{x} \times 100\%$ | $\frac{\bar{x}}{x} \times 100\%$ | $\frac{S_r}{x} \times 100\%$                             |
| GF-AAS                                     | 13                                  | 83,3                                              | 79,7±2,1                                        | 4,4                                  | 95,6                             | 2,6                                                      |
| ICP-MS                                     | 13                                  | 83,3                                              | 85,3±4,7                                        | 2,4                                  | 97,6                             | 5,5                                                      |

GF-AAS — bezplamieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa z użyciem kuwety grafitowej / graphite furnace atomic absorption,

ICP-MS — spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną / inductively coupled plasma mass spectrometry.

**Tabela 5.** Porównanie oznaczonych stężeń selenu w surowicy/osoczu technikami GF-AAS oraz ICP-MS w ramach zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń G-EQUAS oraz oznaczania certyfikowanego materiału odniesienia BCR-637

**Table 5.** Comparison of selenium concentrations in serum/plasma determined by GF-AAS and ICP-MS techniques in external quality control assessment (G-EQUAS) and certified reference material BCR-637

| Oznaczany element<br>Selen w osoczu<br>Parameter<br>Selenium in plasma | Stężenie selenu<br>Selenium concentrations<br>[µg/l] |                                         |                                                      | Poprawność<br>Trueness<br>[%]<br>$\frac{x - \bar{x}}{x} \times 100\%$ |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                                                                        | wynik oznaczony<br>determined results                | wartość referencyjna<br>reference value | zakres wartości<br>referencyjnych<br>tolerance range |                                                                       |
| Próbka A (ICP-MS) / Sample A                                           | 101,4                                                | 100,3                                   | 82,3–118,3                                           | 1,1                                                                   |
| Próbka B (ICP-MS) / Sample B                                           | 196,4                                                | 198,2                                   | 172,1–224,3                                          | 0,9                                                                   |
| BCR-637 (ICP-MS)                                                       | 80,1                                                 | 81,0                                    | 74,0–88,0                                            | 1,1                                                                   |
| Próbka A (GF-AAS) / Sample A                                           | 83,7                                                 | 83,5                                    | 64,7–102,3                                           | 0,2                                                                   |
| Próbka B (GF-AAS) / Sample B                                           | 130,1                                                | 136,6                                   | 107,2–165,3                                          | 4,8                                                                   |
| BCR-637 (GF-AAS)                                                       | 82,0                                                 | 81,0                                    | 74,0–88,0                                            | 1,2                                                                   |

Objaśnienia skrótów jak w tabeli 4 / Abbreviations as in Table 4.



**Tabela 6.** Parametry analityczne metody oznaczania selenu techniką GF-AAS oraz ICP-MS  
**Table 6.** Analytical parameters of selenium determination by GF-AAS and ICP-MS techniques

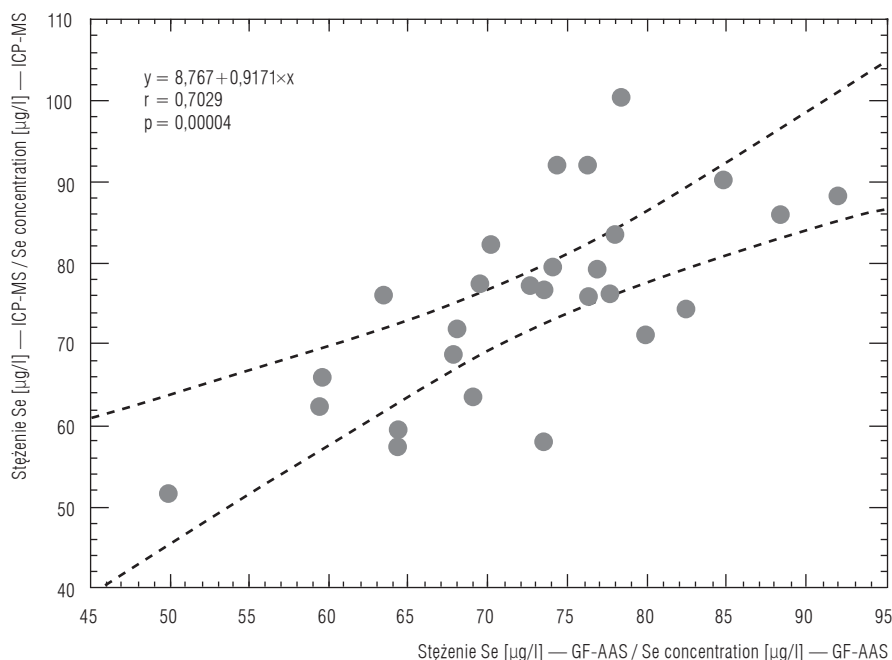
| Parametr<br>Parameter | Współczynnik korelacji<br>Correlation coefficient | Granica wykrywalności<br>Detection limit<br>(DL)<br>[µg/l] | Granica oznaczalności<br>Quantification limit<br>(QL)<br>[µg/l] | Precyzja dla zakresu<br>Precision for range<br>[%] |
|-----------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| GF-AAS                | $Y = 0,00142x + 0,1021$<br>0,997                  | 3,40                                                       | 6,80                                                            | 8,0                                                |
| ICP-MS                | $Y = 0,0214x + 1,804$<br>0,999                    | 0,19                                                       | 0,39                                                            | 5,9                                                |

Objaśnienia skrótów jak w tabeli 4 / Abbreviations as in Table 4.

**Tabela 7.** Porównanie stężeń selenu w surowicy oznaczonych technikami GF-AAS oraz ICP-MS  
**Table 7.** Comparison of selenium concentrations in plasma determined by GF-AAS and ICP-MS techniques

| Technika analityczna<br>Analytical techniques | Oznaczenia<br>Determinations<br>[n] | $\bar{x} \pm SD$<br>[µg/l] | Stężenie selenu<br>Selenium concentrations<br>[µg/l] |            |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------|------------|
|                                               |                                     |                            | min. / min                                           | maks / max |
| GF-AAS                                        | 27                                  | 72,7±9,2                   | 49,9                                                 | 92,0       |
| ICP-MS                                        | 27                                  | 75,5±12,0                  | 51,6                                                 | 100,5      |

Objaśnienia skrótów jak w tabeli 4 / Abbreviations as in Table 4.



GF-AAS — bezpłomieniowa absorpcyjna spektrometria atomowa z użyciem kuwety grafitowej / graphite furnace atomic absorption,  
ICP-MS — spektrometria mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną / inductively coupled plasma mass spectrometry.

**Ryc. 1.** Zależność między stężeniami selenu w surowicy oznaczonymi technikami GF-AAS i ICP-MS.  
**Fig. 1.** The relationship between selenium concentrations in serum determined by GF-AAS and ICP-MS techniques.



### Parametry walidacyjne — charakterystyka metody oznaczania selenu techniką GF-AAS

Wyniki wyznaczonych parametrów analitycznych techniki GF-AAS dla oznaczeń selenu w surowicy prezentują tabele 4–6.

Wyznaczono następujące parametry walidacyjne: granica wykrywalności (detection limit — DL), granica oznaczalności (quantification limit — QL), precyzja metody (tab. 6). Poprawność metody wyznaczono na podstawie oznaczeń materiału odniesienia Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany) (tab. 4). Granicę wykrywalności (3,4 µg/l) obliczono jako trzy odchylenia standardowe (standard deviation — SD) od najniższego stężenia wzorca z krzywej kalibracyjnej. Granicę oznaczalności (6,8 µg/l) obliczono jako sześć SD od najniższego stężenia wzorca z krzywej kalibracyjnej. Precyzja dla zakresu roboczych wzorców kalibracyjnych 20–120 µg/l wynosi 8%.

### Parametry walidacyjne — charakterystyka metody oznaczania selenu techniką ICP-MS

Wyniki wyznaczonych parametrów analitycznych techniki ICP-MS dla oznaczeń selenu w surowicy/osoczu prezentują tabele 4–6. Wyznaczono takie parametry walidacyjne, jak DL, QL i precyzja metody (tab. 6). Poprawność metody wyznaczono na podstawie oznaczeń materiału odniesienia Clincheck® Serum Control Level 1 (Recipe, Germany) (tab. 4). Granicę wykrywalności (0,19 µg/l) obliczono jako trzy SD od najniższego stężenia wzorca z krzywej kalibracyjnej. Granicę oznaczalności (0,39 µg/l) obliczono jako sześć SD od najniższego stężenia wzorca z krzywej kalibracyjnej. Precyzja dla zakresu roboczych wzorców kalibracyjnych 1–100 µg/l wynosi 5,9%.

### Porównanie stężeń selenu w surowicy oznaczonych technikami GF-AAS oraz ICP-MS

Średnie wartości stężeń selenu w surowicy oznaczonych technikami GF-AAS oraz ICP-MS przedstawia tabela 7. Średnia wartość stężenia selenu w 27 próbkach surowicy oznaczona techniką GF-AAS wynosi 72,7±9,2 µg/l, natomiast średnia dla oznaczeń techniką ICP-MS wynosi 75,5±12,0 µg/l. Wartości stężeń selenu oznaczone techniką ICP-MS są około 4% (3,8) wyższe od oznaczeń wykonanych techniką GF-AAS. Liniową zależność między wynikami oznaczonych stężeń selenu w 27 próbkach surowicy/osocza oboma technikami przedstawia rycina 1. Zależność wykazuje statystycznie znamioną ( $p = 0,00004$ ) zbieżność charakteryzującą się wysokim współczynnikiem dopasowania ( $r = 0,7029$ ).

### Porównanie stężeń selenu w próbkach surowicy/osocza w ramach zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń G-EQUAS oraz w zastosowanym certyfikowanym materiale odniesienia BCR-637

Tabela 5. przedstawia wyniki stężeń selenu oznaczonych technikami GF-AAS oraz ICP-MS w próbkach surowicy/osocza w ramach zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń G-EQUAS oraz w certyfikowanym materiale odniesienia BCR-637. Wartości stężeń selenu oznaczonych oboma technikami w ramach zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń (G-EQUAS) organizowanych przez Institute of Occupational Social and Environmental Medicine of the University of Erlangen, Nuremberg oraz certyfikowanym materiale odniesienia wykazują wysoką zgodność z wartościami referencyjnymi. Poprawność metody w procentach wykonanych oznaczeń wyrażona jako zgodność wartości otrzymanej z wartością referencyjną dla techniki GF-AAS mieści się w zakresie 0,2–4,8%. W przypadku techniki ICP-MS zakres ten wynosi 0,9–1,1%.

### OMÓWIENIE

W Pracowni Monitoringu Biologicznego Instytutu Medycyny Pracy im. J. Nofera w Łodzi do chwili obecnej podstawową techniką do oznaczania selenu w surowicy/osoczu była technika bezpłomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej z odparowaniem w GF-AAS. Technika ta pozwala na stosunkowo krótki czas analizy i wymaga niewielkiej objętości materiału badanego. Największe trudności przy stosowaniu tej techniki związane były z pozbyciem się organicznej matrycy z kuwety i spektralne interferencje. W celu ich eliminacji Saeed i Thomassen proponowali stosowanie jako modyfikatora matrycy soli niklu i prowadzenie oznaczeń z lampą deuterową. Inni autorzy zalecali stosowanie soli palladu (14), mieszaninę srebra, miedzi i magnezu (9) bądź rozcieńczanie próbki Tritonem X-100 i bezpośrednie nanoszenie do kuwety z modyfikatorem pallad-nikiel (19). Najdogodniejszym modyfikatorem matrycy, który stabilizuje połączenia selenu w badanym materiale biologicznym, okazało się jednak stosowanie mieszaniny azotanu magnezu i octanu miedzi (16,17). Na podstawie własnych badań i doświadczeń dowiedziono, że precyzję i powtarzalność oznaczeń selenu poprawia, skutecznie eliminując pozostałości matrycy organicznej, wstępne wypalenie kuwety z dodatkiem rozcieńczonego metanolu (18,28).

Obecnie szerokie zastosowanie w laboratoriach zyskuje technika spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie



sprzężoną (21–24). Technika ICP-MS pozwala na wykonywanie wieloelementowych analiz z bardzo niską granicą wykrywalności, szeroką liniowością i w bardzo krótkim czasie analizy. Również w tym przypadku surowica jest matrycą bardzo trudną do oznaczeń ze względu na ok. 6–8-procentową zawartość protein i ok. 1-procentową składników nieorganicznych, powodujących istotne interferencje spektralne (27).

Najczęściej występujące interferencje poliatomowe przy oznaczaniu selenu techniką ICP-MS prezentuje tabela 8. Tworzenie poliatomowych jonów z plazmowym argonem powoduje występowanie licznych interferencji przy oznaczaniu izotopów selenu. Najliczniejsze interferencje, ze względu na łatwość tworzenia i naturalne występowanie w gazie plazmowym, mogą pochodzić z połączeń cząsteczek argonu  $^{40}\text{Ar}$  z innymi szeroko występującymi w materiale biologicznym pierwiastkami ( $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}$ ,  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{K}$ ). Wpływają one przede wszystkim na oznaczanie najczęściej występującego izotopu selenu 80 ( $^{80}\text{Se}$  — 49,6%). Ze względu na trudności analityczne przy oznaczaniu tego izotopu obecna procedura analityczna została oparta na oznaczaniu izotopu selenu 78 ( $^{78}\text{Se}$ ), dla którego występujące interferencje mają dużo mniejsze znaczenie.

Problem poliatomowych interferencji rozwiązuje zastosowanie komory reakcyjnej DRC (Dynamic Reaction Cell) (21,24,25,29). Użycie technologii DRC eliminuje interferencje poprzez zastosowanie jako gazu reakcyjnego innego niż argon, np. metanu lub wodoru eliminujących powstawanie cząstek o masie identycznej z masą izotopu selenu  $^{80}\text{Se}$ . Efekty matrycy mogące blokować rozpylacz lub podajnik, wynikające z obecności białek i soli nieorganicznych w badanej próbce,

zostały wyeliminowane poprzez wysokie rozcieńczenie próbki i przemywanie układu 3-procentowym kwasem azotowym.

Przedstawione w tej pracy wyniki wskazują, że technika ICP-MS charakteryzuje się bardzo dobrą precyzją, niską granicą wykrywalności (0,19  $\mu\text{g/l}$ ) i wydajnością analityczną. Granica wykrywalności jest ok. 7 razy niższa niż przy oznaczaniu techniką GF-AAS. W porównaniu z techniką GF-AAS wyniki stężeń selenu oznaczone techniką ICP-MS są około 4% wyższe (tab. 6, ryc. 1). Wyniki udziału w G-EQUAS oraz wyniki certyfikowanego materiału odniesienia wskazują jednak, że mimo różnicy w wynikach o ok. 4% oznaczenia GF-AAS oraz ICP-MS mieszczą się w dopuszczalnym zakresie stężeń przyjętych przez organizatorów dla wartości prawdziwej (tab. 7). Porównanie technik wskazuje, że technika bezpromieniowej absorpcji atomowej w GF-AAS jest stosunkowo prosta i szybka, z dobrą granicą wykrywalności zwłaszcza przy oznaczaniu jednego elementu. Niewątpliwym atutem tej techniki jest możliwość częściowej mineralizacji próbki w kuwecie grafitowej, co znacznie eliminuje wpływ nieorganicznej matrycy na końcowe stężenie oznaczanego metalu.

W badaniach z zakresu ochrony zdrowia i w badaniach środowiskowych niezbędne są obecnie analizy wieloelementowe, w których oznaczane elementy śladowe znajdują się na różnych poziomach stężeń. Takie analizy można prowadzić, stosując technikę ICP-MS. Wykonywanie oznaczeń pojedynczych elementów wielokrotnie wydłuża czas analiz. Mimo wysokiej specyficzności techniki GF-AAS porównanie liczby analiz w ciągu dnia w porównaniu z techniką ICP-MS wypada na korzyść tej ostatniej.

## WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań, uzyskanych parametrów analitycznych oraz wyników udziału w zewnętrznej kontroli jakości oznaczeń można uznać, że obydwie metodyki analityczne są poprawne i można je stosować do analizy selenu w surowicy/osoczu. Wprowadzenie nowej procedury analitycznej z użyciem techniki ICP-MS — umożliwiającej oznaczanie wielu elementów śladowych w jednej próbce oraz pozwalającej na obniżenie granic oznaczalności — stanowi istotny postęp w zakresie procedur analitycznych i daje bardzo dobre perspektywy do jej stosowania w przypadku wieloelementowych oznaczeń próbek środowiskowych i zawodowych.

**Tabela 8.** Interferencje spektralne występujące podczas oznaczania selenu (Se) techniką ICP-MS

**Table 8.** Most abundant interferences from background and complex matrices on selenium (Se) isotopes in ICP-MS

| Izotop<br>Isotope | Izotopy selenu<br>Abundance<br>[%] | Potencjalne interferencje<br>Potential interferences                                                                                               |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $^{74}\text{Se}$  | 0,89                               | $^{74}\text{Ge}$ , $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$ , $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}$ , $^{39}\text{K}^{35}\text{Cl}$                                  |
| $^{76}\text{Se}$  | 9,37                               | $^{76}\text{Ge}$ , $^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$ , $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ , $^{40}\text{Ar}^{36}\text{S}$ , $^{39}\text{K}^{37}\text{Cl}$ |
| $^{77}\text{Se}$  | 7,63                               | $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$                                                                                                                     |
| $^{78}\text{Se}$  | 23,77                              | $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ , $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}$ , $^{41}\text{K}^{37}\text{Cl}$                                                    |
| $^{80}\text{Se}$  | 49,61                              | $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}$ , $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ca}$ , $^{40}\text{Ar}^{40}\text{K}$                                                     |
| $^{82}\text{Se}$  | 8,73                               | $^{66}\text{Zn}^{16}\text{O}$                                                                                                                      |

Objaśnienia skrótów jak w tabeli 4 / Abbreviations as in Table 4.



## PIŚMIENNICTWO

1. Daniels L.A.: Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996;54:185–199
2. Seiler H.G., Sigel H.: *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. Marcel Dekker Inc., New York and Basel 1987, ss. 581–594
3. Elinder C.G., Friberg L., Kjellstrom T., Nordberg G., Oberdoester G.: *Biological monitoring of metals — Se*. IPCS, WHO, Geneva 1994
4. Kuczyńska J., Biziuk M.: Biogeochemia selenu i jego monitoring w materiałach biologicznych pochodzenia ludzkiego. *Ecol. Chem. Eng.* 2007;S1(14):47–65
5. Abdulah R., Miyazaki K., Nakazawa M., Koyama H.: Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005;19:141–150
6. Köse K., Dogan P., Kardas Y., Saraymen R.: Plasma selenium levels in rheumatoid arthritis. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996;53:51–56
7. Marchante-Gayón J.M., Sánchez-Uria J.E., Sanz-Medel A.: Serum and tissue selenium contents related to renal disease and colon cancer as determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1996;10:229–236
8. Ejima A., Watanabe Ch., Koyama H., Matsuno K., Satoh H.: Determination of selenium in the human brain by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Biol. Trace Elem. Res.* 1996;54:9–21
9. Morisi G., Patriarca M., Menotti A.: Improved determination of selenium in serum by Zeeman atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* 1988;34(1):127–130
10. Tiran B., Tiran A., Rossipal E., Loren O.: Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood, serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1993;7(4):211–216
11. Alfthan G., Kumpulainen J.: Determination of selenium in small values of blood plasma and serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1982;140:221–227
12. Saeed K., Thomassen Y.: Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in blood serum and seminal fluid after protein precipitation with trichloroacetic acid. *Anal. Chim. Acta* 1979;110:285–289
13. Eckerlin R.H., Hoult D.W., Carnrick G.R.: Selenium determination in animal whole blood using stabilized temperature platform furnace and Zeeman background correction. *Atomic Spectrosc.* 1987;8(1):64–66
14. Jacobson B.E., Lockitch G.: Direct determination of selenium in serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age-specific reference ranges. *Clin. Chem.* 1988;34(4):709–714
15. Watkinson J.H.: Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal. Chem.* 1966;38(1):92–97
16. Neve J., Chamart S., Molle L.: Optimization of direct procedure for the determination of selenium in plasma and erythrocytes using Zeeman effect atomic absorption spectroscopy. *Trace Elem. Anal. Chem. Med. Biol.* 1987;4:349–358
17. Neve J., Molle L.: Direct determination of selenium in human serum by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. Improvements due to oxygen ashing in graphite tube and Zeeman effect background correction. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1986;59:606–609
18. Trzcinka-Ochocka M., Rażniewska G., Jakubowski M.: Blood serum selenium levels in children and adults in Poland. *Trace Elem. Elec.* 2000;17(3):147–153
19. Schlemmer G., Weltz B.: Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta* 1986;41(11):1157–1165
20. Martinsen I., Radziuk B., Thomassen Y.: Characterisation of spectral interferences in background correction for arsenic, selenium and antimony in electrothermal atomic absorption spectrometric. *J. Anal. At. Spectrom.* 1988;3:1013–1022
21. Sloth J.J., Larsen E.H., Bugel S.H., Moesgaard S.: Determination of total selenium and Se in isotopically enriched human samples by ICP-dynamic reaction cell-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003;18:317–322
22. Labat L., Dehon B., Lhermitte M.: Rapid and simple determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 2003;376:270–273
23. Nelms S.: Determination of copper, zinc and selenium in human serum. *Am. Biotech. Lab.* 2003;21:39–41
24. Mei Wah Fong B., Shing Siu T., Sai Kit Lee J., Tam S.: Multi-elements (aluminium, copper, magnesium, manganese, selenium and zinc) determination in serum by dynamic reaction cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009;47(1):75–78
25. Burri J., Haldimann M.: Direct determination of selenium in human serum by inductively coupled plasma-collision cell-mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007;45(7):895–898



26. D'Ilio S., Violante N., Caimi S., Di Gregorio M., Petruc-  
ci F., Senofonte O.: Determination of trace elements  
in serum by dynamic reaction cell inductively coupled  
plasma mass spectrometry. Developing of method  
with a desolvating system nebulizer. *Anal. Chim.  
Acta* 2006;573–574:432–438
27. Jakubowski M., Trzcinka-Ochocka M., Raźniewska G.:  
Monitoring biologiczny narażenia zawodowego i środo-  
wiskowego na metale — metody oznaczania, interpreta-  
cja wyników. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 2000
28. Szpunar J., Bettmer J., Robert M., Chassaigne H., Cam-  
mann K., Lobinski R. i wsp.: Validation of the determi-  
nation of copper and zinc in blood plasma and urine by  
ICP MS with cross-flow and direct injection nebuliza-  
tion. *Talanta* 1997:1389–1396
29. Al-Saad K.A., Amr M.A., Helal A.I.: Collision/reac-  
tion cell ICP-MS with shielded torch and sector field  
ICP-MS for the simultaneous determination of sele-  
nium isotopes in biological matrices. *Biol. Trace Elem.  
Res.* 2011;140:103–113
30. PN-EN ISO/IEC 17025:2005: Ogólne wymagania do-  
tyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzor-  
cujących. Polski Komitet Normalizacyjny, Warsza-  
wa 2005

