

*Aktuelne teme/
Current topics*

OPTIČKA EMISIONA SPEKTROSKOPIJA SA
INDUKTIVNO KUPLOVANOM PLAZMOM
(ICP/OES) KAO ANALITIČKA TEHNIKA ZA
DETEKCIJU TEŠKIH METALA U
BIOLOŠKOM MATERIJALU

OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY AND
INDUCTIVELY COUPLED PLASMA
(ICP/OES) LIKE AN ANALYTICAL
TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF
HEAVY METALS IN BIOLOGICAL SAMPLES

Correspondence to:

Dipl.farm.-medicinski biohemičar
Biljana Stalović
Institut za medicinu rada,
Sektor za preventivnu medicinu,
Vojnomedicinska akademija,
Crnotravska 17, 11000 Beograd
Tel/Phone: +381-11-3609229,
+381-60-0804010;
E-mail: bidzi_84@yahoo.com

Biljana Stalović¹, Snežana Đorđević²,

¹ Institut za medicinu rada, Sektor za preventivnu medicinu,
Vojnomedicinska akademija

² Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija

Ključne reči

teški metali, toksičnost, metoda

Key words

heavy metals, toxicity, method

Apstrakt

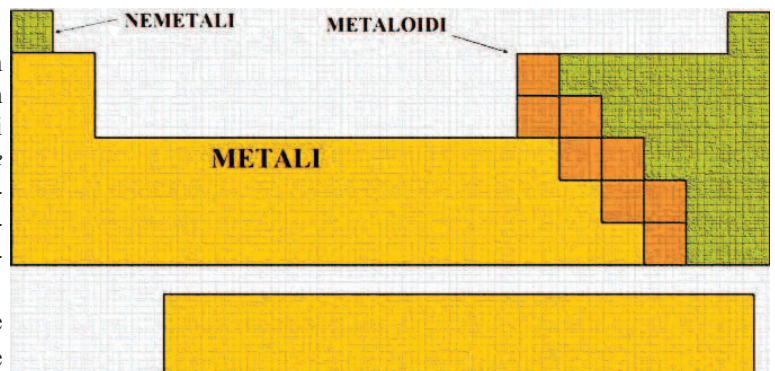
Toksičnost metala je veoma značajna sa aspekta profesionalne toksikologije jer su za metalne otrove prvenstveno vezana profesionalna, hronična trovanja do kojih dolazi usled izloženosti metalnim parama ili česticama metala u toku različitih industrijskih procesa. Ključnu ulogu u proceni ekspozicije metalnim otrovima ima toksikološka laboratorija čiji osnovni zadatak jeste kvalitativna i kvantitativna analiza teških metala u biološkom materijalu pomoću odgovarajuće analitičke tehnike. Najčešće se kao uzorak koriste krv i urin. Određivanje teških metala u biološkom materijalu zahteva veštinu i iskustvo analitičara a pre svega dobru opremljenost laboratorije. Najčešće primenjavana metoda za određivanje teških metala u biološkom materijalu je atomska apsorpciona spektrometrija. Međutim, optička emisiona spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP/OES), kao savremenija metoda, zbog brojnih prednosti u odnosu na atomsku apsorpcionu, dobija sve veći značaj.

Cilj ovog rada je da prikaže pripremu uzoraka mikrotalasnom digestijom i optičku emisionu spektroskopiju sa induktivno kuplovanom plazmom (ICP/OES) kao metodu za identifikaciju i određivanje koncentracije teških metala u biološkom materijalu.

UVOD

Posle gasovitih otrova metali su na drugom mestu kao najznačajniji uzročnici profesionalnih bolesti. Razlikuju se od drugih toksičnih supstanci po tome što ih čovek niti ih je stvorio niti ih može uništiti. Samo 17 elemenata, od ukupnog broja elemenata periodnog sistema su nemetali, 7 su metaloidi koji čine prelazni oblik između metala i nemetala a oko 80 elemenata pripada grupi metala.⁽¹⁾

Od svih metala, teški metali su metali čija je gustina $>5 \text{ g/cm}^3$. Nema jedinstvene definicije teških metala, neki autori kao cut-off vrednost uzimaju i gustinu $> 4 \text{ g/cm}^3$.⁽²⁾



Slika 1. Metali, nemetali i metaloidi

Prema biološkoj funkciji koju imaju u organizmu dele se na:

1. *Esencijalne metale* (Cu, Zn, Fe, Mn, Cr), neophodne za život, čiji potpuni nedostatak ili smanjeno unošenje može dovesti do ozbiljnih poremećaja u funkcionisanju organizma pa čak i smrti. Imaju vrlo važne uloge u organizmu: strukturalna su komponenta enzima i deluju kao enzimski aktivatori. Prisutni su u veoma niskim koncentracijama u organizmu zbog čega se nazivaju elementima u tragu ili u ultratragu. Samo u tim, niskim koncentracijama, ispoljavaju biološke funkcije a ako su prisutni u većim koncentracijama mogu delovati toksično.

2. *Neesencijalne metale* (Pb, Al, Cd, Hg, As), nisu biogeni tj. nemaju nikakve biološke funkcije u organizmu, već deluju isključivo toksično.⁽³⁾

Široka rasprostranjenost teških metala u životnoj i radnoj sredini predstavlja ozbiljan zdravstveni i ekološki problem jer su toksični, nisu biorazgradivi, imaju dugo poluvreme života u zemljištu i akumuliraju se u živi sistem kroz aktivni lanac ishrane.⁽⁴⁾

Teški metali se prirodno nalaze u zemljištu. U zemljište dospevaju trošenjem matične stene iz koje su nastali ili mogu dospeti antropogeno, kao posledica ljudske aktivnosti (prvenstveno industrije, sagorevanjem fosilnih goriva, primenom agrohemijskih, atmosferskom depozicijom), što za posledicu može imati trajnu kontaminaciju zemljišta i podzemnih i površinskih voda. U vodi mogu graditi teško rastvorne karbonate, sulfate i sulfite koji se talože na dnu vodenih površina gde dolazi do njihove akumulacije. Biljke preuzimaju teške metale iz voda, zemljišta, veštačkih đubriva, pesticida. Korišćenjem biljaka za ishranu životinje unose teške metale u svoj organizam i time započinju biološki procesi: bioakumulacija u biljkama i životinjama i ugrađivanje u lanac ishrane.⁽⁵⁾

Toksikokinetika

Za metalne otrove su prvenstveno vezana profesionalna, hronična trovanja do kojih dolazi usled izloženosti parama ili česticama metala u toku različitih industrijskih procesa, pa su glavni putevi unosa metalnih otrova u organizam respiratorni trakt i koža kod profesionalno eksponiranih osoba i respiratorni i digestivni trakt za opštu populaciju.

Za resorpciju teških metala iz vazduha najznačajniji je unos preko respiratornog trakta gde se teški metali inhalacijom unose u obliku aerosola ili pare u pluća odakle se apsorbiraju u cirkulaciju i vezuju za proteine plazme, koji ih distribuiraju do ciljnih organa gde ispoljavaju toksične efekte. Resorpcija preko kože odvija se prolaskom kroz epidermis, folikul korena dlake ili kanale lojnih žlezda.

Uglavnom se teški metali deponuju u ciljnom organu. Za neke metale je karakteristično da se kumuluju u organizmu (kadmijum u bubrezima ima biološki poluzivot 10-30 godina a olovo u kostima 10 godina).

Najveći procenat resorbovanih metala izlučuje se urinom u nepromenjenom obliku. Metali su metabolički inertne supstance, u organizmu ne podležu transformaciji osim metaloida (As, Sb i Se), pa se u urinu mogu naći njihova organska i neorganska jedinjenja.⁽⁶⁾

Toksikodinamika

Toksičnost metala je prvenstveno rezultat njihove interakcije sa proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama, vezuju se za slobodnu amino, hidroksilnu, karboksilnu, tiolnu funkcionalnu grupu i time blokiraju funkcije biološki aktivnih jedinjenja. Svi metali deluju na jonske kanale. Neki metali pospešuju nastanak slobodnih radikala i time izazivaju oksidativni stres. Kao protoplazmatski otrovi deluju na strukture unutar ćelija, vezuju se za sulfhidrilne grupe intracelularnih proteina i inaktiviraju njihovu funkciju. Neki metali ispoljavaju genotoksično a neki kancerogeno dejstvo, dok pojedini mogu izazvati i reakcije preosetljivosti.⁽⁷⁾

Procena ekspozicije

Ključnu ulogu u proceni ekspozicije metalnim otrovima ima toksikološka laboratorija koja kroz proces biomonitoringa vrši laboratorijsku procenu statusa elemenata u organizmu.

Najpouzdanija slika o statusu elementa u organizmu dobija se istovremenim određivanjem:

- *koncentracije elementa u biloškom materijalu*
- *aktivnosti metaloenzima*
- *funkcionalno-morfološki indeksa.*

Kao biološki materijal za analizu teških metala najčešće se koriste *krv (puna krv, serum ili plazma) i urin (24h ili jednokratni uzorak).*

Metali su u organizmu prisutni u jako niskim koncentracijama pa posebnu pažnju treba obratiti prilikom uzorkovanja i tretmana uzorka, jer brojni preanalitički faktori mogu ugroziti pouzdanost laboratorijskog rezultata. Moguća je kontaminacija iz spoljašnje sredine jer su mnogi elementi u tragu prisutni u laboratorijskoj okolini u ng ili čak ig količinama. Pri analizi, neophodno je koristiti opremu od plastike ili borosilikatnog stakla i reagensne visokog stepena čistoće: *supra* i *ultrapur* čiste reagensne.⁽⁸⁾

Priprema uzorka

Kako su metali u organizmu vezani za organske molekule prvenstveno za ligande molekula proteina i to najvećim delom za albumin, u takvom obliku ih je nemoguće dokazati. Potrebno ih je prevesti u jonsko stanje, što se postiže mineralizacijom ili razaranjem. Savremeni postupak razaranja jeste razaranje pomoću mikrotalasne pećnice.⁽⁹⁾

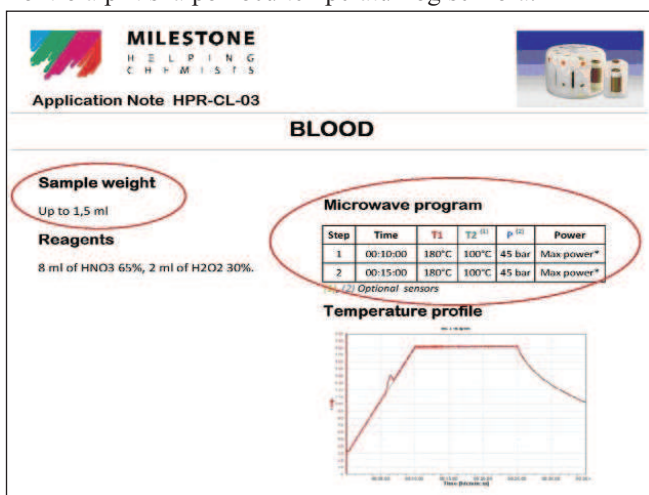
Mikrotalasna mokra digestija u zatvorenom sistemu koristi mikrotalasnu energiju za zagrevanje rastvarača, koji u kontaktu sa uzorkom prevodi uzorak u rastvor. Mokra digestija, za razliku od suvog spaljivanja na visokim temperaturama, koristi hemijske reagensne odnosno oksidujuće i neoksidujuće kiseline. Izbor kiseline zavisi od prirode matriksa uzorka. Najčešće se kao oksidacioni agens koristi azotna kiselina. Metali se pomoću nje prevode i nitrate koji se lako razaraju.⁽¹⁰⁾

Uzorci koji sadrže visok procenat organskog materijala (biološki materijal, hrana, botanički materijal) proizvode obilne količine gasovitih proizvoda i zahtevaju više temperature razaranja da bi se razorile u potpunosti.

Digestija uzoraka bogatih:

- *ugljenim hidratima vrši na 140 °C*
- *protenima na 150 °C*
- *mastima na T > 170 °C.*

Ovakvi uzorci povećavaju pritisak unutar kivete jer dolazi do oslobađanja CO₂ zbog čega je neophodna stroga kontrola pritiska pomoću temperaturnog senzora.⁽¹¹⁾



Slika 2. Razaranje krvi prema Milestone application note HPR-CL-03

Na slici 2. je prikazana metoda razaranja krvi iz koje zapazimo da je mala količina uzorka potrebna za analizu (< 1,5ml). Reagens za digestiju je koncentrovana azotna kiselina i vodonik peroksid koji ima ulogu da oslobodi uzorak od azotovih oksida. Sistem temperaturu razaranja od 180 °C postiže za 10 min a potom je održava narednih 15 min. Celokupan proces razaranja traje 25 min. Proces se prati sve vreme dok traje digestija pomoću softvera instaliranog na kontrolnom terminalu koji je direktno povezan sa uređajem.

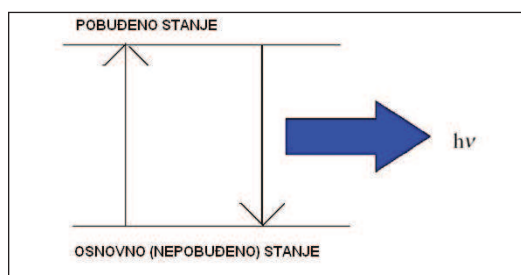
ICP-OES

ICP-OES je optička emisijska spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom. Zasniva na merenju intenziteta emitovane svetlosti. Zahteva veoma male količine uzorka i moguće je detektovati veoma niske koncentracije elemenata:

- u parts per million (ppm) = mg/L = µg/ml
- u parts per billion (ppb) = µg/L = ng/ml.

Princip:

Atomi iz uzorka primaju energiju plazme i prelaze u pobuđeno stanje. Povratkom u osnovno stanje emituju elektromagnetno zračenje tačno određene talasne dužine, karakteristične za dati element. Intenzitet emitovane svetlosti je proporcionalan broju pobuđenih atoma odnosno koncentraciji elementa.



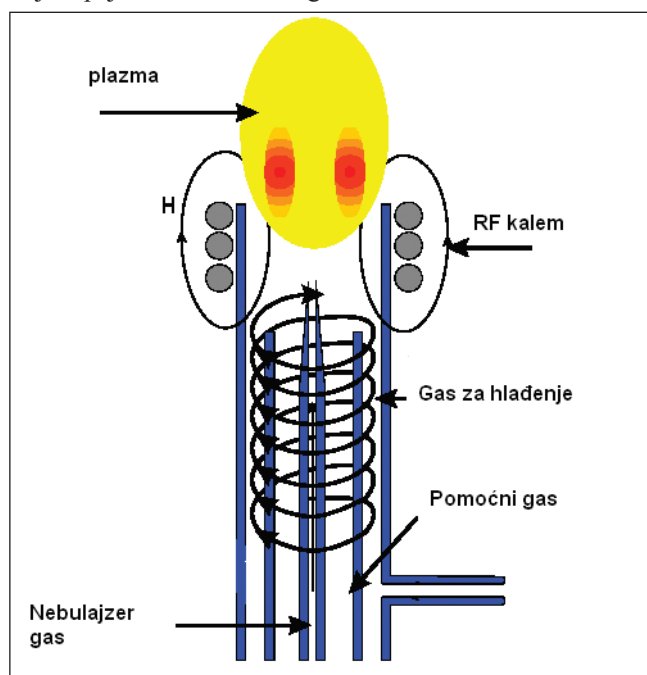
Slika 3. Emisija zračenja

Tečni uzorak se pomoću peristaltičke pumpe upumpava u nebulajzer koji rastvor pretvara u aerosol, čestice dijametra od 1-10 im. Sprej komora uklanja velike kapi, a male kapi, koje čine svega 1-5% od ukupnog rastvora, bivaju nošene strujom nebulajzer gasa u ICP Torch odnosno plazma plamenik.

Plazma plamenik se sastoji od tri koncentrične kvarcne cevi:

- kroz unutrašnju cev struju nebulajzer gas, struja argona (Ar) koja ima laminarni protok i koja injektuje uzorak u plazmu
- kroz srednju cev struji pomoćni gas, struja Ar koja ima tangencijalni protok i služi za hlađenje te cevi
- kroz spoljašnju cev struji gas za hlađenje, tangencijalna struja Ar koja hladi zidove kvarcne cevi, stabilizuje i centririra plazmu.

Na vrhu cevi nalazi se vodom hlađeni indukcijiski kalem koji napaja radiofrekventni generator.⁽¹²⁾

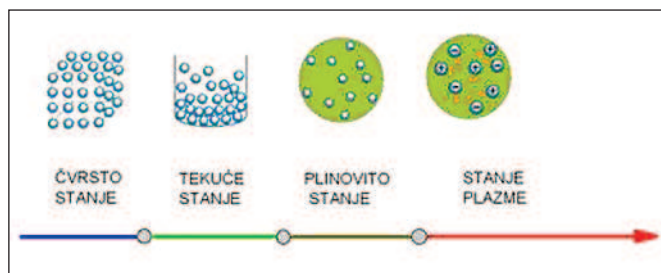


Slika 4. Plazma plamenik

Šta je plazma?

Plazma je četvrto agregatno stanje, stanje visoko jonizovanog gasa.

Argonska plazma je elektroprovodljiv, visokojonizovan gas koji sadrži veliku količinu jona i elektrona argona.



Slika 5. Plazma - četvrto agregatno stanje

Zašto baš Ar ?

Ar je prirodni, plemeniti, hemijski inertan gas koji ne reaguje sa jonima iz uzorka, ima visoku energiju jonizacije,

emituje jednostavne spektre i može da eksitira većinu elemenata periodnog sistema.

Plazma se uključuje kratkotrajnim uključivanjem Teslinog pražnjenja a zatim dok prolazi kroz polje oko indukcionog kalema koje proizvodi RF generator. Uloga polja jeste da jonizuje gas i da održava plazmu stabilnom.

Atomi i elektroni iz uzorka u sudaru sa jonima i elektronima plazme primaju energiju i prelaze u pobuđeno stanje. Vraćanjem u osnovno stanje emituju energiju u obliku karakterističnog linijskog spektra. Temperatura plazme varira od 5-8000 K pa se zbog visokih temperatura u ICP izvorima dobijaju veoma složeni spektri koji se potom analiziraju pomoću spektrometra. (13)

Spektrometar: Echelle polihromator

Spektrometar je optički sistem visoke rezolucije koji pomoću disperzionog elementa (difrakcione rešetke i kvarcne prizme) propušta svetlosni zrak na nekoliko talasnih dužina istovremeno. Kako se sastoji od velikog broja izlaznih razreza ovaj sistem ima veliku moć rezolucije, što je posebna prednost u odnosu na atomsku apsorpcionu gde se koriste izvori zračenja specifični za dati element i gde se širina razreza monohromatora podešava tako da propusti samo jednu, rezonantnu talasnu dužinu. Takođe, echelle sablon je zasnovan na dvodimenzionalnoj separaciji emitovane svetlosti: u UV i VIS delu spektra.

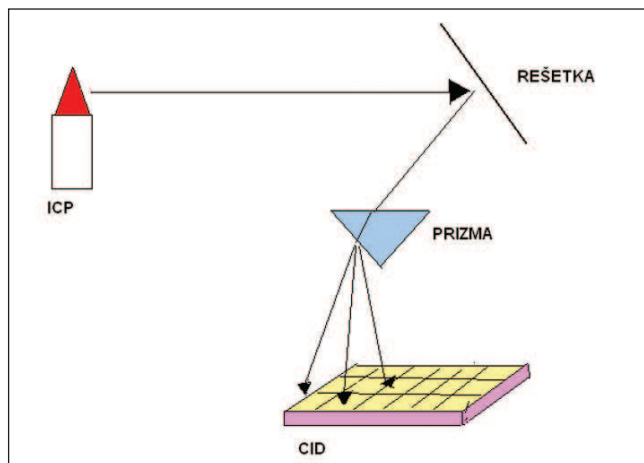
CID (Charge Injection Device) Detektor

Registruje stvorenu fotostruju čija je jačina srazmerna intenzitetu emitovane svetlosti odnosno koncentraciji elementa u uzorku. (14)

Kvantitativna analiza

Kvantitativna analiza se vrši pomoću *metode kalibracione krive* gde se nepoznata koncentracija elementa izračunava poređenjem intenziteta emisije ispitivanog uzorka sa standardima. Izbor radne talasne dužine zavisi od prirode matriksa uzorka i mogućih interferencija na izabranim talasnim dužinama.

Zbog minimiziranja uticaja matriksa i veće osetljivosti metode kada je reč o uzorcima koji sadrže jako niske koncentracije elemenata koje su ispod limita kvantifikacije



Slika 6. Disperzija i detekcija zračenja

metode kalibracione krive neophodno je kreirati metodu dodatog standarda. Pomoću ove metode nepoznata koncentracija elementa se izračunava na osnovu nagiba prave koja koreliše merene intenzitete sa koncentracijama dodatim u uzorke.

ZAKLJUČAK

Zbog svoje velike osetljivosti i mogućnosti određivanja tragova metala u različitim uzorcima ova metoda je našla široku primenu u svim granama toksikologije:

- u profesionalnoj toksikologiji za ranu dijagnostiku profesionalnih bolesti
- u kliničkoj toksikologiji za dijagnozu bolesti i praćenje efekata terapije
- u sudskoj toksikologiji gde naročito treba biti oprezan jer pozitivni nalaz u lešnom materijalu nije siguran dokaz trovanja pošto su brojni metali normalni sastojak biljnog, životinjskog sveta, pa čak i čovečijeg organizma
- u ekotoksikologiji odnosno toksikologiji životne sredine gde se teški metali određuju u vodama, rekama, pijaćoj vodi, vazduhu, nafti...
- u toksikologiji životnih namirnica u namirnicama, voću, povrću, vitaminama i predmetima za opštu upotrebu.

Abstract

Toxicity of metals is very important in terms of professional toxicology. The heavy metals poisons are primarily related to chronic poisoning that occurs with exposure to fumes or particles of metals through the various industrial processes in the workplace. The toxicology laboratory play an important role in the assessment of exposure to metals whose main task is biological monitoring to metals and qualitative and quantitative analysis of heavy metals in biological material using appropriate analytical techniques. Blood and urine are the most used samples for the determination of heavy metals.

Determination of heavy metals in biological samples requires skills and experience of analysts and primarily good equipment laboratories. Atomic absorption spectrometry is one of the most used method for determination of a metal concentration in biological samples. However, inductively coupled plasma/optical emission spectrometry (ICP/OES) like a more effective method becomes more important.

The paper describes samples preparation with microwave digestion and inductively coupled plasma/optical emission spectrometry like an analytical technique for determination of heavy metals in biological samples.

LITERATURA

1. Hogan M. Heavy metal. The Encyclopedia of Earth, 2010. E. Monosson & C. Cleveland. Washington, D.C
2. Duffus JH, "Heavy metals" - a meaningless term? (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, 2002; 74: 793-807
3. Majkić N, Medicinska biohemija, 2006, Beograd
4. Scragg AH, Environmental Biotechnology, 2006, Oxford University, Press, UK, 2nd edition
5. Jovanović J, Doktorska disertacija: Praćenje efekata hronične intoksikacije teškim metalima (Cd, Pb, Cu) i protektivne uloge suplemenata S-donor liganada preko aktivnosti endonukleaza i sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, 2012, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu
6. Vidaković A, Profesionalne bolesti izazvane hemijskim agensima, Medicina rada II, 1997:647-739
7. Bulat Z, Mehanizmi toksičnosti otrova, Toksikologija sa analitikom, 2010/11, Beograd
8. Robert MP, Technical considerations for sampling and sample preparation of biomedical samples for trace element analysis, J. Res. Natl. Bur. Stand., 1986;91(2): 51-57
9. Matović V, Toksikologija metala, 2010, Skripta Farmaceutskog fakulteta
10. Kerkez Đ, Novi trendovi u pripremi uzoraka za analizu neorganskih parametara, 2011, Water Workshop
11. Cornelis B, Heinzow B, Herber RFM, Christensen M, Paulsen M, Sabbion E, Templeton M, Thomassen Y, Vahter M, Vesterberg O, Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine, (Technical Report), 1995, Pure & Appl. Chem., 67: 1575-1608
12. Manning TJ, Grow WR, Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry, 1997, Journals Spinger-Verlag New York,
13. Montaser A, Golightly DW, Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry; 1988, VCH Publishers: New York,
14. Ingel JD, Crouch SR, Spectrochemical Analysis; Prentice Hall: New Jersey, 1988