

Stanovenie stopových prvkov v krvnom sére

RNDr. Štefan Hauks

Medirex, a. s., člen MEDIREX GROUP, Košice

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť a zvalidovať pracovné postupy pre metódy na stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére pre rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie. Validované analytické metódy sú prevádzkovo realizovateľné s presnosťou (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť) do 5 % a správnosťou (výťažnosť) v intervale 85 – 115 % v celom kalibračnom rozsahu.

Kľúčové slová: elektrotermická atomizácia, teplotný a časový program, kalibračná krivka, presnosť, správnosť.

Determination of trace elements in serum

The aim of this work was to develop and validate a method of operating procedures for the determination of trace elements copper and zinc in serum for routine diagnostic in laboratory of clinical biochemistry. Validated analytical methods are operationally feasible with precision (repeatability, reproducibility) up to 5% and an accuracy (recovery) in the interval of 85-115% at the all calibration screen.

Key words: electrothermal atomization, temperature and timing, calibration curve, precision, accuracy.

Newslab, 2015; roč. 2(1): 24–27

Úvod

Väčšina stopových kovov sú esenciálne výživové prvky pre človeka, ale aj pre zvieratá, patria sem selén, zinok, meď, kobalt, mangán, molybdén, chróm, nikel a železo. Medzi významné funkcie stopových prvkov patrí determinácia, mobilizácia a konštantná väzba na biologické ligandy. Niektoré sú využité pri elektrických impulzoch pozdĺž nervových vlákien, iné sú stabilnou súčasťou komplexov s enzýmami alebo nukleovými kyselinami, prípadne ligandmi. V biologických procesoch sa uplatňujú ako spúšťače, aktivátory, ako aj kontrolóry celej škály reakcií. Iná skupina stopových prvkov vytvára pevný statický komplex a stávajú sa integrálnou časťou proteínov a enzýmov. Množstvo biologických systémov je závislé od denného príjmu stopových prvkov (meď, zinok, mangán). Oxidatívny stres je významným faktorom v infekčnom procese, ak sú v deficite mikroprvky (1). Stopové prvky a niektoré ich zlúčeniny majú antivírusovú aktivitu prostredníctvom inaktivácie celulórných proteínov. Teda stopové prvky zohrávajú významnú úlohu pri chorobách vyvolaných vírusmi (2 – 5). Imunitný systém predstavuje významnú zložku organizmu integrujúceho fyziologické funkcie, ktoré eliminujú cudzorodé zložky, infekčné mikroby, ako aj odumreté vlastné bunky. Tieto mechanizmy sú zabezpečené prostredníctvom nešpecifickej (vrodenej) alebo špecifickej (získanej) imunity so zložitými procesmi, ktoré sú koordinované celým radom buniek (lymfocyty, makrofágy, antigén prezentujúce bunky) a molekulárnych látok (cytokínov, imunoglobulínov, imunohormónov). Makrofágy predstavujú bunky prvej línie pri obranných procesoch vyznačujúce sa fagocytárnou, cytotoxickou a sekretorickou aktivitou. Mikroelementy ako zinok, selén, železo, meď a iné významne ovplyvňujú jednotlivé zložky nešpecifickej imunity. Vybrané mikroelementy zohrávajú dôležitú úlohu v ochrane buniek pred poškodením vyvolaným oxidantmi. Fagocyty produkujúce reaktívne oxidanty sa zúčastňujú na ochrane proti infekčným agens. Nedostatok zinku znižuje funkciu NK buniek, pričom prídavok tohto prvku výrazne zlepší aktivitu NK buniek. Poznatky o špecifickom účinku mikroelementov na funkciu neutrofilov sú nejasné (6).

Stopové prvky sa v tkanivách nachádzajú v koncentrácii **nižšej ako 50 ppm (< 50 x 10⁻⁶ g/g)**. Ich potrebný denný príjem je menší než 50 mg denne. Hlavné prvky – Fe, I, Cu, Zn, Co, Cr, Mo, Se, F, Mn, Ni, As, Sn, Si, V:

- sú esenciálne – telo si ich nedokáže samo vytvoriť a sú závislé od ich príjmu potravou;
- ich nedostatok alebo nadbytok spôsobuje zdravotné problémy.

Hlavnou biochemickou úlohou stopových prvkov je katalytické pôsobenie v enzýmoch a moduláciách enzýmových aktivít. Taktiež majú veľký význam v ochrane pred oxidačným stresom (SOD potrebuje Mn, Cu a Zn).

Pri reakcii akútnej fázy IL-1 a IL-6 spôsobí redistribúciu stopových prvkov (pokles Zn a Fe v sére).

Toxicita – u zdravých jedincov je veľká tolerancia v koncentračnom rozmedzí. Pri renálnych poruchách sa môže horšie vylučovať Se a Cr, Cu a Mn zasa pri chorobách pečene. Stanovujú sa metódou atómovej absorpčnej spektrometrie.

Meď (Cu)

Meď je súčasť aktívneho centra mnohých (predovšetkým oxidoredukčných) enzýmov. Súvisí to so schopnosťou medi prijať alebo odovzdať elektrón (Cu⁺/Cu²⁺). Príkladom je cytochróm – c oxidáza, posledný článok prenosu elektrónov v terminálnej oxidácii. Ďalší enzým, lyzyoxidáza, má význam v syntéze elastínu a kolagénu.

V ľudskom tele je 100 – 150 mg medi. Z gastrointestinálneho traktu sa meď dostane do krvi, kde sa viaže na albumín, aminokyseliny a transcupreín. Tieto transportné formy sa dostanú do pečene, kde sa meď zabuduje do ceruloplazmínu, ktorý je hlavným transportným proteínom medi.

Odporučená denná dávka je 2 – 3 mg. Nutričný nedostatok medi sa v praxi nevyskytuje, v experimente vedie k anémii.

Zinok (Zn)

Zinok je súčasťou aktívneho centra viac ako 300 enzýmov a pre iné bielkoviny je potrebný ako aktivátor alebo stabilizátor štruktúry. Zinok je esenciálny prvok pri syntéze nukleových kyselín a pre funkciu génov.

Tabuľka 1. Pracovné podmienky na stanovenie Cu a Zn

Parameter	Cu	Zn
Vlnová dĺžka (nm)	324,8	213,9
Štrbina (nm)	0,5	1,0
Korektor pozadia	bez korekcie	bez korekcie
Zdroj žiarenia	katódová výbojka	katódová výbojka
Prúd lampy (mA)	4,0	5,0

Zvláštnosť zinku v porovnaní s inými stopovými prvkami spočíva v tom, že nie je veľmi aktívny v oxidačno-redukčných reakciách (nekatalyzuje vznik a premenu bioreaktívnych foriem kyseliny). Je schopný vytvoriť 4 koordinačné väzby s atómami síry v cysteínoch alebo s dusíkmi histidínov.

Zinok je prvok, ktorý má vzťah k vnímavosti k niektorým druhom zhubných nádorov. Hrá totiž významnú rolu v tvorbe T-lymfocytov, ktoré majú schopnosť likvidovať nádorové bunky a k zhoršenej funkcii imunitného systému.

Cieľom tejto práce bolo vyvinúť a zvalidovať pracovný postup pre metódu na stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére pre rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie.

Experimentálna časť

Použitie prístroje a zariadenia

Na stanovenie stopových prvkov bol použitý atómový absorpčný spektrometer firmy Agilent Technologies 240Z AA (Austrália) s elektrotermickou atomizáciou GTA 120 (Graphite Tube Atomizer) v spojení s automatickým podávačom vzoriek PSD 120 (Programmable Sample Dispenser). Ako ochranný plyn bol použitý argón (0,3 l/min). Merania boli analyzované na pyrolytických grafitových kvetách bez platformy firmy Agilent Technologies (Nemecko). Dávkovaný objem vzoriek bol 20 µl pre meď a 10 µl pre zinok. Pracovné podmienky na stanovenie oboch stopových prvkov sú uvedené v tabuľke 1 a teplotné programy sú uvedené v tabuľke 2.

Chemikálie a roztoky

Kyselina dusičná TraceSELECT® (Sigma-Aldrich Co., USA); Triton® X-100 p. a. (Merck, Nemecko), voda TraceSELECT® (Sigma-Aldrich Co., USA), lyofilizovaný sérový kalibrátor ClinCal® – Serum Calibrator šarža 243 Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko), štandardný referenčný materiál Seronorm™ Trace Elements Serum šarža 0903106 (SERO AS, Nórsko), kontrolné lyofilizované krvné sérum ClinChek® s dvoma hladinami kontrol (Level I, II) šarža 347 (Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko).

Pracovné postupy

Príprava sérového kalibrátora, kontrolného krvného séra a štandardného referenčného materiálu

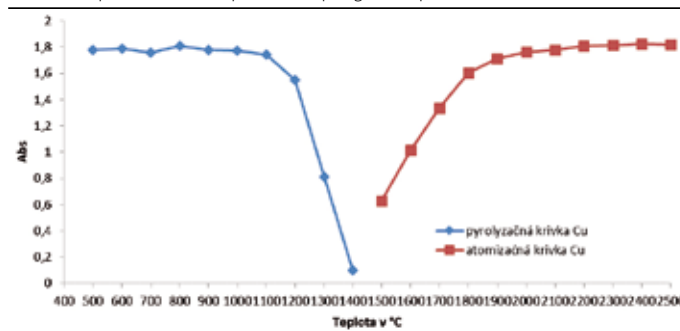
K lyofilizovanému sérovému kalibrátoru, kontrolnému krvnému séru a štandardnému referenčnému materiálu sme pridali 3 ml deionizovanej vody, ktoré sme miešali krúživým pohybom, nechali sme stáť 30 minút pri laboratórnej teplote. Po 30 minútach bolo možné sérový kalibrátor, kontrolné sérum a štandardný referenčný materiál použiť na stanovenie.

Tabuľka 2. Teplotný a časový program na stanovenie Cu a Zn

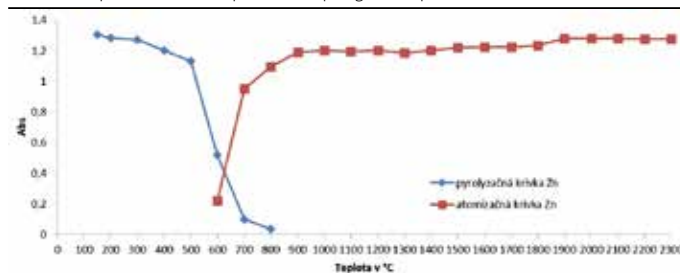
Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Prietok argónu (l/min)
Sušenie	1 85	5	0,3
	2 95	40	0,3
	3 120	10	0,3
Pyrolýza	4 300 (Zn) 1 100 (Cu)	5	0,3
	5 300 (Zn) 1 100 (Cu)	2	0,3
	6 300 (Zn) 1 100 (Cu)	2	0
Atomizácia	7 1 900 (Zn) 2 200 (Cu)	1	0*
	8 1 900 (Zn) 2 200 (Cu)	2	0*
Čistenie	9 2 000 (Zn) 2 300 (Cu)	2	0,3

* – zaznamenávanie signálu

Graf 1. Optimalizácia teplotného programu pre Cu

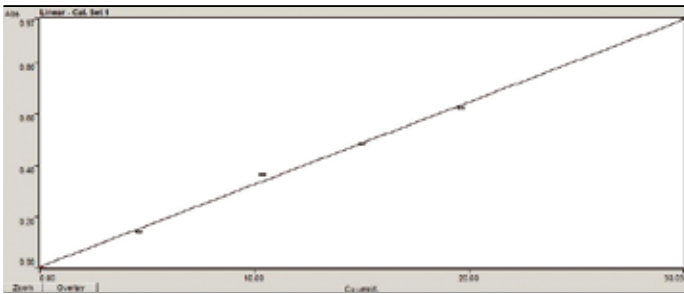
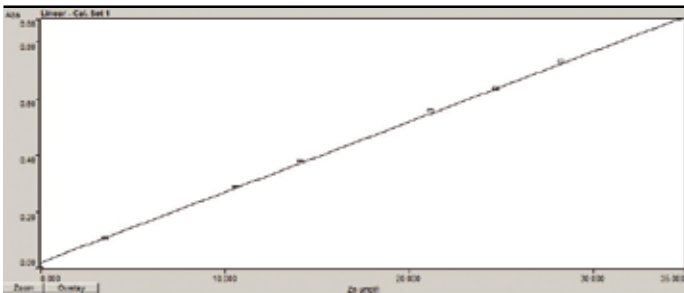
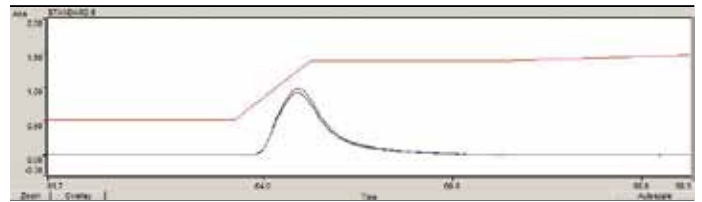
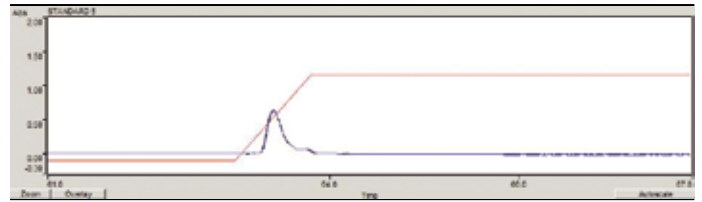


Graf 2. Optimalizácia teplotného programu pre Zn



Priame stanovenie

Štandardný referenčný materiál a kontrolné krvné sérum na priame stanovenie boli riedené 20 x 0,2 % (v/v) Tritonom X-100 a 1 % HNO₃ a sérový kalibrátor bol riedený 20 x 0,2 % HNO₃ v prípade medi a v prípade zinku bol štandardný referenčný materiál a kontrolné krvné sérum riedené 100 x 0,2 % (v/v) Tritonom X-100 a 1 % HNO₃ a sérový kalibrátor 100 x 0,2 % HNO₃ priamo v 2 ml autosamplerových nádobkách, z ktorých boli následne dávkované do grafitovej kvety (20 µl nastavenie medi a 10 µl na stanovenie zinku). Na stanovenie obsahu Cu a Zn v sére sa použila metóda kalibračnej krivky, na vyhodnotenie sa použila výška signálu.

Obrázok 1. Kalibračná krivka Cu**Obrázok 3.** Kalibračná krivka Zn**Obrázok 2.** Grafický záznam signálu Cu v čase (2 replikáty)**Obrázok 4.** Grafický záznam signálu Zn v čase (2 replikáty)

Cu bol 0,9992 a kalibračnej krivky Zn bol 0,9995. Citlivosť definovaná ako koncentrácia, ktorá je potrebná na dosiahnutie signálu 0,0044 AU. s. (tzv. charakteristická hmotnosť), bola 12,7 pg pre Cu a 16,3 pg pre Zn.

Výsledky a diskusia

Optimalizácia teplotného programu

Dôležitým krokom pri stanovení stopových prvkov technikou ETAAS je optimalizácia teploty a času v teplotnom programe. K tejto optimalizácii nám poslúžili krivky termického rozkladu (pyrolýzy) a krivky atomizácie pre meď a zinok (graf 1 a 2). Z tejto optimalizácie sme stanovili pre meď teplotu pyrolýzy na 1 100 °C a teplotu atomizácie na 2 200 °C a v prípade zinku bola stanovená teplota pyrolýzy 300 °C a teplota atomizácie 1 900 °C.

Ďalším dôležitým krokom bolo použitie Tritonu X-100 na riedenie, aby sme dosiahli reprodukovateľné sušenie všetkých analyzovaných vzoriek. V tabuľke 2 sú uvedené teplotné a časové programy na stanovenie medi a zinku.

Na obrázku 1 a 3 sú namerané kalibračné krivky pre Cu a Zn. Na obrázku 2 a 4 sú znázornené grafické záznamy signálu Cu a Zn pre dva replikáty.

Linearita a citlivosť

Kalibračné grafy boli lineárne pre celý koncentračný rozsah 5 – 30 µmol/l pre Cu a 4 – 35 µmol/l pre Zn, korelačný koeficient kalibračnej krivky

Správnosť

Správnosť navrhnutého postupu bola overená analýzou štandardného referenčného materiálu krvného séra (Seronorm™ Trace Elements Serum šarža 0903106) a ďalším kontrolným materiálom krvné sérum ClinChek® s dvoma hladinami kontrol (Level I, II) šarža 347 (Recipe® Chemical + Instruments, Nemecko). Počet meraní nasledujúcich za sebou bol rovný 10. Kompletné vyhodnotenie výsledkov kontrol je uvedené v tabuľke 3.

Presnosť

Presnosť bola vypočítaná z nameraných hodnôt pre štandardný referenčný materiál krvného séra Seronorm™ a kontrolný materiál krvné sérum ClinChek®. Presnosť sme vyjadrili opakovateľnosťou v počte 10 za sebou nasledujúcich meraní a reprodukovateľnosťou v počte 15 meraní získaných za niekoľko dní (tabuľka 3).

Medza detekcie (LOD) a stanovenia (LOQ)

Na určenie medzí bolo použité 3σ kritérium, ktorým je určená medza detekcie analytu ako trojnásobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOD). Medza stanovenia bola vypočítaná ako desaťnásobok smerodajnej odchýlky šumového signálu (LOQ). V prípade Cu bola medza detekcie 0,18 µmol/l a medza stanovenia 0,61 µmol/l, v prípade Zn bola medza detekcie 0,16 µmol/l a medza stanovenia 0,53 µmol/l.

Tabuľka 3.

	Presnosť – opakovateľnosťou RSD (%)	Presnosť – reprodukovateľnosťou RSD (%)	Správnosť – priem. hodnota ± SD		Správnosť – výťažnosťou (%)
			certifikovaná	nameraná	
Seronorm™ (šarža 0903106)	0,99 (Cu)	1,61	29,6 ± 1,4	29,5 ± 0,3	99,7
	1,97 (Zn)	1,22	26,6 ± 1,3	25,9 ± 0,5	97,5
ClinChek® – Level I (šarža 347)	1,41 (Cu)	2,51	12,6 ± 1,9	12,7 ± 0,2	101
	1,86 (Zn)	2,37	20,2 ± 3,0	20,3 ± 0,4	100,5
ClinChek® – Level II (šarža 347)	1,23 (Cu)	2,46	21,1 ± 3,1	21,3 ± 0,3	100,9
	2,35 (Zn)	2,91	31,2 ± 4,7	30,8 ± 0,7	98,7

Záver

V tejto práci bola vypracovaná analytická metóda na kvantitatívne stanovenie stopových prvkov meď a zinok v krvnom sére na rutinnú diagnostiku v laboratóriu klinickej biochémie. Validovaná analytická metóda je prevádzkovo realizovateľná s presnosťou (opakovateľnosť, reprodukovateľnosť) do 5 % a správnosťou (výťažnosť) v intervale 85 – 115 % v celom kalibračnom rozsahu.

Tento článok vznikol vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt: Výskumné centrum moderných technológií monitorovania a diagnostiky ochorení ohrozujúcich verejné zdravie, ITMS 26220220197, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr. (Suppl.)*. 2001;85:67–74.
2. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001;52:225–239.
3. Sherrington CA, Olynyk JK. Iron as a cofactor in chronic hepatitis C infection. *Liver*. 2002;22:187–189.
4. Semba RD. Iron-deficiency anemia and the cycle of poverty among human immunodeficiency virus-infected women in the inner city. *Clin. Infect. Dis. (Suppl.)*. 2003;37:105–111.
5. Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection and immunity: An overview. *Nutr. Rev.* 2002;60:40–45.
6. Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. Micronutrients and innate immunity. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*. 2000;182:5–10.
7. Rácz O, Šipulová A. Metabolizmus stopových prvkov. 19–24.



RNDr. Štefan Hauks

Medirex, a. s., člen **MEDIREX GROUP**
Magnezitárska 2/C, 040 13 Košice
stefan.hauks@medirex.sk