

DETERMINATION OF SELENIUM IN HUMAN BLOOD USING ATOMIC FLUORESCENCE SPECTROMETRY

Renata WIETECZA¹, Paweł KOŚCIELNIAK^{1,2}, Teresa LECH²,
Maciej RYMANOWSKI¹

¹ Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow

² Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: In the present publication, a method developed for the determination of selenium in human blood is described. A blood sample was completely digested by nitric acid with use of a microwave oven. The analytical signal for selenium was measured by means of atomic fluorescence spectroscopy with the hydride generation system (AFS-HG). The method appeared to be typified by a detection limit of ca. $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ and precision of ca. 1.0% (RSD). The accuracy of the analytical results was evaluated at a level of ca. 2% (RE). It was verified with the use of reference materials of whole human blood and human serum. The procedure is very simple, fast and reliable, hence it is suggested to be applied to routine clinical and toxicological analyses.

KEY WORDS: Selenium; Analysis of blood; Atomic fluorescence spectrometry; Hydride generation; Microwave digestion.

Problems of Forensic Sciences, vol. LII, 2002, 21–36

Received 25 October 2002; accepted 30 December 2002

INTRODUCTION

Selenium has aroused increasing interest in recent years – it has become the subject of special attention for persons connected with various branches of industry and environmental protection, and also persons connected with medicine, biochemistry and toxicology.

For many years selenium was considered solely as an element that was toxic and carcinogenic for people and animals. Today, it is known to be necessary for the normal functioning of various living organisms: bacteria, plants, animals and people [2], in spite of its toxicity. In the literature one can find many examples of therapeutic applications of selenium, e.g. as a treatment for atherosclerosis, in cases of cardiac anoxia and diseases which are characterised by development of inflammation and depression. Moreover, selenium is an inactivator of toxic heavy metals, such as mercury, cadmium or silver [15] and organic compounds liberated during infections, injuries and stresses. Selenium and its compounds reveal antibacterial and fungicidal activity, which is made use of in the production of cosmetics for skin and

hair. Furthermore, it neutralises the activity of aflatoxins, which are known for their carcinogenic influence on the organism [10,14,19].

In contrast to other bio-elements, selenium is characterised by a narrow range between its therapeutic and toxic doses. For this reason it is named “the most toxic element necessary for life” [1]. Because selenium is used in industry, its compounds can pass through to the environment and constitute a danger to health and life. The most frequent cases of poisonings occur among people working in copper smelting [9]. Cases of suicide by the consumption of technical preparations containing large amounts of selenium compounds are also known [11]. Moreover, incorrect supplementation by selenium preparations may be the cause of chronic poisonings. The toxic dose for man is 700 µg per day [1].

Therefore, a reliable determination of selenium in various tissues is very important from a clinical and toxicological point of view.

Analysis of selenium in biological materials is a relatively difficult problem, which has not to this day been entirely satisfactorily resolved. The complete analytical procedure of selenium determination in this type of material consists in two principle steps: mineralisation of the sample and measurement of analytical signals using a suitable instrument. The analytical chemist encounters significant problems at both stages.

The main problems of the mineralisation stage are the low speed of this process and the risk of occurrence of selenium losses from a sample because of its volatility. Both these effects are especially important in the case of “wet” mineralisation in the open system – a universally used method. Various mixtures of acids (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 , HF etc.) and peroxide (H_2O_2) are usually used for this aim, and the process itself is performed under normal air pressure and temperature. The above difficulties can to a large extent be avoided by applying closed-systems that use microwave energy, which enable total decomposition of the sample matrix [12].

Various instrumental methods are applied to the measuring of analytical signals of selenium. The oldest one, commonly used to this day, is spectrophotometry. In this case, quantitative determination of selenium is usually realised by measurement of absorbance of coloured complex combinations of selenium (IV) with aromatic o-diamines, i.e. piazoselenoles. The detection limit (0.003–0.3 mg l⁻¹) of the spectrophotometric method is often insufficient for determination of trace amounts of selenium in biological material [7]. A more sensitive method is spectrofluorometry, where measurement of molecular fluorescence at a suitable wavelength is performed after a preliminary reduction of selenium and a complexing reaction. However, the photo-chemical reaction used in this method requires special conditions (a dark room or yellow light). Moreover, both methods are quite complicated from the chemical point of view, which is a cause of the relatively large ran-

dom analytical errors [7, 17]. These drawbacks are also characteristic for the voltamperometric method of selenium determination [4].

Other analytical methods, such as activation analysis and X-ray fluorescence are only used sporadically for determination of selenium, because, above all, of the large costs of equipment and of the analysis performed [8].

The most popular method of selenium determination – beside spectrophotometry – is atomic absorption spectrometry coupled with hydride generation (AAS-HG). It is characterised by high speed and simplicity of analysis, as well as a low detection limit and good precision of analytical results. A drawback of this method, which is especially significant when samples with a complex matrix are analysed (such as biological materials), is the problem of background, which cannot always be corrected to a sufficient degree.

There has been a noticeable increase in interest in atomic fluorescence spectrometry (AFS) in recent years. This method coupled with the technique of hydride generation (HG) is used for determination of elements that are important from the toxicological point of view, such as arsenic, mercury, lead, and selenium as well. The AFS-HG method is characterised by advantages such as good selectivity, a wide linearity range, a very high sensitivity, a low noise level which enables achievement of very low detection limits, and also relatively simple and cheap equipment requirements [6, 16].

In the presented paper, an analytical procedure which consists of a combination of mineralisation in a micro-wave system with a process of selenium hydride generation and measurement of the analytical signal by the AFS method was applied to selenium determination. This method was tested on samples of human blood. Research focused mainly on optimising conditions of mineralisation of blood samples and on defining analytical parameters of the elaborated method. The accuracy of the method was verified by analysis of reference human blood samples.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The following reagents were used during analysis: a standard solution of selenium of 1 mg ml^{-1} Se concentration (analytically pure, Merck), conc. HNO_3 (analytically pure, Merck), conc. HCl (analytically pure, POCh), conc. H_3PO_4 (analytically pure, POCh), conc. HCOOH (analytically pure, POCh), 30% H_2O_2 (analytically pure, POCh), 98% NaBH_4 (analytically pure, Sigma-Aldrich Chemie), 0.5% NaOH (analytically pure, Zakłady Chemiczne Oświęcim). Deionised water (conductance approx. $1 \mu\text{S cm}^{-1}$) was used for preparation of solutions.

Samples

Samples of human blood (two series, 50 ml each) taken from volunteer (unpaid) blood donors from the Regional Centre of Blood Donation and Blood Health Care, Cracow, were analysed. The blood samples were stored in special vials sputtered with anticoagulant (K_2EDTA) at $-20^\circ C$ before analysis. Two reference materials were also analysed: a sample of whole human blood "Seronom Trace Elements" (LOT 404109, SERO AS, Billingstad) as a lyophilic solution and a sample of blood serum obtained from the Department of Bromatology, Collegium Medicum, Jagiellonian University. The content of the second sample was determined as part of interlaboratory research entitled "Interlaboratory comparison for copper-zinc-selenium in blood serum" co-ordinated by the French Society for Clinical Biology, Vandœuvre Les Nancy.

Analytical equipment

A Mars 5X (CEM, USA) 12-position microwave mineraliser was used for sample preparations. The process of mineralisation was performed in a high pressure teflon vessel (type XP-1500) with simultaneous temperature and pressure control. A double-channel atomic fluorescence spectrometer coupled with a system of hydride generation (AFS-230 Haiguang Co., China) was applied to the measurement of the analytical signal. A selenium lamp with a hollow cathode (current – 100 mA) as a source of radiation and a photo-multiplier (working at 300 V) as a detector were installed in the spectrometer.

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary research consisted in determination of optimal conditions for the preparation of blood samples for analysis. To this end, the concentration of selenium was determined in blood samples taken from the same set, which were subjected to various mineralisation conditions. Establishment of these conditions was partially based on data gathered from scientific papers [8, 9]. The composition of the mineralised mixture and the method of sample treatment after mineralisation are presented in Table I.

TABLE I. RESULTS OF SELENIUM DETERMINATION IN BLOOD SAMPLES OBTAINED UNDER VARIOUS CONDITIONS OF SAMPLE MINERALISATION AND PREPARATION FOR ANALYSIS

Analytical series	Reagents used for mineralisation	Reagent used after mineralisation	Concentration of selenium [$\mu\text{g l}^{-1}$]
I	3.0 ml conc. HNO_3 + 0.5 ml 30% H_2O_2	12.5 ml 6 M HCl	27.3 \pm 1.2
II	6.0 ml conc. HNO_3 + 1.5 ml 30% H_2O_2	12.5 ml 6 M HCl	29.0 \pm 2.6
III	7.0 ml conc. HNO_3	12.5 ml 6 M HCl	56.6 \pm 1.2
IV	7.0 ml conc. HNO_3	12.5 ml conc. HCl*	40.7 \pm 0.8
V	1.5 ml conc. HNO_3 + 1.0 ml conc. H_3PO_4	1.5 ml 30% H_2O_2 + 2 ml conc. HCOOH + 2 ml conc. HCl**	41.0 \pm 2.3

* The mineralised sample was heated for 10 min at 220°C.

** Peroxide was added to the mineralised sample and heated for 25 min at 220°C, formic acid was added after cooling and the sample was heated for 2 min at 120°C, at the end conc. hydrochloric acid was added and the sample was heated for 20 min at 120°C.

Three blood samples and a blind sample (containing reagents) of volume about 0.5 ml were used in each series for mineralisation. Each sample was transferred into a teflon vessel and an appropriate volume of mineralisation mixture was added. After that the process of mineralisation was carried out in three steps, differing in terms of conditions of maximum temperature and pressure: a) T = 160°C, P = 130 psi; b) T = 180°C, P = 190 psi; c) T = 200°C, P = 290 psi. Each step lasted 8 min. After cooling, the mineralised sample was exposed to hydrochloric acid (without or with addition of formic acid) with the aim of reduction of Se(VI) to Se(IV), and then it was transferred to a volumetric flask and filled up to 25 ml. The prepared solution was ready for introduction into a fluorescence spectrometer.

The generation of selenium hydride took place in a flowing system, after the sample had been introduced into a solution containing 2% sodium tetraborane and 0.5% sodium hydroxide. This solution was added at a rate of 6 ml min^{-1} to a 3 M solution of hydrochloric acid serving as a carrier, and was transported to a separator at a rate of 11 ml min^{-1} . After that it was transported to the argon-hydrogenate flame (temperature: 200°C) of the fluorescence spectrometer in a stream of argon at 800 ml min^{-1} .

A series of standard solutions containing an analyte at concentrations from 0 to 3.48 $\mu\text{g l}^{-1}$ was prepared for calibration purposes. These solutions were prepared by dilution of a basic standard solution up to a uniform volume by 6 M hydrochloric acid. Results of selenium determination in blood samples are presented in Table I.

In further research, analysis of blood samples was performed in conditions which were established in series III of determinations (see Table I).

This choice was mainly governed by the value of selenium determined in samples, which was significantly higher in this series of determinations. It was therefore supposed that the possible loss of selenium caused by the sample mineralisation process was the smallest under these conditions. Moreover, it is also of great significance that the selected conditions of mineralisation were very simple: the use of only one reagent in this case, and preparation of the mineralised sample for measurement did not require heating, but only the addition of hydrochloric acid at a suitable concentration. Therefore, the mineralisation procedure is not only relatively cheap, but also carries a minimum risk of contamination of sample by reagents added.

The determined limit of selenium detection was about $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ under the selected analytical conditions and the precision (encompassing the reproducibility of the whole analytical procedure) was at the 1% level (RSD).

Two calibration methods were applied to selenium determination in a blood sample with the aim of studying the interference effect: the standard-series method and the standard addition method. In the case of the standard addition method, solutions were prepared in the following way: several portions of a sample were mineralised under the same conditions and then an analyte, in the form of aqueous standard solution, was added to the samples. Selenium concentrations in the added standard solutions were 0.00 ; 0.63 ; 1.25 and $1.88 \mu\text{g l}^{-1}$. The mutual location of the calibration curves created by both methods (Figure 1A) indicated the occurrence of the interference effect.

Chemical interference in the case of selenium determination in biological materials by the AAS-HG method after mineralisation by nitric (V) acid has been reported several times [3, 5, 18].

A hypothesis was put forward [5] that this effect is caused by nitrogen oxides (NO and NO_2) remaining in samples after mineralisation, which prevents reduction of Se(VI) to Se(IV) . As a consequence, the concentration of the analyte in the sample introduced into the spectrometer in the form of Se(IV) was lowered, and because this form has the highest ability to generate hydrides, the analytical signal did not correspond to the true value of selenium in the sample. One may suppose that, even though another analytical method (AFS-HG) was applied, the interference effects observed in this research can be explained in the same way.

In the scientific literature, application of chemical compounds is recommended to eliminate the influence of nitrogen oxides on selenium determination by mean of the AAS-HG [5, 13, 18]. A new approach, hitherto not applied by other authors, was tried, which would not involve complicating the analytical procedure by adding additional reagents to a sample. It was decided to decrease the concentration of nitrogen oxides in the water phase by removing them from above the samples by a strong stream of argon or nitro-

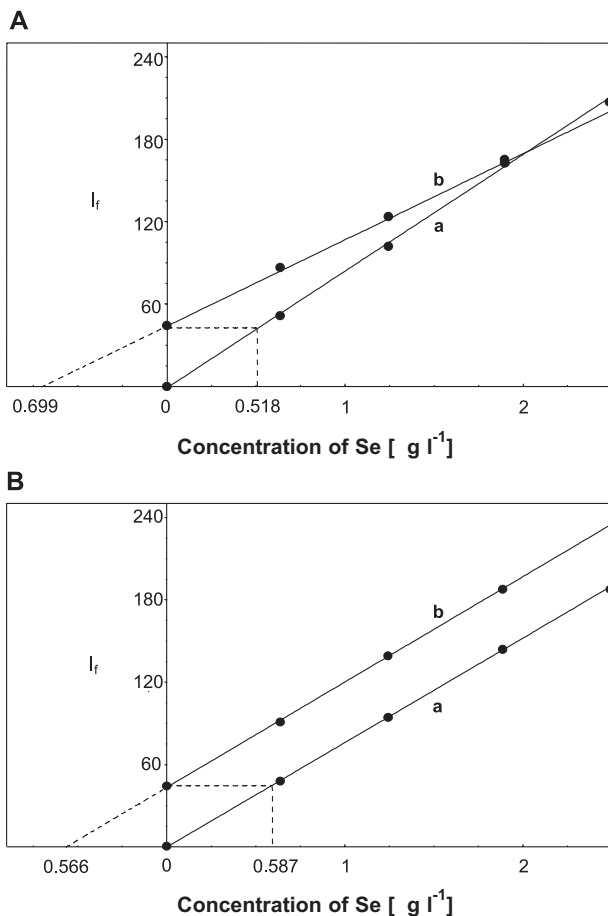


Fig. 1. Calibration curves calculated for selenium by the standard-series method (a) and by the method of standard addition (b) without the expelling of nitric oxides from headspace phase of mineralised sample (A) and after the expelling of nitric oxides in a stream of argon for five minutes (B).

gen. This procedure was performed directly after mineralisation and the cooling of samples to room temperature. Samples prepared in this additional way were analysed by application of two calibration methods. The location of calculated calibration curves (Figure 1B) indicated that the interference effect was eliminated by a suitably long action of gases (approx. 10 min).

The effectiveness of reduction of interference effects is illustrated by results of determination of selenium in a sample of whole human blood, presented in Table II. Results obtained for reference samples showed that it was possible to totally eliminate these effects. As can be seen, the applied analytical method allows determination of selenium in blood with accuracy defined by a relative error not greater than 2%.

TABLE II. RESULTS OF SELENIUM DETERMINATION IN BLOOD SAMPLES WITH UNKNOWN SELENIUM CONCENTRATION AND IN REFERENCE SAMPLES

Type of sample	Gas used for the expelling of nitric oxides	Time of expelling [min]	Concentration of Se [μl^{-1}]	
			the expected value	the obtained value
Whole blood – a sample	–	0	?	53.5
Whole blood – a sample	Ar	5	?	56.0
Whole blood – a sample	Ar	10	?	62.7
Whole blood – a sample	N ₂	10	?	64.4
Whole blood – reference material	Ar	10	79.0	80.5
Whole blood – reference material	N ₂	10	79.0	78.0
Serum – reference material	Ar	5	35.0	35.5

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The analytical method developed for determination of selenium in human blood involves several experimental steps:

- sample mineralisation in a microwave oven in nitric acid;
- expelling nitric oxides from the headspace of the mineralised sample and the transferring of the sample into hydrochloric acid;
- calibration of the determination by the standard series method using standard aqueous solutions;
- the generation of hydrides of selenium in the flow system;
- the measurement of analytical signals by means of the atomic fluorescence spectrometer.

The procedure is characterised by the following advantages:

- it is relatively fast and simple;
- it only needs several reagents, therefore it is relatively cheap and safe;
- it allows determination of selenium at concentrations occurring in human blood;
- it ensures the gaining of analytical results with very good precision and accuracy.

One limitation of this procedure is the necessity of using relatively expensive specialist equipment (a microwave oven) and apparatus that is not easily available (the AFS spectrometer). The obtained results, however, show that the proposed method of selenium determination in blood samples is very competitive in relation to other methods used for the same purpose, and it can be whole-heartedly recommended for use in toxicological and clinical laboratories.

Acknowledgements:

The authors are sincerely grateful to Dr. Stanisław Walas for his valuable discussions and helpful comments concerning atomic fluorescence spectrometry.

References:

1. Andrzejak R., Groch J., Jurga M., Rola selenu w patofizjologii człowieka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 1996, t. 50, s. 293–307.
2. Barceloux G., Selenium, *Clinical Toxicology* 1999, vol. 37, pp. 145–172.
3. Brown R., Fry R., Moyers J. [et al.], Interference by volatile nitrogen oxides and transition-metal catalysis in the preconcentration of arsenic and selenium as hydrides, *Analytical Chemistry* 1981, vol. 53, pp. 1560–1566.
4. Bryce D., Izquierdo A., Luque de Castro M., Flow-injection anodic stripping voltammetry at a gold electrode for selenium(IV) determination, *Analytica Chimica Acta* 1995, vol. 308, pp. 96–101.
5. Cutter G., Elimination of nitrite interference in the determination of selenium by hydride generation, *Analytica Chimica Acta* 1983, vol. 149, pp. 391–394.
6. d'Ulivo A., Bramanti E., Lampugnani L. [et al.], Improving the analytical performance of hydride generation non-dispersive atomic fluorescence spectrometry. Combined effect of additives and optical filters, *Spectrochimica Acta. Part B* 2001, vol. 56, pp. 1893–1907.
7. Gawłowska A., Masłowska J., Spektralne metody oznaczania śladowych ilości selenu w wodach naturalnych oraz sokach owocowych, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 2000, t. 1, s. 91–97.
8. Jędrzejczak R., Metody oznaczania selenu i arsenu w materiale biologicznym, [w:] Arsen i selen w środowisku – problemy ekologiczne i metodyczne, Kabata-Pendias A., Szteke B. [red.], *Zeszyty Naukowe nr 8, Polska Akademia Nauk, Warszawa* 1994, s. 194–201.
9. Klewska A., Poziomy fizjologiczne selenu w materiale biologicznym, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1978, t. IV, s. 307–312.
10. Maehira G., Luyo G. A., Oshiro M., Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions, *Clinica Chimica Acta* 2002, vol. 316, pp. 137–146.
11. Matoba R., Kimura H., Uchima E. [et al.], An autopsy case of acute selenium (selenious acid) poisoning and selenium levels in human tissues, *Forensic Science International* 1986, vol. 31, pp. 87–92.
12. Matusiewicz H., Metody przygotowania próbek w analizie śladowej, [w:] Problemy jakości analizy śladowej w badaniach środowiska przyrodniczego, Kabata-Pendias A., Szteke B. [red.], *Wydawnictwo Edukacyjne Zofii Dobrowskiej, Warszawa* 1998.
13. Morales Flores E., Longhi Cirne da Silva L., Barin J. [et al.], Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta. Part B* 2001, vol. 56, pp. 1883–1891.

14. Navarro-Alarcon L., Lopez de la Serrana H., Perez-Valero V. [et al.], Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers, *The Science of Total Environmental* 1998, vol. 212, pp. 195–202.
15. Rayman M., The importance of selenium to human health, *The Lancet* 2000, vol. 356, pp. 233–241.
16. Segura M., Madrid Y., Camara C., Evaluation of atomic fluorescence and atomic absorption spectrometric techniques for the determination of arsenic in wine and beer by direct hydride generation sample introduction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1998, vol. 14, pp. 131–135.
17. Watkinson J., Fluorometric determination of selenium in biological material with 2,3-diaminonaphthalene, *Analytical Chemistry* 1966, vol. 38, pp. 92–97.
18. Wu C., Chen P., Yag M., Simultaneous determination of arsenic, mercury, antimony and selenium in biological materials with prior collection of gaseous products followed by neutron activation analysis, *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 1987, vol. 112, pp. 140.
19. Zachara A., Marchaluk-Wiśniewska E., Maciąg A. [et al.], Decreased selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood and increase of these parameters in malignant tissue of lung cancer patients, *Lung* 1997, vol. 175, pp. 321–332.

METODA OZNACZANIA SELENU WE KRWI LUDZKIEJ Z ZASTOSOWANIEM ATOMOWEJ SPEKTROMETRII FLUORESCENCYJNEJ

Renata WIETECZA, Paweł KOŚCIELNIAK, Teresa LECH,
Maciej RYMANOWSKI

WPROWADZENIE

Selen budzi w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie – staje się przedmiotem szczególnej uwagi nie tylko osób związanych z różnymi gałęziami przemysłu i ochroną środowiska, ale także z medycyną, biochemią i toksykologią.

Bardzo długo selen był uważany za pierwiastek wyłącznie toksyczny i rakotwórczy dla ludzi i zwierząt. Dziś wiadomo, że pomimo swej toksyczności jest on bardzo istotny dla prawidłowego funkcjonowania różnych organizmów żywych: bakterii, roślin, zwierząt i ludzi [2]. W literaturze przedmiotu znaleźć można wiele przykładów terapeutycznego zastosowania selenu, m.in. do leczenia miażdżycy czy też w przypadkach niedotlenienia mięśnia sercowego oraz chorób charakteryzujących się rozwojem stanów zapalnych i depresyjnych. Ponadto selen jest inaktywatorem toksycznych metali ciężkich, takich jak np. rtęć, kadm czy srebro [15] oraz związków organicznych uwalnianych w czasie zakażeń, urazów i stresów. Selen i jego związki wykazują działanie przeciwbakteryjne i grzybobójcze, co jest wykorzystywane w produkcji preparatów pielęgnujących skórę i włosy. Ponadto neutralizuje działanie aflatoksyn, które są znane z rakotwórczego wpływu na organizm [10, 14, 19].

W odróżnieniu od innych mikroelementów selen charakteryzuje się tym, że rozpiętość między jego dawką terapeutyczną a toksyczną jest niewielka. Z tego powodu nazywany jest „najbardziej toksycznym niezbędnym do życia pierwiastkiem” [1]. Ze względu na zastosowanie selenu w przemyśle, jego związki mogą przedostawać się do środowiska i stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia. Najczęstsze przypadki zatrucia są spotykane wśród osób pracujących przy wytopie miedzi [9]. Znane są również przypadki samobójstw w wyniku spożycia preparatów technicznych zawierających duże ilości związków selenu [11]. Ponadto często niewłaściwa suplementacja preparatami selenowymi może być przyczyną przewlekłych zatruc. Toksyczna dawka selenu dla człowieka wynosi 700 µg na dobę [1].

Kwestia wiarygodnego oznaczania selenu w różnych tkankach jest zatem bardzo ważnym zagadnieniem z klinicznego i toksykologicznego punktu widzenia.

Badania analityczne selenu w materiałach biologicznych stanowią stosunkowo trudny i do tej pory nie do końca rozwiązany problem. Na pełną procedurę analityczną oznaczania selenu w tego typu materiałach składają się dwa zasadnicze etapy: mineralizacja próbek i pomiar sygnałów analitycznych przy użyciu odpowiedniego instrumentu. Na obu tych etapach analityk napotyka spore trudności.

Głównymi problemami etapu mineralizacji jest zarówno mała szybkość tego procesu, jak i ryzyko występowania strat selenu w próbce na skutek jego dużej lotności. Z oboma tymi efektami należy się liczyć przede wszystkim w przypadku powszechnie

stosowanej mineralizacji „na mokro” w układzie otwartym. Zwykle używa się do tego celu różnych mieszanin kwasów (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 , HF i inne) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2), a sam proces prowadzi się w normalnych warunkach ciśnienia i temperatury. Powyższych trudności można w dużej mierze uniknąć, używając systemów zamkniętych z wykorzystaniem energii mikrofalowej, które umożliwiają całkowity rozkład matrycy próbki [12].

Do pomiaru sygnałów analitycznych seleniu stosuje się różne metody instrumentalne. Najstarszą z nich, powszechnie do dnia dzisiejszego wykorzystywaną, jest metoda spektrofotometryczna. W tym przypadku ilościowe oznaczanie seleniu opiera się najczęściej na pomiarze absorpcji barwnych kompleksowych połączeń seleniu (IV) z o-diaminami aromatycznymi, tzw. piazoselenolami. Granica wykrywalności metody spektrofotometrycznej wynosząca $0,003\text{--}0,3 \text{ mg l}^{-1}$ jest często niewystarczająca do oznaczania śladowych ilości seleniu w materiale biologicznym [7]. Bardziej czułą metodą jest metoda spektrofluorymetryczna, gdzie po wstępnej redukcji seleniu i reakcji kompleksowania wykonuje się pomiar fluorescencji molekularnej przy odpowiedniej długości fali. Jednak wykorzystywana w tej metodzie reakcja fotochemiczna wymaga zastosowania specjalnych warunków (ciemne pomieszczenie lub żółte światło). Obie metody są ponadto dość skomplikowane od strony chemicznej, co jest przyczyną stosunkowo dużych przypadkowych błędów analitycznych [7, 17]. Podobnymi ujemnymi cechami charakteryzuje się voltamperometryczna metoda oznaczania seleniu [4].

Inne metody analityczne, takie jak np. analiza aktywacyjna i fluorescencja rentgenowska, stosowane są do oznaczania seleniu sporadycznie ze względu – przede wszystkim – na duży koszt aparatury i samych analiz [8].

Najpowszechniej stosowaną metodą oznaczania seleniu – obok metody spektrofotometrycznej – jest metoda atomowej spektrometrii absorpcyjnej w połączeniu z generacją wodorków (AAS-HG). Charakteryzuje się ona dużą szybkością i prostotą wykonywania analiz a także stosunkowo niską granicą oznaczalności i dobrą precyzją wyników analitycznych. Ujemną stroną tej metody ujawniającą się szczególnie mocno w przypadku analiz materiałów o złożonej matrycy (a więc także materiałów biologicznych) jest problem tła, nie zawsze możliwego do skorygowania w dostatecznym stopniu.

W ostatnim czasie daje się zauważyć coraz większe zainteresowanie metodą atomowej spektrometrii fluorescencyjnej (AFS). W połączeniu z techniką generacji wodorków (HG) stosuje się ją do oznaczenia takich pierwiastków ważnych z toksykologicznego punktu widzenia, jak arsen, rtęć, ołów, a także selen. Metoda AFS-HG charakteryzuje się takimi zaletami, jak duża selektywność, szeroki zakres liniowości wskazań, bardzo wysoka czułość, niewielki poziom szumu umożliwiający osiągnięcie bardzo niskich granic wykrywalności, a także relatywnie proste i tanie wymagania aparaturowe [6, 16].

W obecnej pracy do oznaczania seleniu w materiale biologicznym zastosowano procedurę analityczną stanowiącą połączenie mineralizacji w systemie mikrofalowym z procesem generacji wodorków seleniu i pomiarem sygnału analitycznego metodą AFS. Metodę testowano na przykładzie analizy próbek krwi ludzkiej. Badania skupiały się głównie na optymalizacji warunków mineralizacji próbek krwi oraz na określeniu parametrów analitycznych opracowanej metody. Dokładność metody zweryfikowano na podstawie analizy referencyjnych próbek krwi ludzkiej.

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki

W badaniach wykorzystano następujące odczynniki: roztwór wzorcowy selenu o stężeniu 1 mg ml^{-1} Se (cz.d.a., Merck), stężony HNO_3 (cz.d.a., Merck), stężony HCl (cz.d.a., POCh), stężony H_3PO_4 (cz.d.a., POCh), stężona HCOOH (cz.d.a. POCh), 30% H_2O_2 (cz.d.a. POCh), 98% NaBH_4 (cz.d.a., Sigma-Aldrich Chemie), 0,5% NaOH (cz.d.a., Zakłady Chemiczne Oświęcim). Do przygotowania roztworów stosowano wodę dejonizowaną o przewodnictwie właściwym ok. $1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły próbki krwi ludzkiej (dwie partie po 50 ml) pochodzące od honorowych krwiodawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Krakowie. Probki krwi przechowywano do czasu analizy w specjalnych fiolkach nasypanych środkiem antykrzepliwym (K_2EDTA) w temperaturze -20°C . Analizom poddano również dwa materiały referencyjne krwi: próbkę pełnej krwi ludzkiej „Seronom Trace Elements” (LOT 404109, SERO AS, Billingstad) w postaci liofilizowanej oraz próbkę surowicy krwi otrzymanej z Zakładu Bromatologii Collegium Medicum UJ. Skład drugiej próbki wyznaczono w ramach badań międzylaboratoryjnych pn. „Interlaboratory comparisons for copper-zinc-selenium in blood serum” nadzorowanych przez French Society for Clinical Biology, Vandœuvre Les Nancy.

Aparatura

W procesie przygotowania próbek wykorzystano 12-pozycyjny mineralizator mikrofalowy Mars 5X (CEM, Stany Zjednoczone). Proces mineralizacji prowadzono w wysokociśnieniowych teflonowych naczyniach typu XP-1500 z równoczesną kontrolą temperatury i ciśnienia.

Do pomiaru sygnałów analitycznych zastosowano dwukanałowy spektrometr fluorescencji atomowej z systemem do generacji wodorków AFS-230 (Haiguang Co., Chiny). W spektrometrze zainstalowano selenową lampę z katodą wnekową (o natężeniu 100 mA) jako źródło promieniowania i fotopowielacz (pracujący pod napięciem 300 V) jako element detekcyjny.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania wstępne polegały na ustaleniu optymalnych warunków przygotowania próbek krwi do pomiaru. W tym celu przeprowadzono oznaczanie selenu w próbkach tej samej partii krwi w kilku seriach różniących się od siebie warunkami mineralizacji. Przy ustalaniu tych warunków oparto się częściowo na danych zaczerpniętych z literatury przedmiotu [8, 9]. Szczegółowy skład mieszaniny mineralizacyjnej oraz sposób traktowania próbki po mineralizacji przedstawiono w tabeli I.

W każdej serii do mineralizacji pobierano trzy próbki krwi oraz próbkę ślepą (odczynnikową) o objętości ok. 0,5 ml. Każdą próbkę przenoszono do naczynia teflonowego, dodawano odpowiednią ilość mieszaniny mineralizującej, a następnie prowadzono proces mineralizacji w trzech etapach różniących się warunkami maksymalnej temperatury i ciśnienia: a) $T = 160^\circ\text{C}$, $P = 130 \text{ psi}$; b) $T = 180^\circ\text{C}$, $P = 190 \text{ psi}$;

c) $T = 200^{\circ}\text{C}$, $P = 290$ psi. Czas trwania każdego etapu wynosił 8 min. Po ochłodzeniu mineralizat poddawano działaniu kwasu solnego (bez dodatku lub z dodatkiem kwasu mrówkowego) w celu zredukowania Se(VI) do Se(IV), a następnie przenoszono do kolby miarowej i uzupełniano do objętości 25 ml. Tak przygotowany roztwór gotowy był do wprowadzenia do spektrometru fluorescencyjnego.

Generacja wodorków selenu następowała w układzie przepływowym po wprowadzeniu próbki do roztworu zawierającego 2% tetraboran sodowy i 0,5% wodorotlenek sodu. Roztwór ten łączył się z prędkością 6 ml min^{-1} z roztworem 3 M kwasu solnego pełniącego rolę nośnika i był doprowadzany do separatora z prędkością 11 ml min^{-1} , a następnie do płomienia argonowo-wodorowego (o temperaturze 200°C) spektrometru fluorescencyjnego w strumieniu argonu z szybkością 800 ml min^{-1} .

Do celów kalibracyjnych sporządzono serię roztworów wzorcowych zawierających analit w stężeniach od 0 do $3,48\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$. Roztwory te sporządzano przez rozcieńczenie podstawowego roztworu wzorcowego 6 M roztworem kwasu solnego do jednakowej objętości. Wyniki oznaczenia selenu w badanych próbkach krwi zebrano w tabeli I.

W dalszych badaniach analizę próbek krwi wykonywano w warunkach, jakie ustalono w III serii oznaczeń (patrz tabela I). Przy wyborze kierowano się głównie wartością wyznaczonego stężenia selenu w próbkach, która w przypadku tej serii oznaczeń była zdecydowanie największa. Można było zatem sądzić, że ewentualny ubytek selenu spowodowany procesem mineralizacji próbki był w tych warunkach najmniejszy. Ponadto, istotne znaczenie ma również to, że wybrane warunki mineralizacyjne są niezwykle proste: stosuje się w tym przypadku pojedynczy odczynnik, a przygotowanie mineralizatu do pomiarów nie wymaga ogrzewania, lecz jedynie dodania kwasu solnego w odpowiednim stężeniu. Procedura mineralizacyjna jest więc nie tylko mało kosztowna, ale związana z minimalnym ryzykiem zanieczyszczenia próbki wprowadzanymi do niej odczynnikami.

W wybranych warunkach doświadczalnych wyznaczona granica oznaczalności selenu wynosiła ok. $0,1\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$, a precyzja oznaczeń (obejmująca powtarzalność pełnej procedury analitycznej) kształtowała się na poziomie 1% (RSD).

W celu zbadania efektu interferencyjnego do oznaczenia selenu w danej próbce krwi zastosowano dwie metody kalibracyjne: metodę serii wzorców i metodę dodatków wzorca. W przypadku metody dodatków wzorca roztwory sporządzano w ten sposób, że mineralizacji poddawano w jednakowych warunkach kilka porcji próbki, a analit dodawano do próbek po mineralizacji w postaci wodnego roztworu wzorcowego. Stężenia selenu w dodanych roztworach wzorcowych wynosiły 0; 0,63; 1,25 i $1,88\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$. Wzajemne położenie linii kalibracyjnych wyznaczonych obiema metodami (rycina 1A) świadczyło o występowaniu efektu interferencyjnego.

O istnieniu interferencji chemicznych w przypadku oznaczania selenu w materiałach biologicznych metodą AAS-HG po mineralizacji próbek w kwasie azotowym(V) donoszono już kilkakrotnie [3, 5, 18]. Wysłunięto hipotezę [5], że za efekt ten odpowiedzialne są tlenki azotu (NO i NO_2), które, pozostając w próbce po procesie mineralizacji, zapobiegają redukcji Se(VI) do Se(IV). W konsekwencji w próbce wprowadzanej do spektrometru zmniejsza się stężenie analitu w formie Se(IV), a ponieważ ta forma zdolna jest do tworzenia wodorków z największą wydajnością, sygnał analityczny nie odpowiada faktycznej ilości selenu w próbce. Należy przypuszczać, że pomimo zastosowania innej metody pomiarowej (AFS-HG), efekty interferencyjne zauważone w obecnych badaniach można tłumaczyć w ten sam sposób.

W literaturze przedmiotu zaleca się stosowanie środków chemicznych do eliminacji wpływów tlenków azotu na oznaczanie selenu metodą AAS-HG [5, 13, 18]. Chcąc jednak uniknąć komplikowania opracowywanej procedury analitycznej przez wprowadzanie dodatkowych odczynników do próbki, podjęto próbę zabiegu nie stosowanego dotąd przez innych autorów. Postanowiono mianowicie zredukować stężenie tlenków azotu w fazie wodnej poprzez ich usuwanie znad próbek silnym strumieniem argonu lub azotu. Zabieg ten wykonywano bezpośrednio po procesie mineralizacji i ochłodzeniu próbek do temperatury otoczenia. Tak dodatkowo przygotowane próbki analizowano z zastosowaniem dwóch metod kalibracyjnych. Położenie wyznaczonych linii kalibracyjnych (rycina 1B) wskazywało, że w wyniku odpowiednio długiego działania gazów (przez ok. 10 min) efekt interferencyjny uległ eliminacji.

Efektywność redukcji efektów interferencyjnych ilustrują wyniki oznaczenia selenu w próbce pełnej krwi ludzkiej przedstawione w tabeli II. O możliwości całkowitego usunięcia tych efektów świadczą wyniki uzyskane dla próbek referencyjnych. Jak widać, zastosowana metoda analityczna pozwala na wyznaczenie stężenia selenu we krwi z dokładnością określoną błędem względem nie większym niż 2%.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Opracowana metoda analityczna dotycząca oznaczania selenu w krwi ludzkiej obejmuje kilka etapów doświadczalnych:

- mineralizację próbki w piecu mikrofalowym w kwasie azotowym;
- odpędzenie tlenków azotu znad mineralizatu i przeprowadzenie próbki do środowiska kwasu solnego;
- kalibrację oznaczenia metodą serii wzorców za pomocą wodnych roztworów wzorcowych;
- generację wodorków selenu w systemie przepływowym;
- pomiar sygnałów analitycznych za pomocą atomowego spektrometru fluorescencyjnego.

Procedura charakteryzuje się następującymi zaletami:

- jest stosunkowo szybka i prosta;
- wymaga użycia zaledwie kilku odczynników, dzięki czemu jest stosunkowo tania i bezpieczna;
- zapewnia możliwość oznaczania selenu na poziomach występujących w krwi ludzkiej;
- zapewnia uzyskanie wyników analitycznych o bardzo dobrej precyzji i dokładności.

Pewnym ograniczeniem w stosowaniu tej metody jest konieczność użycia stosunkowo drogiej (piec mikrofalowy) i trudnodostępnej (spektrometr AFS) aparatury specjalistycznej. Uzyskane wyniki dowodzą jednak, że proponowany sposób analizy krwi na zawartość selenu jest w pełni konkurencyjny w stosunku do innych metod stosowanych w tym samym celu i może być z przekonaniem zalecany do realizacji w laboratoriach toksykologicznych i klinicznych.

Podziękowania:

Autorzy serdecznie dziękują Panu Drowi Stanisławowi Walasowi za cenne dyskusje i pomocne uwagi dotyczące atomowej spektrometrii fluorescencyjnej.