



APPLICATION OF ICP-OES TO MULTIELEMENT ANALYSIS OF BIOLOGICAL MATERIAL IN FORENSIC INORGANIC TOXICOLOGY

Teresa LECH¹, Tomasz LACHOWICZ²

¹ *Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

² *Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland*

Abstract

The possibility of using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) with axial and radial configurations (duo mode) to determine essential trace elements and to detect potential toxic metals and nonmetals in biological fluids and tissues was evaluated. It was concluded that generally ICP-OES is a useful method for assessing the concentrations and the profile of some elements in human autopsy tissues and body fluids, e.g. Zn, Mn and Cu, as well as Al, B, Ba and Sr, which are difficult to determine by flame atomic absorption spectrometry (F-AAS), but it has some limitations. On the basis of results of analysis of autopsy material – tissues and body fluids ($n = 75$) – using the ICP-OES method, it was ascertained that this method does not enable establishment of reference values of, for example, As, Tl, Co, Cr and Ni in tissues, and also Pb, Cd and Hg (except in kidney, liver and spleen). The correctness of the method was checked by analysis of certified reference materials (Seronorm Whole Blood 2, Seronorm Trace Elements Urine, NIST Bovine Liver 1577b) and was acceptable for Al, Cd, Co, Hg, Cu, Zn, Mn, Sr and Ba, while for Tl, Pb and Li – it was not acceptable.

Key words

Multielement analysis; Biological material; ICP-OES.

Received 6 January 2009; accepted 30 January 2009

1. Introduction

One of the fundamental tasks in forensic inorganic toxicology is to determine concentrations of elements in biological material taken from living persons and also collected during autopsy, as well as in food, samples of water and sewage and in identified substances. An important aspect of correct analysis for metal and non-metal content (including extremely toxic elements and those that are non-toxic when occurring normally, but harmful in elevated quantities) is selection of appropriate material and analytical method.

There are many instrumental methods allowing identification and determination of various elements in

biological material and in food [34]. Due to the specific nature of the studied material – its complexity and also the occurrence of particular elements in broad ranges of concentrations (from main components, in mg/g to trace components – in g/g or ng/g) – the choice of analytical method is to a large extent dependent on the component (to be analysed). In toxicological analysis for inorganic compounds, various variants of atomic absorption spectrometry are most frequently used: these differ from each other in terms of atomization technique used: flame (F-AAS) [2, 16, 32, 35], electro-thermal (ET-AAS, GF-AAS) [18, 24, 30], with generation of hydrides (HG-AAS) [22] and cold vapours of mercury (CV-AAS) [1, 17], and, more rarely,

atomic fluorescence spectrometry (AFS) [37, 38]. Furthermore, the following have also been applied: X-ray fluorescence spectrometry (XRF) [3, 32] and ion chromatography [7]. Some of these methods have been successively dislodged by more modern methods, e.g. inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) [11, 12, 19] and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES, previously ICP-AES) [20, 26, 27, 28, 31], which enable a relatively fast combined determination of many elements, frequently with maintenance of good analytical parameters (accuracy, precision, limit of detection and quantification) and are used increasingly prevalently to study speciation of e.g. selenium [7], lead [29] or arsenic [21], and even multielement speciation in metallothioneins and other proteins [8].

Methods routinely applied up till now have not allowed simultaneous multielement screening analysis of biological material and food samples for content of elements. This has become possible, amongst other reasons, thanks to application of the ICP-OES method with use of sequential and, recently, simultaneous emission spectrometers [23]. Such analysis is very useful due to the fact that – it would seem – it allows quick detection of inorganic poisons in biological material and (or) food for the purposes of forensic and clinical toxicology (and defines the concentrations of elements) and also orientation of further analyses in cases of poisoning by an unknown chemical substance (metal or nonmetal compound). It has been applied in, amongst other fields, environmental protection, to elementary analysis of samples of water, soil, minerals and also fish [13, 14], tea and coffee for boron content [15], geological samples for content of rare earth metals [39], and also to determination of metals in hair [9, 26]. Optical emission spectrometry has also been used in comparative analyses in criminology (analysis of alloys, post-cremational ashes, oils) [4, 33, 36]. The ICP-OES method is not widespread in Poland, especially in the analysis of biological material. In this study, we attempted to assess the usefulness of this method in multielement analysis of various biological materials in forensic inorganic toxicology.

2. Materials and methods

2.1. Material

The material for validating the method was samples of body fluids (blood, urine) collected from living persons ($n = 20$) and body fluids (blood, urine, bile, total $n = 29$) and sections of internal organs (liver, kid-

neys, stomach, intestines, lungs and brain) secured in the course of autopsy ($n = 46$). The presence of inorganic poisons was ruled out in these samples by the AAS method (by the flame and cold vapour technique) and also light spectrophotometry.

2.2. Reagents

Samples of biological material were mineralised in a microwave system in concentrated nitric(V) acid of special purity (Suprapur) and also analytical grade 30% hydrogen peroxide (Merck, Germany). Standard solutions used in calibration were prepared by diluting mono- (Hg, As) or multi-elemental (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) standard solutions of concentration 1000 mg/ml (Merck, Germany). Deionized water originating from the NANOpure DIAMOND (Barnstead, United States) system of purifying water was used to prepare working standard solutions and also to dilute samples. The accuracy of the method was assessed on the basis of analysis of three certified materials: blood – Seronorm Whole Blood 2, urine – Seronorm Trace Elements Urine (SERO AS, Norway) and also bovine liver – Bovine Liver 1577b (NIST, United States). Glass and polypropylene vessels were prepared by washing and soaking (overnight) in 25% (v/v) analytical grade nitric(V) acid (ChemPur, Poland).

2.3. Preparation of material

Samples of biological material were digested in an MLS 1200 Mega (Milestone, Italy) microwave oven using six or ten high pressure Teflon vessels (volume 160 and 100 ml respectively). Samples of blood (2 ml), urine (2–8 ml) and also sections of internal organs (1–2 g) with addition of 4 ml nitric(V) acid and 1 ml hydrogen peroxide were subjected to mineralisation in accordance with the following programme: 1 min – 250 W, 2 min – 0 W and successively 250, 400 and 600 W (5 min each). The obtained mineralisates were diluted to a volume of 10 ml (in the case of samples of mass up to 2 g) or 25 ml (in the case of samples of mass above 2 g). The mineralised samples were stored in a refrigerator at a temperature of 4°C up to the time of analysis.

2.4. Method

Analysis of samples of biological material for metal and nonmetal content was carried out using an iCAP 6300 duo plasma emission spectrometer (Thermo Electron Corp., United States), enabling simultaneous

recording of the full emission spectrum of the sample in the range from 166.250 to 847.000 nm with the help of a Charge Injection Device (CID). The spectrometer was equipped with a cyclonic spray chamber with concentric nebulizer. A double system of observation of plasma was used (axial and radial). The fundamental features of the spectrometer and measuring conditions applied in the analysis have been presented in Table I.

3. Validation of the ICP-OES method

3.1. Calibration of the method

Calibration was carried out by the calibration curve method. Calibration curves for arsenic and mercury were drawn up on the basis of measurements of four standard solutions (containing mercury and arsenic at the same time) at concentrations: 0.10, 0.20, 0.50 and 1.00 g/ml; however, for the remaining elements, solutions at the following concentrations were used: 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 and 2.00 g/ml. In the studies, analytical lines of the greatest intensity of emission were used. Gallium and indium, present in the standard solution earmarked for analysis by the ICP-OES method, were omitted in the calibration studies due to not being very useful in analysis of biological material. Before beginning calibration, automatic optimisation of the position of spectral lines on the detector was carried out with the help of the Auto Peak function. To this end, a multielement standard solution

of concentration 2.00 g/ml was used, as was a solution of arsenic and mercury of concentration 1.000 g/ml. In the studied range of concentrations, coefficients of linear regression for particular spectral lines were greater than 0.999. Spectral lines of arsenic $\lambda = 449.423$ nm and also lead $\lambda = 261.418$ nm ($R^2 < 0.999$) constituted exceptions, for which calibration curves had a negative slope. In the case of the potassium line ($\lambda = 766,490$ nm) a satisfactory value of coefficient of correlation ($R^2 > 0.999$) was obtained in the range of concentrations above 0.050 g/ml.

In samples analysed directly after carrying out calibration using solutions containing mercury, a high concentration of this element was observed, decreasing systematically with time (the so-called memory effect). This constitutes a limitation of the method and requires care when studying material for mercury content.

3.2. Limits of detection and quantification

Limits of detection (*LOD*) and quantification (*LOQ*) were calculated in accordance with the literature on the subject [25] as, respectively, 3 and 10 fold standard deviations of the concentration of the elements in blank sample solution (4 ml concentrated nitric(V) acid and 1 ml 30% hydrogen peroxide solution). Mean values of limits of detection and quantification obtained as a result of 10 parallel determinations of elements in solutions of five blank samples (1:10) are presented in Table II.

TABLE I. SPECIFICATIONS AND WORKING CONDITIONS OF ICP-OES SPECTROMETER

Monochromator	Echelle with simultaneous detection
Detector	Charge injection device (CID)
RF generator power	1.150 kW
Radio frequency	27.12 MHz
Plasma observation	Radial/axial (auto view)
Pump rate	50 rpm
Integration time (low/high WL)	15 s /15 s
Pump tubing type	Tygon orange/white
Auxiliary gas flow	0.5 l/min
Coolant gas flow	20 l/min
Spray chamber	Cyclonic with concentric nebulizer (Meinhard)
Nebulizer gas pressure	0.14 MPa

TABLE II. LIMITS OF DETECTION AND QUANTIFICATION FOR SOME ELEMENTS IN BLOOD, URINE AND LIVER (10 REPEATS)

Element	Wavelength [nm]	LOD [g/g]	LOQ [g/g]
Al	167.079	0.11	0.38
As	189.042	0.074	0.28
B	208.959	0.076	0.25
B	249.678	0.49	1.6
B	249.773	0.18	0.59
Ba	230.424	0.033	0.11
Ba	233.527	0.027	0.089
Ba	455.403	0.031	0.10
Bi	223.061	0.11	0.38
Ca	393.366	0.024	0.080
Ca	396.847	0.025	0.083
Cd	214.438	0.0068	0.023
Cd	226.502	0.0070	0.023
Cd	228.802	0.013	0.043
Co	228.616	0.020	0.066
Cr	267.716	0.19	0.62
Cr	283.563	0.19	0.65
Cu	219.958	0.12	0.39
Cu	224.700	0.040	0.13
Cu	324.754	0.27	0.90
Fe	238.204	0.40	1.3
Fe	239.562	0.34	1.1
Fe	259.940	0.64	2.1
Hg	194.227	0.021	0.070
Hg	253.652	0.013	0.043
K	766.490	5.2	17.0
Li	670.784	0.23	0.76
Mg	279.553	0.0057	0.019
Mg	280.270	0.011	0.038
Mn	257.610	0.033	0.11
Mn	259.373	0.039	0.13
Na	589.592	1.7	5.7
Ni	221.647	0.043	0.15
Pb	220.353	0.080	0.27

Sr	407.771	0.011	0.037
Sr	421.552	0.014	0.046
Tl	190.856	0.076	0.25
Zn	202.548	0.014	0.048
Zn	206.200	0.020	0.066
Zn	213.856	0.0083	0.028

3.3. Precision

The precision of the method was determined on the basis of determinations of elements in 6 samples of blood (2 ml) and liver (approx 2 g) prepared in parallel, which were collected in the course of autopsies on bodies of 3 persons and also 10 samples of urine (8 ml) originating from 5 living persons. The results (averages) obtained are presented in Table III.

3.4. Accuracy of the method

The accuracy of the method was assessed on the basis of multielement analysis of three certified reference materials (CRM, Certified Reference Material) – blood (Seronom Whole Blood L-2), urine (Seronom Trace Element Urine) and bovine liver (NIST Bovine Liver 1577b). Results obtained during study of three parallel samples of certified reference materials: blood (2 ml), urine (5 ml) and bovine liver (1 g) have been presented in Tables IV, V and VI.

Dilution of the mineralisate also had a significant effect on results of analysis. On the basis of examination of certified reference materials (blood, urine and liver), it was established that for most elements, the optimal dilution of mineralisate applied in determinations by the ICP-OES method (with sample preparation method as described in this work) is 10-fold dilution. An exception is elements occurring at large concentrations in the studied material, such as Ca, Mg, Na and K, which require more dilution (1:50 in the case of blood and urine, 1:100 in the case of organs) and trace elements (Ba, B, Pb, Sr and Cd in blood and also Al, As, Ba, Cd, Cu, Hg, Sr and Zn in urine), which should be determined without diluting mineralisate.

The accuracy was also assessed by analysing the recovery of five selected elements (Al, Cd, Cr, Cu and Mn) added in quantities of 0.1–1.0 g/ml (or g/g) to 6 samples of blood (2 ml) and liver (2 g) of known elemental composition (secured during autopsy), and then mineralised. The results are presented in Table VII. In samples of blood and liver, the recovery of Cd, Cu and Mn was close to 100%. The recovery of Al and Cr in liver and also Cr in blood significantly exceeded

TABLE III. PRECISION OF THE DETERMINATION OF SELECTED ELEMENTS IN NORMAL HUMAN BLOOD, URINE AND LIVER

Element	[nm]	Blood ($n = 3$)			Urine ($n = 5$)			Liver ($n = 3$)		
		\bar{c} [g/ml]	\bar{c} ($= 0.05$)	RSD [%]	\bar{c} [g/ml]	\bar{c} ($= 0.05$)	RSD [%]	\bar{c} [g/g]	\bar{c} ($= 0.05$)	RSD [%]
Al	167.079	0.344 ± 0.032	7.47	0.109 ± 0.021	27.3	0.337 ± 0.045	10.8			
B	249.773	0.764 ± 0.052	6.47	1.46 ± 0.03	2.55	0.161 ± 0.046	27.3			
Ba	230.424	nd	nd	0.007 ± 0.001	14.5	nd	nd			
Ba	233.527	nd	nd	0.006 ± 0.001	14.6	nd	nd			
Ca	393.366	45.9 ± 1.0	2.05	547 ± 4	1.02	49.2 ± 0.6	1.09			
Ca	396.847	45.4 ± 1.0	2.03	536 ± 4	1.06	48.4 ± 0.5	1.04			
Cd	214.438	0.0798 ± 0.0007	0.81	nd	nd	0.939 ± 0.006	0.61			
Cd	226.502	0.108 ± 0.002	1.59	nd	nd	0.969 ± 0.007	0.68			
Cd	228.802	0.0562 ± 0.0021	3.54	nd	nd	0.971 ± 0.013	1.26			
Cr	267.716	nd	nd	nd	nd	0.0979 ± 0.0346	33.7			
Cr	283.563	0.781 ± 0.041	5.01	nd	nd	0.264 ± 0.061	22.0			
Cu	219.958	0.828 ± 0.022	2.51	0.022 ± 0.003	17.3	2.57 ± 0.05	1.75			
Cu	224.700	0.898 ± 0.010	1.08	0.018 ± 0.002	13.3	2.53 ± 0.02	0.62			
Cu	324.754	0.831 ± 0.034	3.88	0.008 ± 0.003	57.6	2.66 ± 0.06	2.11			
Fe	238.204	643 ± 11	1.68	0.044 ± 0.01	31.8	269 ± 4	1.27			
Fe	239.562	633 ± 12	1.75	0.039 ± 0.01	33.0	258 ± 4	1.14			
Fe	259.940	630 ± 10	1.48	0.046 ± 0.01	18.3	261 ± 4	1.29			
K	766.490	2829 ± 52	1.74	1235 ± 15	1.69	2707 ± 23	0.87			
Li	670.784	0.119 ± 0.018	12.1	0.064 ± 0.004	7.99	nd	nd			
Mg	279.553	54.0 ± 0.9	1.67	206 ± 1	0.96	148 ± 2	1.16			
Mg	280.270	54.1 ± 1.0	1.71	208 ± 2	1.10	149 ± 2	1.28			
Mn	257.610	nd	nd	nd	nd	1.52 ± 0.02	1.10			
Mn	259.373	0.784 ± 0.020	2.46	nd	nd	1.84 ± 0.06	3.08			
Na	589.592	1005 ± 19	1.78	4821 ± 38	1.09	952 ± 10	0.97			
Pb	220.353	0.0367 ± 0.0162	42.0	0.007 ± 0.001	21.5	0.108 ± 0.010	8.62			
Sr	407.771	0.0151 ± 0.0019	11.7	0.385 ± 0.004	1.37	0.0280 ± 0.0019	6.43			
Sr	421.552	0.0166 ± 0.0036	19.9	0.395 ± 0.003	1.06	0.0308 ± 0.0027	8.39			
Zn	202.548	7.23 ± 0.07	0.98	0.760 ± 0.005	0.85	32.4 ± 0.3	0.77			
Zn	206.200	7.24 ± 0.08	0.99	0.793 ± 0.005	0.86	32.6 ± 0.3	0.79			
Zn	213.856	7.27 ± 0.05	0.68	0.793 ± 0.005	0.90	32.4 ± 0.5	1.51			

\bar{c} \bar{c} ($= 0.05$) – mean concentration with confidence interval at the level of significance $= 0.05$; nd – not detected.

(by > 20%) a value of 100%. The cause of this phenomenon may be strong spectral interference originating from iron present in large concentrations in this

type of biological matrix as well as (or) the low precision of the method when close to the limit of quantification.

TABLE IV. CONCENTRATIONS OF SELECTED ELEMENTS IN CERTIFIED REFERENCE MATERIAL – SERONORM WHOLE BLOOD L-2 AND ACCURACY OF ANALYSIS

Element	Concentration [g/ml]		Accuracy ⁴ [%]
	Certified value ¹	Found value ²	
Ag	(0.000134) ³	nd	–
As	0.0132 ± 0.0013	nd	–
B	(0.091)	0.084	7.5
Ba	(0.066)	0.069	4.0
Bi	0.0051 ± 0.0003	Nd	–
Ca	(16.7)	14.9	10.7
Cd	0.0051 ± 0.0023	nd	–
Co	0.0044 ± 0.0019	nd	–
Cr	0.0061 ± 0.0009	nd	–
Cu	(0.666)	0.641	3.8
Fe	(435)	412	5.2
Hg	0.0087 ± 0.0013	nd	–
K	(1067)	1025	3.9
Li	(0.0019)	nd	–
Mg	(19.2)	18.3	4.7
Mn	0.0131 ± 0.0032	0.0099	23.6
Na	(1329)	1307	1.7
Ni	0.0052 ± 0.0015	nd	–
Pb	0.396 ± 0.100	0.412	4.0
Sr	(0.034)	0.034	1.4
Tl	0.0052 ± 0.0003	nd	–
Zn	(5.04)	4.99	1.0

¹ Mean concentration with confidence interval at the level of significance = 0.05; ² Arithmetic mean ($n = 3$); ³ Value not certified; ⁴ Relative error [%]; nd – not detected at certified concentrations; “–” – not calculated.

4. Spectral effects

It was observed that concentrations of elements determined for various spectral lines sometimes significantly differed among themselves (examples are given in Table VIII). Differences in determined concentrations were most probably the effect of spectral interference – depending on the determined element and selected spectral line, signals originating from interfer-

TABLE V. CONCENTRATIONS OF SELECTED ELEMENTS IN CERTIFIED REFERENCE MATERIAL – SERONORM TRACE ELEMENTS URINE AND ACCURACY OF ANALYSIS

Element	Concentration [g/ml]		Accuracy ³ [%]
	Certified value ¹	Found value ²	
Ag	0.000012 ± 0.000005	nd	–
Al	0.105 ± 0.004	0.144	37.0
As	0.184 ± 0.017	0.156	15.0
B	0.691 ± 0.049	0.703	2.0
Ba	0.009 ± 0.004	0.011	22.0
Ca	108 ± 4	108	0
Cd	0.00506 ± 0.00022	0.00454	10.3
Co	0.0101 ± 0.0005	nd	–
Cr	0.0201 ± 0.0011	nd	–
Cu	0.0161 ± 0.0014	0.0188	17.0
Fe	0.0144 ± 0.0014	nd	–
Hg	0.0403 ± 0.0026	nd	–
K	1983 ± 55	1794	9.5
Li	0.00794 ± 0.00053	nd	–
Mg	54 ± 3	53.5	1.0
Mn	0.0111 ± 0.0010	0.0108	2.7
Na	2545 ± 82	2327	8.6
Ni	0.0415 ± 0.0022	0.0412	0.7
Pb	0.0911 ± 0.0070	0.0819	10.1
Sr	0.0913 ± 0.0063	0.0897	7.8
Tl	0.00969 ± 0.00036	nd	–
Zn	0.261 ± 0.013	0.275	5.0

¹ Mean concentration with confidence interval at the level of significance = 0.05; ² Arithmetic mean ($n = 3$); ³ Relative error [%]; nd – not detected at certified concentration; “–” – not calculated.

ents could be near the analysed line, making it impossible to correctly measure the level of the background, or they could be superimposed onto the analysed lines (so-called coincidence of lines [5]). The most frequently occurring sources of spectral interference in biological material are presented in Table IX. The wavelengths of spectral lines of interfering elements (interferents) in determination of metals and nonmetals in biological material were obtained with the help

of a wavelength finder, which is a feature of the spectrometer's software.

TABLE VI. CONCENTRATIONS OF SELECTED ELEMENTS IN CERTIFIED REFERENCE MATERIAL – NIST BOVINE LIVER 1577B AND ACCURACY OF ANALYSIS

Element	Concentration [g/g]		Accuracy ⁴ [%]
	Certified value ¹	Found value ²	
Cu	160 ± 8	169	6.0
Fe	184 ± 15	199	8.0
Hg	(0.003)	nd	–
K	9940 ± 20	9929	0.1
Mg	601 ± 28	613	2.0
Mn	10.5 ± 1.7	11.2	7.0
Na	2420 ± 60	2426	0
Pb	0.129 ± 0.004	0.537	316
Sr	0.136 ± 0.001	0.138	1.0
Zn	127 ± 16	127	0

¹Mean concentration with confidence interval at the level of significance = 0.05; ²Arithmetic mean ($n = 3$); ³Value not certified; ⁴Relative error [%]; nd – not detected at certified concentrations; “–” – Not calculated.

It was ascertained that during analysis of biological material for trace element content by the ICP-OES method, iron, sodium, potassium, sulphur and phosphorus can have a large effect on results of determination. Due to occurrence of spectral interferents, the following spectral lines were rejected in further analyses: Al = 396,152 nm, B = 249.678 and 249.773 nm, Cd = 226.502 nm (in the case of samples of blood with low cadmium content, when concentration calculated for this line significantly deviates from concentrations determined for the remaining spectral lines), Cr = 283.563 and 357.869 nm, Mn = 259.373 nm (with the exception of samples of urine, due to the small amount of iron contained in this type of material).

5. Application of the ICP-OES method to study of autopsy material

Heavy metals (elements that are usually toxic), such as Pb, Hg, Cd, Ni, Cr, Ag and also Zn, Mn, Cu and Fe, and also Ba (which admittedly is not a heavy metal, but is highly toxic in elevated amounts), and

amongst bio-elements: Ca, Mg, Na, K, Sr and Li, were chosen for determination.

TABLE VII. ACCURACY OF THE DETERMINATION OF ALUMINIUM, CADMIUM, CHROMIUM, COPPER AND MANGANESE IN HUMAN BLOOD AND LIVER

Element	Concentration in sample [g/g]	Added [g/g]	Found [g/g]	Accuracy ¹ [%]
Blood ($n = 3$)	Al	0.226	0.209	7.7
		0.452	0.420	7.0
	Cd	0.101	0.102	2.0
		0.201	0.206	2.0
	Cr	0.103	0.127	24
		0.205	0.220	7.0
Cu	0.256	0.252	1.6	
	0.512	0.538	5.0	
Mn	0.101	0.098	2.7	
	0.201	0.206	2.0	
Liver ($n = 3$)	Al	0.452	0.720	59
		0.904	1.160	28
	Cd	0.201	0.208	3.0
		0.402	0.393	2.4
	Cr	0.205	0.297	45
		0.410	0.373	9.0
Cu	0.512	0.486	5.2	
	1.024	0.981	4.2	
Mn	0.201	0.210	4.0	
	0.402	0.416	3.0	

¹Relative error [%].

On the basis of results of study of autopsy material by the ICP-OES method – sections of internal organs (brain, liver, kidneys, stomach, intestines, lungs and spleen) and also physiological fluids (blood, urine and bile) – a total of 75 samples, in which the presence of inorganic poisons had been ruled out earlier, it was ascertained that this method does not enable determination of reference levels of certain elements, e.g. As, Tl, Co, Cr and also Ni in tissues, and Pb, Cd and Hg (with the exception of cumulative organs such as liver, kidneys and spleen).

TABLE VIII. EFFECT OF A SPECTRAL LINE ON THE CONCENTRATION OF SOME ELEMENTS IN BLOOD AND URINE

Element	Wavelength [nm]	Concentration [g/ml]	
		Blood	Urine
Ca	393.366	67.0	63.8
	396.847	66.2	63.1
	422.673	66.6	63.6
Cd	214.438	0.26	0.004
	226.502	0.28	0.004
	228.802	0.27	0.021
Cu	219.958	0.575	0.1085
	224.700	0.705	0.1165
	324.754	0.536	0.1445
	327.396	0.730	0.1085
Mn	257.610	0.069	0.012
	259.373	0.356	0.014
	260.569	0.029	0.007
Zn	202.548	5.26	0.957
	206.200	5.28	1.005
	213.856	5.30	0.984

6. Discussion of results

Analysis of biological material by the method of inductively coupled plasma-optical atomic emission spectrometry is gaining increasing popularity amongst emission techniques due to the simplicity of carrying out analyses, the possibility of simultaneous determination of many elements, the short time of measurement, the good tolerance of higher concentrations of salt and the relatively small number of matrix effects [6, 10, 20, 23].

Constant improvement of plasma emission spectrometers (method of nebulization of sample, structure of generator and optical system and also type of detector) is leading to a lowering of limits of detection, increase in resolution and better stability of the spectrometer over time [23]. For these reasons, modern ICP-OES spectrometers have become useful in clinical studies [20, 23, 26, 27, 28] and in other areas: assessment of environmental contamination, geology and various branches of industry [4, 10, 15, 23, 33, 36, 39].

TABLE IX. SPECTRAL INTERFERENCES OCCURRING MOST FREQUENTLY DURING ANALYSIS OF BIOLOGICAL SAMPLES

Element	[nm]	Interferents and their wavelengths ([nm])
Ag	328.068	Fe, 328.026
Al	167.079	Fe, 167.064
Al	396.152	Fe, 396.114; S, 396.197
As	189.042	Cr, 189.055; C, 189.082; C, 192.087
B	249.678	Fe, 249.653
B	249.773	Fe, 249.782
Bi	190.241	Si, 190.246
Cd	226.502	K, 226.504
Co	228.616	Ba, 228.600
Co	238.892	Fe, 238.863
Cr	267.716	P, 267.711; Cl, 267.795
Cr	283.563	Fe, 283.546; Fe, 283.571
Cr	357.869	Fe, 357.838
Hg	184.950	Na, 185.015
Hg	253.652	Fe, 253.682; Fe, 253.667; Fe, 253.679
Li	670.784	N, 670.876
Mn	259.373	Fe, 259.373; Na, 259.387; Na, 259.392
Mn	260.569	Fe, 260.543
Na	588.995	C, 588.859
Ni	221.647	Si, 221.667
Ni	231.604	O, 231.612
Pb	261.418	Fe, 261.382
Sr	421.552	Ba, 421.604
Tl	276.787	Fe, 276.750

In contrast to traditional flame or electrothermal atomic absorption spectrometry (F-AAS, ET-AAS) used routinely in the analysis of autopsy material, the high-energy plasma technique allows simultaneous recording of emission spectra originating from many elements in the analysed sample, enabling, by the same token, multi-element screening analysis. Using ICP-OES it is possible to determine B and other elements that are important from the toxicological point of view, such as Ba, Al and Sr, whose normal concentrations in tissues and body fluids are below the level of quantifi-

cation by the F-AAS method. Performed studies have shown that the ICP-OES method allows determination in one or two analytical cycles not only of elements that are easy to study by the F-AAS method (e.g. Zn, Mn and Cu), but also B, Ba, Al, Sr, Fe and Cr and also in certain tissues (kidney, liver) – Cd and Hg, and in blood – Cd, which have great significance in forensic inorganic toxicology. Biometals (Ca, Mg, K and Na) can also be successfully determined by this method in various biological samples.

Unfortunately, the ICP-OES method does not allow establishment of reference concentrations of certain metals, e.g. Pb or Tl. Determination of other elements (such as As, Cr, Mn and Ni) in biological material is also difficult, especially in blood or in urine, where they occur at low concentrations. For example, in reference blood, our results for manganese concentration corresponded only to 76.4% of the certified value (Table IV), and in urine – our results for arsenic concentration constituted 85% of the reference value (Table V). However, in the liver, the determined concentration of lead was more than four times greater than the expected value. These differences may be caused, on the one hand, by too low sensitivity of certain analytical lines (Mn, Cr), and, on the other hand, by a large background originating from components of the sample (e.g. iron, whose lines strongly interfere with lines of lead = 261.418 nm and manganese = 259.373 nm). For these metals, the flameless AAS method (ET-AAS), which is sufficiently sensitive, but very time-consuming and mono-elemental or the ICP-MS method seem to be the most appropriate. Subramanian [32] suggested that determination by the ICP-OES method of certain trace elements (e.g. Pb, Cd, Mn, Cr, Ni, Sn and V) in biological samples requires preliminary concentration and separation of the analyte from the matrix and also that each “wet” or “dry” method applied in analyses by the AAS method may be used in analysis by the ICP-OES method. Of course, in the case of study of materials collected at the time of poisoning by compounds of metals and semi-metals (As, Se etc.), where concentrations of elements are higher, the ICP-OES method is more appropriate. Rahil-Khazen et al. [27, 28] and also Mochizuki et al. [20] amongst others, have already used the ICP-OES method to determine a dozen-or-so elements in biological material collected from people or animals.

7. Conclusions

The following conclusions can be drawn on the basis of performed studies:

- in spite of many advantages (large number of detected elements, broad range of concentrations, relatively short time of analysis, good precision – *RSD* about 1–5% for most elements in various biological matrices), the ICP-OES method may only be a complementary method to F-AAS;
- the ICP-OES method may be applied to mono- or multielement analysis of metals and nonmetals, e.g. B;
- in contrast to F-AAS or ET-AAS, ICP-OES may be a screening method;
- the ICP-OES method allows determination of the concentrations of 17 elements, including B, Al, Ba and Sr (which are difficult to determine with the F-AAS method) in one analytical run (23-element standard) in physiological fluids and internal organs;
- in spite of the fact that when applying the ICP-OES method, much lower levels of detection are achieved than for F-AAS (e.g. for Mn, Zn, Ba), for many elements, the method does not fulfil expectations; it is not suitable for e.g., defining reference concentrations of As, Tl, Pb (with the exception of liver and kidney), Hg (with the exception of liver, kidney and spleen) and also Cr and Ni;
- when analysing certified reference materials (blood, urine and bovine liver) by the ICP-OES method, the best results were obtained for Al, Cd, Co, Hg, Sr, Ba, and the worst for Tl, Pb, and Li; it was observed that selection of the correct dilution of the sample has a big influence on the correctness of result of analysis;
- the biggest spectral interferences in biological material originate from Fe, K, Na and also P and S.

Thus, results of own research and that of other authors allow us to conclude that the modern ICP-OES method can successfully be used to assess content and define the profile of many trace elements in organs and body fluids both in clinical analyses and in inorganic toxicological analysis for forensic purposes. Concentrations of elements in biological material obtained by this method can be used to interpret results of analyses in cases of suspicion of poisoning by inorganic compounds. The ICP-OES method, however, similarly to other methods, has certain limitations.

References

1. Adeloju S. B., Dhindsa H. S., Mierzwa J., Post-addition of sulfuric acid to wet digested biological and environmental materials for mercury determination by cold vapor atomic

- absorption spectrometry, *Analytical Sciences* 1997, 13, 619–622.
2. András E., Igaz S., Szoboszlai N. [et al.], Several methods to determine heavy metals in human brain, *Spectrochimica Acta B* 1999, 54, 819–825.
 3. Brazeau J., Wong R. K., Analysis of gunshot residues on human tissues and clothing by X-ray microfluorescence, *Journal of Forensic Sciences* 1997, 42, 424–428.
 4. Brooks T. R., Bodkin T. E., Potts G. E. [et al.], Elemental analysis of human cremains using ICP-OES to classify legitimate and contaminated cremains, *Journal of Forensic Sciences* 2006, 51, 967–973.
 5. Cygański A., Metody spektroskopowe w analizie chemicznej, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2002.
 6. De Wit M., Blust R., Determination of metals in saline and biological matrices by axial inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using microconcentric nebulization, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1998, 13, 515–520.
 7. Emteborg H., Bordin G., Rodriguez A. R., Speciation of organic and inorganic selenium in a biological certified reference material based on microbore ion-exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry via a direct injection nebulizer or coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analyst* 1998, 123, 245–253.
 8. Ferrarello C. N., Fernández de la Campa, M. R., Sanz-Medel A., Multielement trace-element speciation in metal-biomolecules by chromatography coupled with ICP-OES, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2002, 373, 412–421.
 9. Galas W., Trzcionka J., ICP-AES method in the determination of the metals in human hair, *Chemia Analityczna* 1997, 42, 697–702.
 10. Garavaglia R. N., Rebagliati R. J., Roberti M. J. [et al.], Matrix effects in the analysis of biological matrices by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta B* 2002, 57, 1925–1938.
 11. Gouillé J.-P., Mahieu L., Castermant J. [et al.], Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values, *Forensic Science International* 2005, 153, 39–44.
 12. Hasegawa T., Matsuura H., Inagaki K. [et al.], Major-to-ultratrace elements in bone-marrow fluid as determined by ICP-AES and ICP-MS, *Analytical Sciences* 2003, 19, 147–150.
 13. Ikem A., Egiebor N. O., Nyavor K., Trace elements in water, fish and sediment from Tuskegee Lake, southeastern USA, *Water, Air and Soil Pollution* 2003, 149, 51–75.
 14. Itoh A., Nagasawa T., Zhu Y. [et al.], Distributions of major-to-ultratrace elements among the particulate and dissolved fractions in natural water as studied by ICP-AES and ICP-MS after sequential fractionation, *Analytical Sciences* 2004, 20, 29–36.
 15. Krejčová A., Cernohorský T., The determination of boron in tea and coffee by ICP-AES, *Food Chemistry* 2003, 82, 303–308.
 16. Lech T., Zastosowanie atomowej spektrometrii absorpcyjnej do oznaczania manganu w materiale biologicznym i żywności, *Zagadnień kryminalistyki* 1990, 23, 17–23.
 17. Lech T., Kobylecka K., Determination of trace amounts of mercury in blood by the cold vapour atomic absorption method, *Problems of Forensic Sciences* 1997, 36, 44–55.
 18. Marco L. M., Hernandez Caraballo E. A., Pascusso C. [et al.], Determination of manganese in brain samples by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Talanta* 2003, 59, 897–904.
 19. Marquardt D., Luderitz P., Grosser J., Anwendung der ICP-Spektrometrie zur Multielementanalytik von biologischem Material, *Zeitschrift für Erkrankungen der Atmungsorgane* 1987, 169, 73–74.
 20. Mochizuki M., Hondo R., Ueda F., Simultaneous analysis for multiple heavy metals in contaminated biological samples, *Biological Trace Elements Research* 2002, 87, 211–223.
 21. Morton J., Mason H., Speciation of arsenic compounds in urine from occupationally unexposed and exposed persons in the U.K. using a routine LC-ICP-MS method, *Journal of Analytical Toxicology* 2006, 39, 293–301.
 22. Ng J. C., Johnson D., Imray P. [et al.], Speciation of arsenic metabolites in the urine of occupational workers and experimental rats using an optimized hydride gold-trapping method, *Analyst* 1998, 123, 929–933.
 23. Nölte J., ICP emission spectrometry. A practical guide, Wiley-VCH, Weinheim 2003.
 24. Oliveira P. V., Oliveira E., Multielement electrothermal atomic absorption spectrometry: A study on direct and simultaneous determination of chromium and manganese in urine, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2001, 371, 909–914.
 25. Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F., Validation of new methods, *Forensic Science International* 2007, 165, 216–224.
 26. Prohaska C., Promazal K., Steffan I., Determination of Ca, Mg, Fe, Cu and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2000, 367, 479–484.
 27. Rahil-Khazen R., Bolann B. J., Myking A. [et al.], Multielement analysis of trace elements levels in human autopsy tissues by using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP-AES), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2002, 16, 15–25.
 28. Rahil-Khazen R., Henriksen H., Bolann B. J. [et al.], Validation of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) for multi-element analysis of trace element in human serum, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 2000, 60, 677–686.

29. al-Rashdan A., Heitkemper D., Caruso J. A., Lead speciation by HPLC-ICP-AES and HPLC-ICP-NS, *Journal of Chromatographic Science* 1991, 29, 98–102.
30. Raźniewska G., Trzcinka-Ochocka M., Gazewski A., Determination of total inorganic arsenic metabolites in urine, *Acta Toxicologica* 2004, 12, 137–144.
31. Schmit J. P., Youla M., Gélinas Y., Multi-element analysis of biological tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 1991, 249, 495–501.
32. Subramanian K. S., Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques, *Spectrochimica Acta B* 1996, 51, 291–319.
33. Suzuki Y., Kasamatsu M., Suzuki S. [et al.], Forensic discrimination of lead-tin solder based on the trace impurity analysis by ICP-AES, *Analytical Sciences* 2003, 19, 415–418.
34. Taylor A., Branch S., Halls D. J. [et al.], Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, food, and beverages, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1999, 14, 717–781.
35. Treble R. G., Thompson T. S., Lynch H. R., Determination of copper, manganese and zinc in human liver, *Bio-Metals* 1998, 11, 49–53.
36. Vähöja P., Välimäki I., Heino K. [et al.], Determination of wear metals in lubrication oils: a comparison study of ICP-OES and FAAS, *Analytical Sciences* 2005, 21, 1365–1369.
37. Wietecha R., Kościelniak P., Lech T. [et al.], Determination of selenium in human blood using atomic fluorescence spectrometry, *Problems of Forensic Sciences* 2002, 52, 21–36.
38. Wietecha R., Kościelniak P., Lech T. [et al.], Simple method for simultaneous determination of selenium and arsenic in human hair by means of atomic fluorescence spectrometry with hydride generation technique, *Microchimica Acta* 2005, 149, 137–144.
39. Xu Z., Liu C., Zhang H. [et al.], Determination of rare earth elements in geological samples by atomic emission spectrometry with flow injection liquid-liquid extraction, *Analytical Sciences* 2003, 19, 1625–1629.

Corresponding author

Teresa Lech
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: tlech@ies.krakow.pl

ZASTOSOWANIE METODY ICP-OES DO WIELOPIERWIASTKOWEJ ANALIZY MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO DLA CELÓW NIEORGANICZNEJ TOKSYKOLOGII SĄDOWEJ

1. Wstęp

Jednym z podstawowych zadań w nieorganicznej toksykologii sądowej jest wyznaczenie stężeń pierwiastków w materiale biologicznym pobranym od osób żywych oraz zabezpieczonym w czasie sekcji zwłok, a także w żywności, próbkach wody i ścieków oraz w identyfikowanych substancjach. Ważnym elementem właściwego przeprowadzenia badań na zawartość metali i niemetalu, w tym pierwiastków wybitnie toksycznych lub normalnie występujących, lecz szkodliwych w podwyższonych ilościach, jest dobór odpowiedniego materiału oraz metody analitycznej.

Istnieje wiele metod instrumentalnych pozwalających na identyfikację i oznaczanie różnych pierwiastków w materiale biologicznym i w żywności [34]. Ze względu na specyfikę materiału badawczego – jego złożoność, a także występowanie poszczególnych pierwiastków w szerokich zakresach stężeń (od składników głównych, w mg/g, po śladowe – w g/g lub ng/g) – wybór metody analitycznej jest w dużym stopniu uzależniony od oznaczonego składnika. W analizie toksykologicznej na zawartość związków nieorganicznych wykorzystuje się najczęściej różne odmiany atomowej spektrometrii absorpcyjnej różniące się między sobą techniką atomizacji: w płomieniu (F-AAS) [2, 16, 32, 35], elektrotermiczną (ET-AAS, GF-AAS) [18, 24, 30], z generacją wodorków (HG-AAS) [22] oraz zimnych par rtęci (CV-AAS) [1, 17], rzadziej atomową spektrometrię fluorescencyjną (AFS) [37, 38]. Oprócz nich znalazły zastosowanie: spektrometria fluorescencji rentgenowskiej (XRF) [3, 32] oraz chromatografia jonowa [7]. Część tych metod jest sukcesywnie wypierana przez metody nowocześniejsze, np. spektrometrię mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS) [11, 12, 19] oraz optyczną spektrometrię emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES, dawniej ICP-AES) [20, 26, 27, 28, 31], które umożliwiają stosunkowo szybkie łączne oznaczenie wielu pierwiastków, często przy zachowaniu dobrych parametrów analitycznych (dokładność, precyzja, granica wykrywalności i oznaczalności) i są wykorzystywane coraz powszechniej do badania specjacji, np. selenu [7], ołowiu [29] lub arsenu [21], a nawet wielopierwiastkowej specjacji w metalotioneinach i innych białkach [8].

Stosowane dotychczas rutynowo metody nie umożliwiały równoczesnej wielopierwiastkowej analizy skryningowej materiału biologicznego i żywności na zawar-

tość pierwiastków obecnych w próbce. Stało się to możliwe m.in. dzięki zastosowaniu metody ICP-OES z wykorzystaniem sekwencyjnych, a ostatnio jednoczesnych spektrometrów emisyjnych [23]. Analiza taka jest bardzo cenna z uwagi na to, że – jak się wydaje – pozwala na szybkie wykrywanie trucizn nieorganicznych w materiale biologicznym i (lub) żywności dla celów toksykologii sądowej i klinicznej (z określeniem stężenia pierwiastków) oraz ukierunkowanie dalszych badań w przypadkach zatruc nieznaną substancją chemiczną (związkiem metalu lub niemetalu). Stosowano ją m.in. w ochronie środowiska do analizy elementarnej próbek wody, gleby, minerałów oraz ryb [13, 14], herbaty i kawy na zawartość boru [15], próbek geologicznych na zawartość metali ziem rzadkich [39], a także do oznaczania metali we włosach [9, 26]. Optyczna spektrometria emisyjna była również wykorzystywana w badaniach porównawczych w kryminalistyce (badania stopów, popiołów pokremacyjnych, olejów) [4, 33, 36]. Metoda ICP-OES nie jest jeszcze w Polsce rozpowszechniona, zwłaszcza do badania materiału biologicznego. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny przydatności tej metody do wielopierwiastkowej analizy różnych materiałów biologicznych w zastosowaniu do nieorganicznej toksykologii sądowej.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Materiał badawczy do walidacji metody stanowiły próbki płynów ustrojowych (krew, mocza) pobrane od osób żywych ($n = 20$) oraz płyny ustrojowe (krew, mocza, żółć, łącznie $n = 29$) i wycinki narządów wewnętrznych (wątroba, nerki, żołądek, jelita, płuca i mózg) zabezpieczone w trakcie sekcji zwłok ($n = 46$). W próbkach tych wykluczono metodą AAS (technika płomieniowa i zimnych par rtęci) oraz spektrofotometrii w świetle widzialnym obecność trucizn nieorganicznych.

2.2. Odczynniki

Próbki materiału biologicznego mineralizowano w systemie mikrofalowym stężonym kwasem azotowym(V) o specjalnej czystości (Suprapur) oraz 30% nadtlenkiem wodoru cz.d.a. (Merck, Niemcy). Roztwory wzorcowe stosowane do kalibracji przygotowywano przez rozcieńczenie jedno- (Hg, As) lub wielopierwiastkowych (Ag, Al,

B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) standardowych roztworów o stężeniach 1000 mg/ml (Merck, Niemcy). Do przygotowania roboczych roztworów standardów oraz do rozcieńczania próbek używano wody dejonizowanej pochodzącej z systemu oczyszczania wody NANOpure Diamond (Barnstead, Stany Zjednoczone). Dokładność metody oceniono na podstawie badania trzech materiałów certyfikowanych: krwi – Seronorm Whole Blood 2, moczu – Seronorm Trace Elements Urine (SERO AS, Norwegia) oraz wątroby wołowej – Bovine Liver 1577b (NIST, Stany Zjednoczone). Naczynia szklane oraz polipropylenowe przygotowywano poprzez mycie i moczenie (przez noc) w 25% (v/v) kwasie azotowym(V) cz.d.a. (ChemPur, Polska).

2.3. Przygotowanie materiału

Próbki materiału biologicznego roztwarzano w piecu mikrofalowym MLS 1200 Mega (Milestone, Włochy) z użyciem sześciu lub dziesięciu wysokociśnieniowych naczyń teflonowych (o objętościach odpowiednio 160 i 100 ml). Próbki krwi (2 ml), moczu (2–8 ml) oraz wycinków narządów wewnętrznych (1–2 g) z dodatkiem 4 ml kwasu azotowego(V) oraz 1 ml nadtlenu wodoru poddawano mineralizacji zgodnie z programem: 1 min – 250 W, 2 min – 0 W oraz kolejno 250, 400 i 600 W (po 5 min). Uzyskane mineralizaty rozcieńczano do objętości 10 ml (w przypadku próbek o masie do 2 g) lub 25 ml (w przypadku próbek o masie powyżej 2 g). Do czasu analizy zmineralizowane próbki przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

2.4. Metoda

Analizę próbek materiału biologicznego na zawartość metali i niemetalii przeprowadzono przy użyciu plazmowego spektrometru emisyjnego iCAP 6300 duo (Thermo Electron Corp., Stany Zjednoczone), umożliwiającego równoczesną rejestrację pełnego widma emisyjnego próbki w zakresie 166,250 do 847,000 nm przy pomocy detektora ze wstrzykiwaniem ładunku (charge injection device, CID). Spektrometr był wyposażony w cyklonową komorę mgielną z rozpylaczem koncentrycznym. Wykorzystano podwójny system obserwacji plazmy (osiowy i radialny). Podstawowe cechy spektrometru i warunki pomiarowe zastosowane w analizie przedstawiono w tabeli I.

3. Walidacja metody ICP-OES

3.1. Kalibracja metody

Przeprowadzono kalibrację metodą serii wzorców. Krzywe kalibracyjne dla arsenu i rtęci sporządzano na

podstawie pomiarów czterech roztworów wzorcowych (zawierających jednocześnie rtęć i arsen) o stężeniach: 0,10, 0,20, 0,50 oraz 1,00 mg/ml, natomiast dla pozostałych pierwiastków użyto roztworów o stężeniach: 0,01, 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,50 i 2,00 mg/ml. W badaniach wykorzystano linie analityczne o największej intensywności emisji. Gal oraz ind, obecne w roztworze wzorcowym przeznaczonym do analizy metodą ICP-OES, pominięto w badaniach kalibracyjnych ze względu na ich małą przydatność w analizie materiału biologicznego. Przed rozpoczęciem kalibracji dokonywano automatycznej optymalizacji położenia linii spektralnych na detektorze przy pomocy funkcji Auto Peak. W tym celu wykorzystano wielopierwiastkowy roztwór wzorcowy o stężeniu 2,00 mg/ml oraz roztwór arsenu i rtęci o stężeniu 1,000 mg/ml. W badanym zakresie stężeń współczynniki regresji liniowej dla poszczególnych linii spektralnych były większe od 0,999. Wyjątek stanowiły linie spektralne arsenu $\lambda = 449,423$ nm oraz ołowiu $\lambda = 261,418$ nm ($R^2 < 0,999$), dla których krzywe kalibracyjne wykazywały ujemną wartość współczynnika kierunkowego. W przypadku linii potasu ($\lambda = 766,490$ nm) zadowalającą wartość współczynnika korelacji ($R^2 > 0,999$) uzyskano w zakresie stężeń powyżej 0,050 mg/ml.

W próbkach analizowanych bezpośrednio po wykonaniu kalibracji z użyciem roztworów zawierających rtęć zaobserwowano wysokie stężenie tego pierwiastka, zanikające systematycznie w czasie (tzw. efekt pamięci). Stanowi to ograniczenie metody i wymaga zachowania ostrożności przy badaniu materiału na zawartość rtęci.

3.2. Granice wykrywalności i oznaczalności

Granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) obliczono zgodnie z literaturą przedmiotu [25] jako odpowiednio 3- i 10-krotne odchylenie standardowe stężenia pierwiastków w roztworze próby zerowej (4 ml stężonego kwasu azotowego(V) i 1 ml 30% roztworu nadtlenu wodoru). Uzyskane w wyniku 10 równoległych oznaczeń pierwiastków w roztworach pięciu prób zerowych (1:10) średnie wartości granic wykrywalności i oznaczalności zestawiono w tabeli II.

3.3. Precyzja

Precyzję metody wyznaczono na podstawie oznaczeń pierwiastków w 6 równoległe przygotowanych próbkach krwi (2 ml) i wątroby (ok. 2 g) pobranych w trakcie sekcji zwłok 3 osób oraz 10 próbkach moczu (8 ml) pochodzącego od 5 osób żywych. Otrzymane wyniki (średnie) zamieszczono w tabeli III.

3.4. Dokładność metody

Dokładność metody oceniono na podstawie wielopierwiastkowej analizy trzech certyfikowanych materiałów referencyjnych (CRM, Certified Reference Material) – krwi (Seronorm Whole Blood L-2), moczu (Seronorm Trace Element Urine) i wątroby wołowej (NIST Bovine Liver 1577b). Wyniki otrzymane podczas badań trzech równoległych próbek certyfikowanych materiałów referencyjnych: krwi (2 ml), moczu (5 ml) i wątroby wołowej (1 g) zestawiono w tabelach IV, V i VI.

Na wyniki analizy miało również znaczny wpływ rozcieńczenie mineralizatu. Na podstawie badania certyfikowanych materiałów odniesienia (krwi, moczu i wątroby) ustalono, że dla większości pierwiastków najbardziej optymalnym rozcieńczeniem mineralizatu stosowanym w oznaczeniach metodą ICP-OES (przy opisanym w niniejszej pracy sposobie przygotowania próbki) jest rozcieńczenie 10-krotne. Wyjątek stanowią pierwiastki występujące w dużych stężeniach w badanym materiale, takie jak Ca, Mg, Na i K, które wymagają większych rozcieńczeń (1:50 w przypadku krwi i moczu, 1:100 w przypadku narządów) oraz pierwiastki śladowe (Ba, B, Pb, Sr i Cd we krwi oraz Al, As, Ba, Cd, Cu, Hg, Sr i Zn w moczu), które należy oznaczać bez rozcieńczenia mineralizatu.

Dokładność oceniono, badając również odzysk pięciu wybranych pierwiastków (Al, Cd, Cr, Cu i Mn) dodanych w ilości 0,1–1,0 g/ml (lub g/g) do 6 próbek krwi (2 ml) i wątroby (2 g) o znanym składzie pierwiastkowym (zabezpieczonych w czasie sekcji zwłok), a następnie mineralizowanych. Wyniki przedstawiono w tabeli VII. W próbkach krwi i wątroby odzysk Cd, Cu i Mn był zbliżony do 100%. Odzysk Al i Cr w wątrobie oraz Cr we krwi znacznie przekraczał (> 20%) wartość 100%. Przyczyną tego zjawiska mogą być zarówno silne interferencje spektralne pochodzące od żelaza obecnego w dużym stężeniu w tego rodzaju matrycy biologicznej, jak również słaba precyzja metody w pobliżu granicy oznaczalności.

4. Efekty spektralne

Zaobserwowano, że stężenia pierwiastków wyznaczone dla różnych linii spektralnych niekiedy znacznie różniły się między sobą (przykłady ukazuje tabela VIII). Różnice w wyznaczonych stężeniach były najprawdopodobniej efektem interferencji spektralnych – w zależności od oznaczanego pierwiastka i wybranej linii spektralnej sygnały pochodzące od interferentów mogły znajdować się w pobliżu analizowanej linii, uniemożliwiając tym samym prawidłowy pomiar poziomu tła, albo nakładały się na analizowane linie (tzw. koincydencja linii [5]). W tabeli IX zebrano źródła interferencji spektralnych najczęściej występujących w materiale biologicznym.

Długości fal linii spektralnych pierwiastków przeszkadzających (interferentów) w oznaczeniu metali i niemetałów w materiale biologicznym uzyskano przy pomocy narzędzia *wavelength finder* wchodzącego w skład oprogramowania spektrometru.

Stwierdzono, że podczas analizy materiału biologicznego na zawartość pierwiastków śladowych metodą ICP-OES duży wpływ na wyniki oznaczenia mogą mieć żelazo, sód i potas oraz siarka i fosfor. Z powodu występowania interferencji spektralnych, w dalszych badaniach odrzucono następujące linie widmowe: Al = 396,152 nm, B = 249,678 i 249,773 nm, Cd = 226,502 nm (w przypadku próbek krwi z niską zawartością kadmu, gdy stężenie obliczone dla tej linii znacznie odbiega od stężeń wyznaczonych dla pozostałych linii widmowych), Cr = 283,563 i 357,869 nm, Mn = 259,373 nm (za wyjątkiem próbek moczu, z uwagi na niewielką ilość żelaza zawartą w tego rodzaju materiale).

5. Zastosowanie metody ICP-OES do badania materiału sekcyjnego

Do oznaczania wybrano metale ciężkie (pierwiastki z reguły toksyczne), takie jak Pb, Hg, Cd, Ni, Cr, Ag oraz Zn, Mn, Cu i Fe, a także Ba (który wprawdzie nie jest metalem ciężkim, ale jest silnie toksyczny w podwyższonych ilościach), a wśród biopierwiastków: Ca, Mg, Na, K, Sr i Li.

Na podstawie wyników badania metodą ICP-OES materiału sekcyjnego – wycinków narządów wewnętrznych (mózgu, wątroby, nerek, żołądka, jelit, płuc i śledziony) oraz płynów fizjologicznych (krwi, moczu i żółci), łącznie 75 próbek, w których wykluczono wcześniej obecność trucizn nieorganicznych, stwierdzono, że metoda ta nie umożliwia wyznaczenia poziomów referencyjnych niektórych pierwiastków, np. As, Tl, Co, Cr oraz Ni w tkankach, a także Pb, Cd i Hg (z wyjątkiem narządów kumulujących, takich jak wątroba, nerki i śledziona).

6. Dyskusja wyników

Analiza materiału biologicznego metodą optycznej atomowej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie zyskuje wśród technik emisyjnych coraz większą popularność ze względu na prostotę wykonania badań, możliwość jednoczesnego oznaczania wielu pierwiastków, krótki czas pomiaru, dobrą tolerancję na wyższe stężenia soli oraz stosunkowo niewielką ilość efektów matrycowych [6, 10, 20, 23].

Ciągłe udoskonalanie plazmowych spektrometrów emisyjnych (sposobu rozpylania próbki, konstrukcji generatora i układu optycznego oraz rodzaju detektora) powoduje obniżanie granic wykrywalności, zwiększenie rozdzielczości

i lepszą stabilność spektrometru w czasie [23]. Nowoczesne spektrometry ICP-OES stały się przez to użyteczne w badaniach klinicznych [20, 23, 26, 27, 28] oraz w innych dziedzinach: ocenie skażenia środowiska, geologii i różnych gałęziach przemysłu [4, 10, 15, 23, 33, 36, 39].

W przeciwieństwie do używanej rutynowo w analizie materiału sekcyjnego tradycyjnej płomieniowej lub elektrotermicznej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (F-AAS, ET-AAS), wysokoenergetyczna technika plazmowa pozwala na równoczesną rejestrację widm emisyjnych pochodzących od wielu pierwiastków znajdujących się w analizowanej próbce, umożliwiając tym samym wielopierwiastkową analizę skryningową. Za pomocą metody ICP-OES możliwe jest oznaczanie B i innych pierwiastków ważnych z punktu widzenia toksykologicznego, takich jak Ba, Al i Sr, których stężenia spotykane normalnie w tkankach i płynach ustrojowych mieszczą się poniżej granicy oznaczalności metody F-AAS. Przeprowadzone badania wykazały, że metoda ICP-OES pozwala na oznaczenie w jednym lub dwóch cyklach analitycznych nie tylko pierwiastków łatwych do badania metodą F-AAS (np. Zn, Mn, Cu), lecz także B, Ba, Al, Sr, Fe i Cr oraz w niektórych tkankach (nerka, wątroba) – Cd i Hg, a we krwi – Cd, mających duże znaczenie w nieorganicznej toksykologii sądowej. Metodą tą można również z powodzeniem oznaczać biometale (Ca, Mg, K i Na) w różnych próbkach biologicznych.

Niestety metoda ICP-OES nie pozwala na ustalenie stężeń referencyjnych niektórych metali, np. Pb lub Tl. Również oznaczenie innych pierwiastków (m.in. As, Cr, Mn, Ni) w materiale biologicznym jest trudne zwłaszcza we krwi lub w moczu, w których występują one w niewielkich stężeniach. Na przykład we krwi referencyjnej udało się określić stężenie manganu odpowiadające jedynie 76,4% wartości certyfikowanej (tabela IV), a w moczu – stężenie arsenu stanowiące 85% wartości referencyjnej (tabela V). Natomiast w wątrobie wyznaczone stężenie ołowiu ponad czterokrotnie przekracza oczekiwaną wartość. Różnice te mogą być spowodowane z jednej strony zbyt małą czułością niektórych linii analitycznych (Mn, Cr), a z drugiej strony dużym tłem pochodzącym od składników próbki (np. żelaza, którego linie silnie interferują z liniami ołowiu $\lambda = 261,418$ nm i manganu $\lambda = 259,373$ nm). Dla tych metali najbardziej odpowiednia wydaje się bezpłomieniowa metoda AAS (ET-AAS), wystarczająco czuła, ale bardzo czasochłonna i jednopierwiastkowa lub metoda ICP-MS. Subramanian [32] sugerował, że oznaczanie metodą ICP-OES niektórych pierwiastków śladowych (np. Pb, Cd, Mn, Cr, Ni, Sn i V) w próbkach biologicznych wymaga wstępnego zageszczenia i oddzielania analitu od matrycy oraz że każda metoda rozkładu „na mokro” lub „na sucho” stosowana w analizach metodą AAS może być wykorzystana do analizy metodą ICP-OES. Oczywiście, w przypadku badania materiałów pobranych w czasie zatrucia związkami metali

i półmetali (As, Se itp.), gdy stężenia pierwiastków są wyższe, metoda ICP-OES jest bardziej adekwatną metodą. Metodę ICP-OES do oznaczania kilkunastu pierwiastków w materiale biologicznym, pobranym od ludzi lub zwierząt, stosowali już m.in. Rahil-Khazen i in. [27, 28] oraz Mochizuki i in. [20].

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- mimo wielu zalet (duża liczba wykrywanych pierwiastków, szeroki zakres stężeń, stosunkowo krótki czas analizy, dobra precyzja – *RSD* około 1–5% dla większości pierwiastków w różnych matrycach biologicznych) metoda ICP-OES może być jedynie metodą komplementarną do F-AAS;
- metoda ICP-OES może być zastosowana do jedno- lub wielopierwiastkowej analizy metali i niemetalu, np. B;
- w odróżnieniu od metod F-AAS lub ET-AAS, ICP-OES może być metodą skryningową;
- metoda ICP-OES pozwala na ustalenie w jednym toku analitycznym (23-pierwiastkowy wzorzec) w płynach fizjologicznych i narządach wewnętrznych stężeń 17 pierwiastków, w tym B, Al, Ba, Sr (trudnych do oznaczania metodą F-AAS);
- mimo, iż przy zastosowaniu metody ICP-OES osiąga się dużo niższe granice wykrywalności niż przy F-AAS (np. dla Mn, Zn, Ba), dla wielu pierwiastków metoda nie spełnia oczekiwań, nie nadaje się np. do określenia stężeń referencyjnych As, Tl, Pb (z wyjątkiem wątroby i nerki), Hg (z wyjątkiem wątroby, nerki i śledziony) oraz Cr i Ni;
- badając certyfikowane materiały referencyjne (krew, mocz, wątrobę wołową) metodą ICP-OES, najlepsze wyniki uzyskano dla Al, Cd, Co, Hg, Sr, Ba, natomiast najgorsze dla Tl, Pb, i Li; zaobserwowano, że duży wpływ na poprawność wyniku analizy ma dobór właściwego rozcieńczenia próbki;
- największe interferencje spektralne w materiale biologicznym pochodzą od Fe, K, Na oraz P i S.

Wyniki badań własnych i innych autorów pozwalają zatem wnioskować, że nowoczesną metodą ICP-OES można z powodzeniem użyć do oceny zawartości i określenia profilu wielu pierwiastków śladowych w narządach oraz płynach ustrojowych zarówno w badaniach klinicznych, jak i w nieorganicznej analizie toksykologicznej dla celów sądowych. Uzyskane tą metodą stężenia pierwiastków w materiale biologicznym mogą być wykorzystane w celu interpretacji wyników analiz w przypadkach podejrzenia zatrucia związkami nieorganicznymi. Metoda ICP-OES, podobnie jak inne metody, ma jednak pewne ograniczenia.