



CONCENTRATIONS OF ZINC AND MANGANESE IN *POST-MORTEM* TISSUES AND BODY FLUIDS

Teresa LECH¹, Danuta DUDEK-ADAMSKA²

¹ *Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

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

Abstract

Zinc and manganese are essential trace elements (they are constituents of body fluids, various tissues and organs and are involved in many biochemical processes that support life etc.); however, deficiency or excess intake or disturbances in metabolism may lead to diseases and toxicity. For this reason, data on the reference concentrations of zinc and manganese are important to estimate. In this paper, the concentration of zinc and manganese in human tissue (brain, liver, kidney, stomach, small intestine, lung and spleen; total $n = 47$) and body fluids (blood, urine, bile; $n = 29$) obtained from autopsy cases of non-poisoned people (22 males and 8 females, aged 18–56, mean 33.5 years) by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES). The data obtained by the two methods do not vary significantly (Kruskal-Wallis ANOVA test). The accuracy of the methods was checked through the use of standard reference material, Bovine Liver 1557b.

Key words

Zinc; Manganese; Human tissues, Body fluids, FAAS, ICP-OES.

Received 14 December 2008; accepted 2 February 2009

1. Introduction

About 60 elements occur in the human organism in the form of many different chemical compounds (inorganic and organic), of which a minimum of 22 (elements) are necessary for correct functioning [28]. The role of various elements, including essential (macro- and micro-elements) and also toxic metals (including lead, mercury and cadmium) in the functioning of the human organism has been the subject of numerous research works over the past years [2, 14, 19, 22, 26, 28, 29, 31]. Optimum concentrations of microelements ensure correct growth and development of the organism and also correct metabolism. Both a deficiency and an excess of mineral components in the human organism is harmful. A deficiency of microelements usu-

ally results in impairment of defined metabolic paths, weakening of immunity, and in extreme cases, development of diseases and death. An excess, on the other hand, has toxic effects [10, 24, 25]. That is why it is important to establish levels of microelements in the organism in persons who are healthy and not exposed occupationally or environmentally to the action of metals or non-metals (so-called reference levels), and also in various pathological states and in poisonings.

Zinc has been known as an essential element for over 100 years. Its role in the physiology of plants was discovered at the turn of the 19th and 20th centuries. However, it was only in 1940 that the specific biological role of zinc in persons and animals was ascertained, when it was shown that it is essential for catalytic activity of carbonic anhydrase [26]. Currently, about

200 enzymes containing zinc of very diverse structure and activity have been identified in the human organism, such as ethanol and lactate dehydrogenase or superoxide dismutase Zn-SOD (taking part in the elimination of free radicals) [17, 19, 24, 26, 28].

Manganese is also a trace element essential for the functioning of living organisms. Its role in photosynthesis and normal growth in plants was observed many years ago. In animals and humans, it is, amongst other things, a co-factor of enzymes taking part in synthesis of proteoglycans and glycoproteins, regulating the metabolism of carbohydrates and fats. Similarly to zinc, manganese takes part in processes of forming connective tissue and bone and also regulates growth [19, 25].

Current data concerning levels of trace elements in the human organism, in body fluids, tissues and organs are relatively scarce [5, 20, 21]. Whereas information about concentrations of certain highly toxic heavy metals, especially lead, mercury and cadmium [24, 25], and also significant elements [3, 5, 7, 9, 12, 14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25] in body fluids (serum, plasma, blood and urine) appear more frequently in the literature, data on the subject of metal and non-metal content in organ tissues, and thus in autopsy material (biopsies are performed rarely, e.g. in Wilson's disease) are rather sparse [1, 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 16, 20, 29, 30]. Reference levels of elements concerning various organs most frequently originate from the 1980's and 1990's. In the available literature there are also very few data on the subject of concentrations of metals in bile [27].

The aim of this paper was to determine concentrations of zinc and manganese in autopsy material (in sections of internal organs and body fluids) for forensic toxicological purposes by methods of flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) after previous validation and also to compare the obtained results statistically. Levels of zinc and manganese occurring normally in biological material can be used, amongst other things, in the assessment of poisonings by compounds of these elements.

2. Experimental part

2.1. Apparatus

The research was carried out using a Pye Unicam SP-9800 atomic absorption spectrometer (Great Britain) with use of hollow cathode lamps (for zinc and separately for manganese) as a source of characteristic radiation, and also a simultaneous emission spectro-

meter iCAP 6300 Duo produced by Thermo Electron Corporation (United States) with Echelle type optics and also argon plasma, enabling simultaneous recording of a spectrum in the range 166.250 nm – 847.000 nm with the help of a charge injection device (CID) and also double observation of plasma (axially and radially).

Determination of zinc and manganese by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) was carried out at wavelengths of 213.9 nm and 279.5 nm respectively, applying deuterium background correction, whilst inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) was applied using wavelengths of the highest intensity of emission line: 213.856 nm, 202.548 nm and 206.200 nm (for zinc), and 257.610 nm and 260.259 nm (for manganese).

2.2. Reagents

All the reagents used in the research: 65% nitric acid (V) produced by Lachner (Austria) and 95% sulphuric acid (VI) produced by Chempur (Poland) and also basic standard solutions of zinc and manganese, and also a 23-element standard ICP-IV produced by Merck (Germany) of concentration 1 g/l were of analytical purity. Glass and polypropylene vessels before analysis were soaked 24 hours in 30% (v/v) nitric acid solution and then rinsed with deionized water (NANO-pure DIamond apparatus produced by Barnstead, United States).

2.3. Material

The studied material was samples of internal organ sections and body fluids collected during autopsy from the bodies of persons who had died due to causes other than poisoning. In total, 76 samples originating from 8 women and 22 men aged 18 to 56 (average 33.5 years), including: brain ($n = 10$), liver ($n = 14$), kidney ($n = 9$), stomach ($n = 8$), small intestine ($n = 3$), spleen ($n = 1$), lung ($n = 2$), blood ($n = 18$), urine ($n = 4$), bile ($n = 7$).

Furthermore, in order to determine the accuracy of the applied methods, standard reference material (SRM) "Bovine Liver 1577b" (National Institute of Standards & Technology, United States) was also subjected to analysis.

2.4. Preparing material for analysis

Sections of internal organs were broken into small pieces by hand, whereas samples of blood, urine and bile were mixed with the help of a Vortex, and then weighed out (10 g of sections of organs, 2–10 ml

blood, urine or bile) and then a mixture of concentrated acids (2 ml sulphuric and 10 ml nitric) was added. Mineralisation was carried out by the classical method in a closed system in Bethge apparatuses. Mineralisates were quantitatively transferred with the help of de-ionised water to a volume of 20 ml.

Samples of reference material and also a reagent sample were prepared in an analogous way. Before carrying out analysis, mineralizates were stored in a refrigerator.

2.5. Validation of methods

2.5.1. Linearity

Standards of zinc and manganese for analysis by the FAAS method were prepared from solutions of basic standards of these elements (1 g/l), and for analysis by the ICP-OES method from the 23-element standard solution (1 g/l) in the range from 0 to 2 g/ml by appropriate dilution with de-ionized water.

The calibration curves were linear for zinc in the range 0–0,8 g/ml, and for manganese in the range 0–1.0 g/ml, by the FAAS method, whereas, for both zinc and manganese in the whole studied range of concentrations (up to 2 g/ml), when tested using the ICP-OES method.

2.5.2. Limit of detection and quantification

For the reagent sample, the limit of detection (*LOD*) was accepted to be 3 standard deviations, and the limit of quantification (*LOQ*) – ten standard deviations.

10 measurements of absorbance for three parallel samples were taken, obtaining on average by the FAAS method: for zinc, *LOD* = 0.009 g/ml and *LOQ* = 0.03 g/ml and for manganese, *LOD* = 0.03 g/ml and *LOQ* = 0.10 g/ml, and by the ICP-OES method: *LOD* = 0.0001 g/ml and *LOQ* = 0.0003 g/ml for zinc and *LOD* = 0.0002 g/ml and *LOQ* = 0.0007 g/ml – for manganese. From the above data, it transpires that limits of detection and quantitation of zinc and manganese are respectively about 100 times and 150 times smaller for the ICP-OES method than for the FAAS method.

2.5.3. Precision of the method

The precision of the method was determined on the basis of results of determinations of zinc and manganese in 5/3 samples of mineralizates: blood, liver and brain (various mineralizates for both methods). The relative standard deviation (*RSD*) (expressed as a percentage) for ten measurements of one sample was taken as a measure of precision. The obtained results are presented in Table I. It can be seen that the precision of determination of zinc in the studied samples (both by the FAAS and ICP-OES method) was better than that of manganese (*RSD* for zinc < *RSD* for manganese). Generally, the ICP-OES method turned out to be more precise (*RSD* < 5%) than FAAS for determination of zinc and manganese in various biological samples.

TABLE I. PRECISION OF THE DETERMINATION OF ZINC AND MANGANESE IN BLOOD, BRAIN AND LIVER (*n* = 10)

Method	Material	Element	Mean [g/g]	Median [g/g]	Range [g/g]	<i>SD</i>	<i>RSD</i> [%]
FAAS	Blood	Zn	6.82	6.83	6.74–6.96	0.08	1.17
		Mn	< <i>LOQ</i>	< <i>LOQ</i>	< <i>LOQ</i>	–	–
	Brain	Zn	8.66	8.65	8.47–8.84	0.12	1.39
		Mn	0.17	0.16	0.14–0.18	0.02	11.8
	Liver	Zn	30.1	30.0	29.7–30.5	0.24	0.80
		Mn	0.88	0.89	0.85–0.91	0.02	2.27
ICP-OES	Blood	Zn	14.0	14.0	14.0–14.1	0.03	0.21
		Mn	0.24	0.24	0.23–0.24	0.01	4.17
	Brain	Zn	9.51	9.40	9.06–10.1	0.37	3.89
		Mn	0.21	0.20	0.20–0.22	0.01	4.76
	Liver	Zn	47.7	47.6	47.5–47.9	0.20	0.42
		Mn	1.83	1.83	1.82–1.83	0.01	0.55

SD – standard deviation; *RSD* – relative standard deviation; *LOQ* – limit of quantification.

2.5.4. Accuracy of determination

The accuracy of the determination was checked by analysing samples of reference material – SRM Bovine Liver 1577b of certified content of certain metals, including zinc and manganese. Three samples of lyophilised liver (mass approx. 1 g) were mineralised and subjected to analysis by two methods, similarly to the studied samples. As can be seen in Table II, concentrations of zinc and manganese (averages for three parallel samples of mass 1 g) in reference material determined by the FAAS method were situated within the lower part of the range of certified values, whereas concentrations obtained by the ICP-OES method – in the upper part.

The biggest differences in concentrations detected in lyophilised liver were ascertained for manganese. These may stem from various chemical and spectral interferences in both methods (FAAS and ICP-OES). It should be mentioned that liver contains large amounts of iron, which is a source of much interference (in the ICP-OES method, for example, a strengthening of the signal can be observed due to interference from iron with the manganese line 259.373 nm, which should be rejected in further analyses). Limits of quantitation of zinc and manganese are also different in the two methods.

3. Results of determination of zinc and manganese in biological material

Concentrations of zinc and manganese in body fluids (blood, urine and bile – in 29 samples in total) and in sections of internal organs collected during autopsy (liver, kidney, stomach, intestines, duodenum, lungs and spleen – in 47 samples in total) determined by FAAS and ICP-OES methods are presented in Table III. By applying the Kolmogorov-Smirnov test, it was established that for most types of studied biological materials, the distribution of concentrations does not fulfil conditions of a normal distribution. In connection with this, differences in concentrations of zinc

and manganese determined by the two above mentioned methods were studied by applying the Kruskal-Wallis ANOVA test for non-parametric systems. A lack of statistically significant differences ($p = 0.05$) was ascertained. Results are presented in Figures 1 and 2.

The obtained data indicate that in the case of determining concentrations of zinc and manganese in body fluids and internal organs, the FAAS and ICP-OES methods – allowing achievement of results that do not vary statistically – can be applied interchangeably. However, the ability to determine several elements in the course of one analysis in a relatively short period of time, especially in a larger series of samples when using the ICP-OES method, is a strong argument in favour of using this method in these types of determinations.

4. Discussion of results

The detected concentrations of zinc in blood and urine in a group of adults (18–56 years) in the Polish population generally fell within ranges of concentrations established by other authors [3, 5, 16, 20]; however, for a more accurate comparison, it would be advisable to exclude extreme results – e.g. content of zinc above 150 g/g in two samples of liver and above 8 g/ml in certain samples of blood – which may suggest pathological changes in the organism of persons from whom the samples originated or possible contamination of samples before analysis. Iyengar et al. [9], for example, stated that average concentration of zinc in blood is 6.5 g/ml (median 6.4 g/ml) in the range 4.4–8.6 g/ml, whilst in the liver 56 g/g (median 55 g/g) in the range 32–70 g/g. Rahil-Khazen et al. [20], however, detected in the liver on average 66.3 g Zn/g, with a median of 60.4 g Zn/g in the range 40.5–110.8 g Zn/g, and in the spleen – 17.2 (median 16.9 in the range 12.9–24.1) g Zn/g. Similar concentrations of zinc in blood (6.34 ± 0.21 g/ml in the range from 3.5 do 8.8 g/ml) were also ascertained by Minoia et al. [18]. Reference values of zinc in urine

TABLE II. ACCURACY OF ZINC AND MANGANESE IN SRM BOVINE LIVER 1577b BY FAAS AND ICP-OES

Element	Method	Concentration found [g/g]	Certified value [g/g]	Recovery [%]
Zn	FAAS	117 ± 0.70	127 ± 16.0	92.1
	ICP-OES	133 ± 0.83		105
Mn	FAAS	8.78 ± 0.20	10.5 ± 1.70	83.6
	ICP-OES	11.3 ± 0.07		108

TABLE III. CONCENTRATION OF ZINC AND MANGANESE IN *POST-MORTEM* MATERIAL

Material (no. of samples)	Parameter	Concentration of element [g/g lub g/ml]			
		Zn		Mn	
		FAAS	ICP-OES	FAAS	ICP-OES
Blood (n = 18)	Mean	14.8	12.7	0.17	0.30
	Median	12.5	10.8	0.16	0.14
	SD	6.80	6.50	0.12	0.30
	Min	7.00	7.10	< LOQ	0.00
	Max	28.8	31.9	0.40	0.90
Urine (n = 4)	Mean	2.90	2.80	< LOQ	0.07
	Median	2.30	2.40	< LOQ	0.08
	SD	1.70	1.30	–	0.04
	Min	1.60	1.90	< LOQ	0.02
	Max	5.40	4.70	0.13	0.11
Bile (n = 7)	Mean	6.10	7.90	1.51	1.50
	Median	5.40	5.80	0.66	0.58
	SD	3.80	7.80	1.80	1.69
	Min	3.20	2.70	0.41	0.42
	Max	13.9	25.2	5.33	4.73
Brain (n = 10)	Mean	10.7	10.4	0.20	0.22
	Median	10.6	10.6	0.20	0.22
	SD	3.00	1.70	0.06	0.05
	Min	4.00	7.90	0.11	0.16
	Max	14.5	14.0	0.32	0.33
Stomach (n = 8)	Mean	13.4	13.4	0.34	0.38
	Median	12.7	12.9	0.28	0.30
	SD	3.30	3.00	0.17	0.21
	Min	9.20	9.30	0.14	0.15
	Max	20.7	19.1	0.67	0.78
Small intestine (n = 3)	Mean	15.9	14.2	0.88	0.98
	Median	18.0	17.7	0.81	0.96
	SD	3.60	6.30	0.73	0.79
	Min	11.8	6.90	0.19	0.20
	Max	18.1	18.0	1.65	1.78
Liver (n = 14)	Mean	65.1	65.8	0.96	1.14
	Median	53.3	52.3	0.95	1.14
	SD	50.5	50.0	0.36	0.47
	Min	22.0	22.2	0.41	0.45
	Max	178.5	174.0	1.61	2.00
Kidney (n = 9)	Mean	37.2	35.7	0.53	0.61
	Median	38.4	38.0	0.53	0.60
	SD	11.6	9.70	0.09	0.16
	Min	15.1	17.4	0.36	0.35
	Max	49.0	46.6	0.66	0.94
Lung (n = 2)	Mean	16.5	15.5	0.12	0.11
	Median	16.5	15.5	0.12	0.11
	SD	3.20	3.00	0.04	0.04
	Min	14.2	13.3	< LOQ	0.08
	Max	18.7	17.6	0.14	0.14
Spleen (n = 1)	Value	31.9	30.1	0.60	0.55

LOQ – limit of quantification.

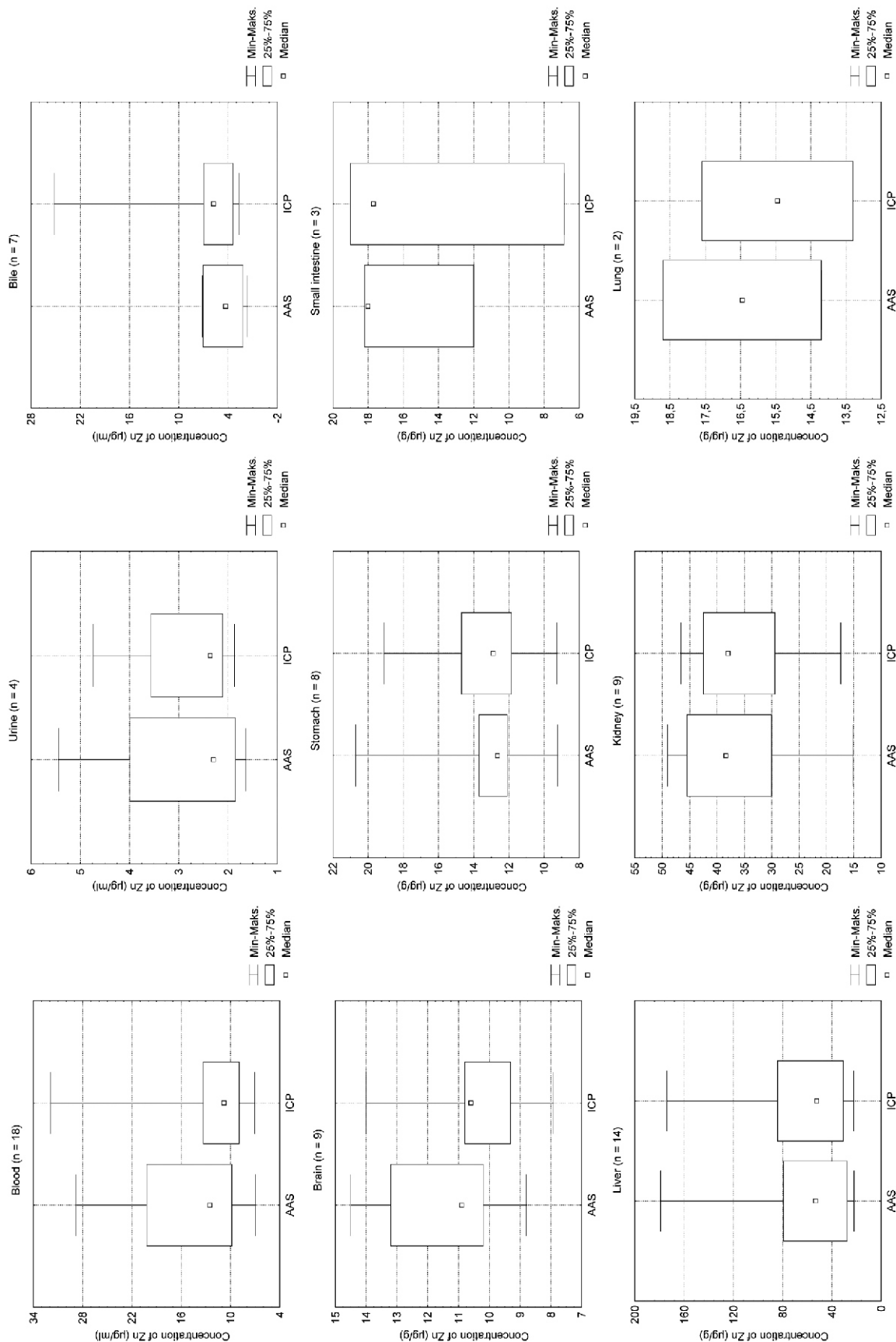


Fig. 1. Comparison of the concentrations (medians) of zinc in biological material by FAAS and ICP-OES (Kruskal-Wallis ANOVA test).

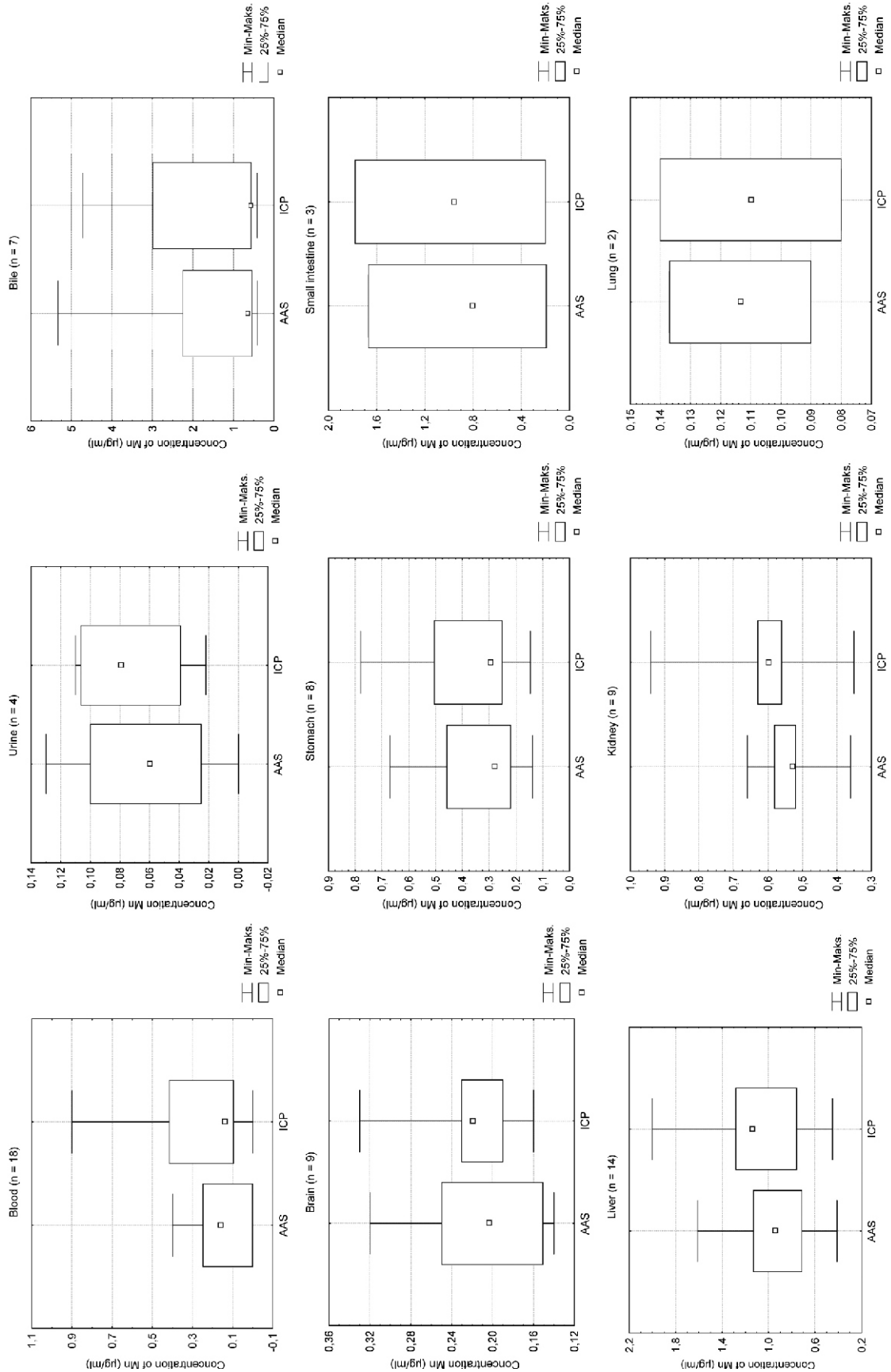


Fig. 2. Comparison of the concentrations (medians) of manganese in biological material by FAAS and ICP-OES (Kruskal-Wallis ANOVA test).

given by Minoia et al. for inhabitants of Italy were, however, 0.456 ± 0.058 g Zn/ml in the range 0.266–0.846 g/ml.

In the present studies, an accumulation in the liver, kidney and spleen was observed. Other authors already made a similar observation earlier [24]. The greatest concentration of manganese was noted, however, in the liver and intestine, with a significant amount also ascertained in bile, kidney and spleen.

Similarly to zinc, the determined concentrations of manganese partly coincided with those obtained by other authors [3, 5, 11, 15]. Rahil-Khazen et al. [20] discovered e.g. in liver, on average 1.32 g Mn/g, with a median of 1.25 g Mn/g in the range 0.61–2.43 g Mn/g, in the spleen – on average 0.082 g Mn/g, with a median and in the range – 0.067 (0.003–0.234) g Mn/g. According to Minoi et al. [18] and also Hamilton et al. [7] average concentrations of manganese in blood for the Italian and English population are respectively 0.0088 g/ml and 0.010 g/ml, and in urine – 0.001 g/ml and 0.002 g/ml.

The concentrations of zinc and manganese determined in biological material in this study on the basis of a relatively small number of samples (76) cannot be representative of the Polish population; however, they can constitute a contribution to results of broader, more objective studies.

5. Conclusions

On the basis of studies carried out, the following conclusions can be drawn:

- the detected concentrations of zinc and manganese on the whole lie within the range of concentrations put forward by other authors;
- zinc accumulates most in the liver, kidneys and spleen, and manganese in the liver and intestines and also in bile, kidneys and spleen;
- concentrations of zinc and manganese determined by the FAAS and ICP-OES methods are comparable (there is a lack of statistically significant differences);
- results obtained by the ICP-OES method are more precise; this method is also more sensitive for zinc and manganese (about 100 and 150 times respectively for zinc and manganese) than FAAS;
- the data constitute a contribution to results of population studies concerning concentrations of metals in biological material, and in particular in autopsy material, used for interpretation of results of chemo-toxicological analysis in expert opinions concerning the cause of poisonings.

References

1. Aalbers T. G., Houtman J. P. W., Makkink B., Trace-element concentrations in human autopsy tissue, *Clinical Chemistry* 1987, 33, 2057–2064.
2. Andrasi E., Igaz S., Szoboszlai N. [et al.], Several methods to determine heavy metals in the human brain, *Spectrochimica Acta Part B* 1999, 54, 819–825.
3. Bárány E., Bergdahl I. A., Bratteby L. E. [et al.], Relationships between trace element concentrations in human blood and serum, *Toxicological Letters* 2002, 134, 177–184.
4. Bem E. M., Orłowski C., Piotrowski J. K. [et al.], Cadmium, zinc, copper, and metallothionein levels in the kidney and liver of inhabitants of Upper Silesia (Poland), *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1993, 65, 57–63.
5. Besteman A. D., Bryan G. K., Lau N. [et al.], Multielement analysis of whole blood using a capacitively coupled microwave plasma atomic emission spectrometer, *Microchemical Journal* 1999, 61, 240–246.
6. Gerhardsson L., Englyst V., Lundström N. G. [et al.], Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2002, 16, 261–266.
7. Hamilton E. I., Sabbioni E., Van der Venne M. T., Element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. VI. Review of elements in blood, plasma and urine and critical evaluation of reference values for the United Kingdom population, *The Science of the Total Environment* 1994, 158, 165–190.
8. Iyengar G. V., Reevaluation of the trace element content in reference man, *Radiation Physics and Chemistry* 1998, 51, 545–560.
9. Iyengar V., Woittiez J., Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values, *Clinical Chemistry* 1988, 34, 474–481.
10. Kobylecka K., Lech T., Cynk i jego połączenia w praktyce toksykologii sądowej, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1994, 44, 13–18.
11. Lech T., Zastosowanie atomowej spektrometrii absorpcyjnej do oznaczania manganu w materiale biologicznym i żywności, *Zagadnień kryminalistyki* 1990, 23, 17–23.
12. Lech T., Kobylecka K., Fizjologiczne stężenia cynku w płynach ustrojowych, *Z zagadnień nauk sądowych* 1994, 30, 93–97.
13. Lyon T. D. B., Fell G. S., Trace elements in autopsy tissue, *Food Chemistry* 1992, 43, 299–306.

Corresponding author

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

14. Marcó L. M., Greaves E. D., Alvarado J., Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization, *Spectrochimica Acta Part B* 1999, 54, 1469–1480.
15. Marcó L. M. P., Hernández 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.
16. Markiewicz J., Kobylecka K., Lech T. [et al.], Stężenie ołowiu, kadmu, cynku i miedzi w wątrobie i nerkach mieszkańców południowej części Polski, *Z zagadnień kryminalistyki* 1992, 26, 28–32.
17. Marriott L. D., Foote K. D., Kimber A. C. [et al.], Zinc, copper, selenium and manganese blood levels in preterm infants, *Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition* 2007, 92, F494–F497.
18. Minoia C., Sabbioni E., Apostoli P., Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects, *The Science of the Total Environment* 1990, 95, 89–105.
19. Pasternak K., Floriańczyk B., *Metale życia: wybrane metale i ich rola w funkcjonowaniu organizmu człowieka*, Wydawnictwo Folium, Lublin 1995.
20. Rahil-Khazen R., Bolann B. J., Myking A. [et al.], Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2002, 16, 15–25.
21. Rahil-Khazen R., Bolann B. J., Ulvik R. J., Trace element reference values in serum determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2000, 38, 765–772.
22. Romero C. D., Sánchez P. H., Blanco F. L. [et al.], Serum copper and zinc concentrations in a representative sample of Canarian population, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2002, 16, 75–81.
23. Rügauer M., Klein J., Kruse-Jarres J. D., Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults, *Journal of Trace Elements and Medicine and Biology* 1997, 11, 92–98.
24. Sanstead H. H., Zinc, [in]: *Handbook on the toxicology of metals*, Nordberg G. F., Fowler B. A., Nordberg M. [et al., eds.], Elsevier, Academic Press, Amsterdam 2007.
25. Sarić M., Lucchini R., Manganese, [in]: *Handbook on the toxicology of metals*, Nordberg G. F., Fowler B. A., Nordberg M. [et al., eds.], Elsevier, Academic Press, Amsterdam 2007.
26. Schlegel-Zawadzka M., Biochemiczna rola cynku w organizmie człowieka, *Zeszyty Naukowe Komitetu PAN „Człowiek i środowisko”* 2002, 33, 39–48.
27. Schnier C., Benn H. P., Multielement investigation of human bile by means of instrumental neutron activation analysis, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1990, 142, 433–443.
28. Somer E., *Encyklopedia witamin i składników mineralnych*, Wydawnictwo Amber, Warszawa 1997.
29. Treble R. G., Thompson T. S., Lynch H. R., Determination of copper, manganese and zinc in human liver, *Bio-Metals* 1998, 11, 49–53.
30. Yoo Y., Lee S., Yang J. [et al.], Distribution of heavy metals in normal Korean tissues, *Problems of Forensic Sciences* 2000, 43, 283–289.
31. Zadorozhajna T. D., Little R. E., Miller R. K. [et al.], Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, and zinc in human placentas from two cities in Ukraine, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2000, 61, 255–263.

STĘŻENIA CYNKU I MANGANU W SEKCYJNYCH TKANKACH I PŁYNACH USTROJOWYCH

1. Wprowadzenie

W organizmie człowieka występuje około 60 pierwiastków w postaci wielu różnych związków chemicznych (nieorganicznych i organicznych), z których do właściwego funkcjonowania konieczna jest obecność minimum 22 [28]. Rola różnych pierwiastków, w tym niezbędnych (makro- i mikroelementów) oraz toksycznych metali (m.in. ołowiu, rtęci i kadmu) w funkcjonowaniu organizmu człowieka była tematem licznych prac badawczych w ciągu minionych lat [2, 14, 19, 22, 26, 28, 29, 31]. Optymalne stężenie mikropierwiastka zapewnia prawidłowy wzrost i rozwój organizmu oraz właściwy metabolizm. Zarówno niedobór, jak i nadmiar składników mineralnych w organizmie ludzkim, jest szkodliwy. Niedobór mikroelementów zwykle skutkuje upośledzeniem przebiegu określonych szlaków metabolicznych, osłabieniem odporności, a w skrajnych przypadkach rozwojem chorób i śmiercią. Nadmiar natomiast wywołuje działanie toksyczne [10, 24, 25]. Dlatego też istotne jest ustalenie poziomów mikroelementów w organizmie u osób zdrowych i nienarażonych zawodowo lub środowiskowo na działanie metali lub niemetali (tzw. poziomów referencyjnych) oraz w różnych stanach patologicznych i w zatruciach.

Cynk jest znany jako niezbędny pierwiastek od ponad 100 lat. Na przełomie XIX i XX wieku została odkryta jego rola w fizjologii roślin. Jednak dopiero w 1940 roku określono specyficzną biologiczną rolę cynku u ludzi i zwierząt, kiedy to wykazano, że jest on niezbędny dla katalitycznej aktywności anhidrazy węglanowej [26]. Obecnie w organizmie człowieka zidentyfikowano około 200 enzymów zawierających cynk o bardzo różnorodnej budowie i działaniu, jak np. dehydrogenaza etanolowa i mleczanowa lub dysmutaza nadtlenkowa Zn-SOD (biorąca udział w eliminacji wolnych rodników) [17, 19, 24, 26, 28].

Mangan należy również do pierwiastków śladowych niezbędnych dla funkcjonowania organizmów żywych. Jego rolę w prawidłowym wzroście roślin w fotosyntezie zaobserwowano wiele lat temu. U zwierząt i ludzi jest m.in. kofaktorem enzymów biorących udział w syntezie proteoglikanów i glikoprotein, regulujących metabolizm węglowodanów i tłuszczów. Podobnie jak cynk, mangan bierze udział w procesach formowania tkanki łącznej i kości oraz reguluje wzrost [19, 25].

Aktualnych danych dotyczących poziomów pierwiastków śladowych w organizmie człowieka, w płynach ustrojowych, tkankach i narządach, jest stosunkowo niewiele [5, 20, 21]. O ile w piśmiennictwie pojawiają się częściej informacje o stężeniach niektórych silnie tok-

sycznych metali ciężkich, zwłaszcza ołowiu, rtęci i kadmu [24, 25], a także pierwiastków istotnych [3, 5, 7, 9, 12, 14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25] w płynach ustrojowych (surowica, osocze, krew i mocz), to dane na temat zawartości metali i niemetali w tkankach narządów, a więc w materiale sekcyjnym (biopsje wykonuje się rzadko, np. w chorobie Wilsona) są raczej nieliczne [1, 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 16, 20, 29, 30]. Poziomy referencyjne pierwiastków dotyczące różnych narządów pochodzą najczęściej z lat 80. i 90. XX wieku. W dostępnym piśmiennictwie jest również bardzo niewiele danych na temat stężeń metali w żółci [27].

Celem niniejszej pracy było wyznaczenie stężeń cynku i manganu w materiale sekcyjnym (w wycinkach narządów wewnętrznych oraz płynach ustrojowych) na potrzeby toksykologii sądowej metodami płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) i optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES) po uprzednim ich zwalidowaniu, a także porównanie statystyczne otrzymanych wyników. Poziomy cynku i manganu występujące normalnie w materiale biologicznym mogą być wykorzystywane m.in. do oceny zatruc związkami tych pierwiastków.

2. Część doświadczalna

2.1. Aparatura

Badania wykonano przy zastosowaniu spektrometru do absorpcji atomowej SP-9800 firmy Pye Unicam (Wielka Brytania) z wykorzystaniem lamp z katodą wewnętrzną (dla cynku i oddzielnie manganu) jako źródła promieniowania charakterystycznego, jak również jednoczesnego spektrometru emisyjnego iCAP 6300 Duo firmy Thermo Electron Corporation (Stany Zjednoczone) z optyką typu Echelle oraz plazmą argonową, umożliwiającego równoczesną rejestrację widma w zakresie 166,250 nm do 847,000 nm przy pomocy detektora ze wstrzykiwaniem ładunku (CID) oraz podwójną obserwację plazmy (osiowo i radialnie).

Oznaczenie cynku i manganu metodą płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (FAAS) przeprowadzono przy długościach fal odpowiednio 213,9 nm i 279,5 nm, stosując deuterową korekcję tła, natomiast metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES) z wykorzystaniem długości fali o największych intensywnościach linii emisyjnej: 213,856 nm, 202,548 nm i 206,200 nm (dla cynku) oraz 257,610 nm i 260, 259 nm (dla manganu).

2.2. Odczynniki

Wszystkie odczynniki stosowane w badaniach: 65% kwas azotowy (V) firmy Lachner (Austria) i 95% kwas siarkowy (VI) firmy Chempur (Polska) oraz roztwory podstawowe wzorców cynku i manganu, a także 23-pierwiastkowy wzorzec ICP-IV firmy Merck (Niemcy) o stężeniu 1 g/l, były analitycznej czystości. Naczynia szklane i polipropylenowe przed analizą moczo 24 godziny w 30% roztworze (v/v) kwasu HNO₃, a następnie płukano wodą dejonizowaną (aparatus NANOPure Diamond firmy Barnstead, Stany Zjednoczone).

2.3. Materiał

Materiał badany stanowiły próbki wycinków narządów wewnętrznych oraz płynów ustrojowych pobranych w czasie sekcji zwłok od osób zmarłych z przyczyn innych niż zatrucie. Łącznie zbadano 76 próbek pochodzących od 8 kobiet i 22 mężczyzn w wieku od 18 do 56 lat (średnio 33,5 lat), w tym: mózg ($n = 10$), wątroba ($n = 14$), nerka ($n = 9$), żołądek ($n = 8$), jelito cienkie ($n = 3$), śledziona ($n = 1$), płuco ($n = 2$), krew ($n = 18$), mocz ($n = 4$), żółć ($n = 7$).

Ponadto w celu określenia dokładności stosowanych metod analizie poddano również certyfikowany materiał odniesienia – *standard reference material* (SRM) "Bovine Liver 1577b" (Narodowy Instytut Norm i Technologii, Stany Zjednoczone).

2.4. Przygotowanie materiału do analizy

Wycinki narządów wewnętrznych rozdrobniono ręcznie, natomiast próbki krwi, moczu i żółci mieszano za pomocą Vortexu, a następnie odważano (10 g wycinków narządów, 2–10 ml krwi, moczu lub żółci) i zadawano mieszaniną stężonych kwasów (2 ml siarkowego i 10 ml azotowego). Mineralizację prowadzono sposobem klasycznym w systemie zamkniętym w aparatach Bethgego. Mineralizaty przenoszono ilościowo za pomocą wody dejonizowanej do objętości 20 ml.

Próbki materiału referencyjnego oraz próba odczynnikowa były przygotowane w analogiczny sposób. Przed wykonaniem analizy mineralizaty przechowywano w lodówce.

2.5. Walidacja metod

2.5.1. Zakres prostoliniowości krzywych kalibracyjnych

Wzorce cynku i manganu do analizy metodą FAAS przygotowano z roztworów wzorców podstawowych tych pierwiastków (1 g/l), a do analizy metodą ICP-OES z roztworu wzorca 23-pierwiastkowego (1 g/l) w zakresie

od 0 do 2 g/ml przez odpowiednie rozcieńczenie wodą dejonizowaną.

W metodzie FAAS stwierdzono prostoliniową zależność absorbancji od stężenia dla cynku w zakresie 0–0,8 g/ml, a dla manganu 0–1,0 g/ml. W przypadku metody ICP-OES zarówno dla cynku, jak i dla manganu, krzywa kalibracyjna była prostoliniowa w całym badanym zakresie stężeń (do 2 g/ml).

2.5.2. Granica wykrywalności i oznaczalności

Za miarę granicy wykrywalności (*LOD*) przyjęto trzykrotne odchylenie standardowe dla próby odczynnikowej, a granicy oznaczalności (*LOQ*) – dziesięciokrotne. Wykonano 10 pomiarów absorbancji dla 3 równoległych próbek, uzyskując średnio metodą FAAS: dla cynku *LOD* = 0,009 g/ml i *LOQ* = 0,03 g/ml oraz dla manganu *LOD* = 0,03 g/ml i *LOQ* = 0,10 g/ml, a metodą ICP-OES odpowiednio: *LOD* = 0,0001 g/ml i *LOQ* = 0,0003 g/ml dla cynku oraz *LOD* = 0,0002 g/ml i *LOQ* = 0,0007 g/ml – dla manganu. Z powyższych danych wynika, że granice wykrywalności i oznaczalności cynku i manganu są odpowiednio około 100-krotnie i 150-krotnie mniejsze dla metody ICP-OES niż dla metody FAAS.

2.5.3. Precyzja metody

Precyzję metody określono na podstawie wyników oznaczeń cynku i manganu w 5 próbkach mineralizatów: krwi, wątroby i mózgu (różnych mineralizatów dla obu metod). Za miarę precyzji przyjęto względne odchylenie standardowe (wyrażone w procentach) z 10 pomiarów jednej próbki. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli I. Można zauważyć, że precyzja oznaczenia cynku w badanych próbkach (zarówno metodą FAAS, jak i ICP-OES) była lepsza niż oznaczenia manganu (*RSD* dla cynku < *RSD* dla manganu). Ogólnie metoda ICP-OES okazała się bardziej precyzyjna (*RSD* < 5%) niż FAAS dla oznaczania cynku i manganu w różnych próbkach biologicznych.

2.5.4. Dokładność oznaczenia

Dokładność oznaczenia sprawdzono, badając próbki materiału referencyjnego – SRM Bovine Liver 1577b o certyfikowanej zawartości niektórych metali, w tym cynku i manganu. Trzy próbki liofilizowanej wątroby (o masie około 1 g) zmineralizowano i poddano analizie dwiema metodami, podobnie jak próbki badane. Jak wynika z tabeli II, stężenia cynku i manganu (średnie dla trzech równoległych próbek o masie 1 g) w materiale referencyjnym wyznaczone metodą FAAS mieściły się w dolnym zakresie certyfikowanych wartości, natomiast uzyskane metodą ICP-OES – w górnym.

Największe różnice w stężeniach wykrytych w liofilizowanej wątrobie stwierdzono dla manganu. Mogą one wynikać z różnych interferencji chemicznych i spektralnych w obu metodach (FAAS i ICP-OES). Należy nadmienić, że wątroba zawiera duże ilości żelaza, które jest źródłem licznych interferencji (w metodzie ICP-OES obserwuje się na przykład wzmocnienie sygnału z powodu interferencji od żelaza dla linii manganu 259,373 nm, którą należałoby odrzucić w dalszych badaniach). Różne są również granice oznaczalności cynku i manganu w obu metodach.

3. Wyniki oznaczeń cynku i manganu w materiale biologicznym

Wyznaczone metodami FAAS i ICP-OES stężenia cynku i manganu w płynach ustrojowych (w krwi, moczu i żółci – łącznie w 29 próbkach) i w wycinkach narządów wewnętrznych pobranych w czasie zwłok (w wątrobie, nerce, żołądku, jelitach, dwunastnicy, płucach i śledzionie – łącznie w 47 próbkach) zebrano w tabeli III. Stosując test Kołgomorowa-Smirnowa ustalono, że dla większości rodzajów badanych materiałów biologicznych rozkład stężeń nie spełnia warunków rozkładu normalnego. W związku z tym różnicę stężeń cynku i manganu wyznaczonych dwiema wyżej wymienionymi metodami zbadano przy zastosowaniu testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa dla układów nieparametrycznych. Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic ($p = 0,05$). Wyniki przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Uzyskane dane wskazują, że w przypadku wyznaczania stężenia cynku i manganu w płynach ustrojowych i narządach wewnętrznych, metody FAAS i ICP-OES – pozwalające na otrzymywanie nieróżniących się statystycznie wyników – mogą być stosowane zamiennie. Niemniej jednak możliwość oznaczenia kilku pierwiastków w toku jednej analizy w stosunkowo krótkim czasie, zwłaszcza w większej serii próbek, przemawia za korzystniejszym zastosowaniem metody ICP-OES w tego typu oznaczeniach.

4. Dyskusja wyników

Wykryte stężenia cynku we krwi i moczu w grupie osób dorosłych (18–56 lat) należących do populacji polskiej mieściły się na ogół w zakresach stężeń ustalonych przez innych autorów [3, 5, 16, 20], przy czym do dokładniejszego porównania należałoby odrzucić wyniki skrajne – np. zawartość cynku powyżej 150 g/g w dwóch próbkach wątroby i ponad 8 g/ml w niektórych próbkach krwi – mogące sugerować zmiany chorobowe w organizmie osób, od których próbki pochodziły lub ewentualne zanieczyszczenie próbek przed analizą. Iyengar

i in. [9] na przykład stwierdzili, że średnie stężenie cynku we krwi wynosi 6,5 g/ml (mediana 6,4 g/ml) w zakresie 4,4–8,6 g/ml, a w wątrobie 56 g/g (mediana 55 g/g) w zakresie 32–70 g/g. Rahil-Khazen i in. [20] wykryli natomiast w wątrobie średnio 66,3 g Zn/g, przy czym mediana wynosiła 60,4 g Zn/g w zakresie 40,5–110,8 g Zn/g, a w śledzionie – 17,2 (mediana 16,9 w zakresie 12,9–24,1) g Zn/g. Zbliżone stężenia cynku we krwi ($6,34 \pm 0,21$ g/ml w zakresie od 3,5 do 8,8 g/ml) stwierdzili także Minoia i in. [18]. Wartości referencyjne cynku w moczu podawane przez Minoia i in. dla mieszkańców Włoch wynosiły natomiast $0,456 \pm 0,058$ g Zn/ml w zakresie 0,266–0,846 g/ml.

W niniejszych badaniach zaobserwowano kumulację cynku w wątrobie, nerce i śledzionie. Podobną obserwację poczynili już wcześniej inni autorzy [24]. Największe stężenie manganu odnotowano natomiast w wątrobie i jelicie, ale znaczne jego ilości stwierdzono także w żółci, nerce i śledzionie.

Podobnie jak dla cynku, wyznaczone stężenia manganu częściowo pokrywały się z tymi, które uzyskali inni autorzy [3, 5, 11, 15]. Rahil-Khazen i in. [20] wykryli np. w wątrobie średnio 1,32 g Mn/g, przy czym mediana wynosiła 1,25 g Mn/g w zakresie 0,61–2,43 g Mn/g, w śledzionie – średnio 0,082 g Mn/g, a mediana i zakres – 0,067 (0,003–0,234) g Mn/g. Według Minoi i in. [18] oraz Hamiltona i in. [7] średnie stężenia manganu we krwi dla populacji włoskiej i angielskiej wynoszą odpowiednio 0,0088 g/ml i 0,010 g/ml, a w moczu – 0,001 g/ml i 0,002 g/ml.

Wyznaczone w niniejszej pracy stężenie cynku i manganu w materiale biologicznym na podstawie badania stosunkowo małej liczbie próbek (76) nie może być reprezentatywne dla populacji polskiej, powinno stanowić jednak przyczynek do wyników poszerzonych, bardziej obiektywnych badań.

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- wykryte stężenia cynku i manganu mieszczą się na ogół w zakresie stężeń podawanych przez innych autorów;
- cynk najbardziej kumuluje się w wątrobie, nerkach i śledzionie, a mangan w wątrobie i jelitach oraz w żółci, nerkach i śledzionie;
- stężenia cynku i manganu wyznaczone metodą FAAS i ICP-OES są porównywalne (brak jest statystycznie istotnych różnic);
- wyniki uzyskane metodą ICP-OES są bardziej precyzyjne, metoda ta jest również bardziej czuła dla cynku i manganu (około 100 i 150-krotnie odpowiednio dla cynku i manganu) niż FAAS;

- dane stanowią przyczynek do wyników badań populacyjnych dotyczących stężeń metali w materiale biologicznym, a w szczególności w materiale sekcyjnym, wykorzystywanych do interpretacji wyników analizy chemiczno-toksykologicznej w opinio-
waniu o przyczynie zatruc.