



THE INFLUENCE OF THE METHOD OF DIGESTION OF BIOLOGICAL SAMPLES AND THE METHOD OF DETERMINATION OF SOME MAJOR AND TRACE ELEMENTS IN THESE SAMPLES ON ANALYTICAL RESULTS

Teresa LECH¹, Danuta DUDEK-ADAMSKA²

¹ *Institute of Forensic Research, Kraków, Poland*

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

Abstract

Collection of a sample and securing, storing, preparing and determining it may have an influence on the end result of chemo-toxicological analysis. The aim of the research was to investigate the influence of different methods of preparing material for analysis (without mineralization, conventional heating in Bethge apparatus, microwave digestion) and also two analytical methods (F-AAS, ICP-OES) on the results of determination of some elements in samples of biological material (blood, urine, bile, sections of internal organs) which are commonly analysed in forensic expert examinations. The method of mineralization in Bethge apparatuses (with conventional heating) allowed us to obtain comparable results to those obtained by a more modern method – microwave digestion – regardless of which method was used to analyse the samples (ICP-OES or F-AAS), with the exception of Cd, for which lower results were obtained by the F-AAS method after mineralization in Bethge apparatus. Furthermore, it was ascertained that in cases where time of analysis plays a significant role (e.g. in diagnosing acute poisonings by metal compounds), analysis of urine can be carried out without preliminary decomposition of the sample in acids: for most studied metals (besides Hg, Pb and Li), the sample only needs to be appropriately diluted. The influence of the analytical method on results of determination of heavy metals (Zn, Mn, Cu, Cd and Cr) in samples of autopsy material (body fluids, sections of internal organs) was observed to be insignificant. For example, concentrations of Cr in urine collected from persons who had not been poisoned, as determined by the ICP-OES method, were about 30% higher than those obtained by the F-AAS method. In samples of NIST Bovine Liver 1577b somewhat higher concentrations of Cu, Mn and Zn were obtained by the ICP-OES method than by the F-AAS method.

Key words

Metals; Biological material; Method of digestion; Method of determination; Results of analysis.

Received 27 April 2009; accepted 9 September 2009

1. Introduction

Each of the stages of inorganic toxicological analysis (sample collection, securing, storage, preparation and determination) can have an influence on the end result of the analysis. As a rule, forensic experts do not have an influence on the first two stages of analysis;

however, they may participate significantly in realisation of the last three. Furthermore, when experts have at their disposal various types of materials for analysis (in the case of biological material, this is most often samples of blood and (or) urine, hair, bones, nails and sections of internal organs), they can select the (most appropriate) material – mainly being guided by the aim

of the analysis (establishing of “normal” levels, i.e. reference ones, assessment of chronic or acute poisoning etc.). Correct performance of toxicological analysis requires application of verified methods of sample preparation and determination of particular components within them. Analysis of samples with less complicated matrices (serum, urine) constitutes an exception – such samples are utilized, e.g. in diagnosing acute poisonings, when a result must be obtained quickly. During such analyses, preparation of material for determination takes place without mineralization and consists in dilution with water [8, 15, 19], or – as in the case of blood – addition of 0.1% Triton X-100 and 0.5% ammonia [9].

A whole series of different methods of preparing biological material for analysis for metal content exists. Currently, the most frequently applied are methods of mineralization using conventional heating of a sample with concentrated acids (nitric, sulphuric, perchloric) in closed glass apparatuses, e.g. Bethge, or in a special equipment for mineralization, e.g. mono-mode reactor Maxidigest MX 350, Prolabo, or other producers, or more modern methods – breaking down of a sample matrix with application of microwave energy in low or high pressure apparatuses using various technologies, with the possibility of measurement of temperature and pressure in one or every vessel containing a sample [3, 5, 6, 10, 11, 16, 18, 23, 24, 26, 27]. These are increasingly frequently replacing conventional techniques. These methods are generally faster, but unfortunately not always cheaper. They enable the preparation of larger series of samples, but most frequently with small masses (up to 1–2 g) or volumes (up to 20 ml). In this respect, traditional techniques have an advantage, especially when one is using analytical methods of lower sensitivity and there is a need to collect a larger sample [24].

Instrumental analysis methods give the greatest possibilities of choice and differentiation, especially in terms of limits of detection and range of determination [1, 2, 4]. The following techniques are used to determine toxic heavy metals and significant elements in biological material: various AAS techniques [1, 2, 12, 13, 15, 16, 19, 22, 25], ICP-OES [1, 2, 3, 7, 10, 12, 14, 17, 20, 21, 22, 24], ICP-MS [2, 3, 7, 8, 9, 18, 22, 24] and other methods, e.g. instrumental neutron activation analysis INAA [1, 25] or DC-polarography, DCP [4, 25]. Chan et al. [4] compared 5 different methods of determining elements for clinical purposes (ICP-MS, GF-AAS, ICP-OES, DCP and F-AAS) and showed that amongst multielement methods, the best method is ICP-MS, which is superior to the time-consuming and mono-elemental method GF-AAS (in spite of com-

parable sensitivities to many metals). Studies done by Reitznerowa et al. [22] indicate that out of a group of 3 methods (GF-AAS, ICP-OES and ICP-MS) for studying human teeth for the content of seven elements (Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Sr and Zn), each served a different purpose depending on its strong and weak points. In the field of methods of determining metals and non-metals in seven certified reference materials and 20 different samples of food, ICP-OES with ultrasonic nebuliser turned out to be a very good method, enabling determination of as many as 18 elements with the exception of Al, Sr and Se and with limits of detection that were comparable with graphite furnace atomic absorption spectrometry GF-AAS [6].

The aim of the research was to investigate the influence of the method of preparing materials for examination (without mineralization and with use of conventional heating in Bethge apparatuses or microwave digestion and also the applied analytical method (flame atomic absorption spectrometry F-AAS and also cold vapour atomic absorption spectrometry, CV-AAS; inductively coupled plasma optical emission spectrometry, ICP-OES) on results of determination of certain metals that are significant from the point of view of toxicology and frequency of occurrence of poisonings. In the research we used samples of certain reference materials (urine, liver) and also actual samples of biological material (blood, urine, bile and internal organ sections) that are (commonly) analysed in expert examinations.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Samples of body fluids and sections of internal organs secured in the course of autopsies of persons who had died due to reasons other than poisoning constituted the research material. In total, 76 samples originating from 8 women and 22 men aged from 18 to 56 years (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 ($n = 4$) and also bile ($n = 7$) were analysed. The presence of inorganic poisons in the samples was ruled out by the AAS method (flame and cold vapour technique) and also by spectrophotometry in visible light.

Two certified materials were also analysed: urine – Seronorm Trace Elements Urine (SERO AS, Norway) and also NIST Bovine Liver 1577b (NIST, United States).

2.2. Reagents, preparation of samples and apparatus

2.2.1. Reagents

Concentrated trioxonitric(V) acid (HNO_3) of special purity (Suprapur) and hydrogen peroxide of concentration 30% (v/v) ultrapure quality by Merck (microwave mineralization) or a mixture of concentrated acids: trioxonitric(V) and tetraoxosulphuric(VI) acid (H_2SO_4) ultrapure quality by Merck (mineralization in Bethge apparatuses) were used to mineralise samples of biological material.

Standard solutions were prepared for use in calibration:

- for the ICP-OES method, by dilution of a multi-element (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) standard solution (Merck) at a concentration of 1000 mg/l;
- for the F-AAS and CV-AAS method from element standards (Merck) of concentration 1000 mg/l.

Deionized water originating from the NANOpure Diamond system of purifying water (Barnstead, United States) was used to create working standard solutions and to dilute samples. Glass and polypropylene vessels were prepared by washing and soaking (overnight) in 25% (v/v) HNO_3 ultrapure quality, ChemPur, Poland).

2.2.2. Sample preparation

When comparing methods of preparing biological material, samples of certified materials were diluted in a microwave oven MLS 1200 Mega (Milestone, Italy) in high pressure teflon vessels of volume 160 ml in accordance with the following programme: 1 min – 250 W, 2 min – 0 W and also successively: 250, 400 and 600 W (5 min each), collecting 5 parallel samples of volume 5 ml (Seronorm Urine) or 6 parallel samples of liver of mass 1 g (Bovine Liver). Furthermore, part of the samples (5 samples of urine as above of volume 5 ml and 6 parallel samples of liophilised liver of mass 1 g) were mineralised in Bethge type apparatus with concentrated acids (2 ml H_2SO_4 and 10 ml HNO_3). The obtained mineralizates were diluted to a volume of 10 ml or 25 ml.

When comparing ICP-OES and F-AAS methods, samples of biological material (10 ml blood, urine or bile, 10 g of sections of internal organs) were mineralized in Bethge's closed system apparatuses with concentrated acids as above and transferred to a vessel of volume 20 ml. Up to the time of analysis, the mineralized samples were stored in a refrigerator at a tempera-

ture of 4°C. Blank samples were also prepared for each series of samples.

2.2.3. Apparatus

Analyses of samples of biological material for metal content were carried out by the following methods:

- F-AAS with use of atomic absorption spectrometer SP 9800 by Pye Unicam (Great Britain), using a hollow cathode lamp for each element separately and establishing characteristic resonance wavelengths for Zn, Mn, Cu, Cd and Cr;
- CV-AAS, applying a spectrometer as above;
- ICP-OES with application of plasma emission spectrometer iCAP 6300 duo (Thermo Electron Corp., United States), enabling simultaneous recording of the full emission spectrum of a sample in the range from 166.250 to 847.000 nm with the help of a charge injection device with a double system of observation of plasma (axial and radial), whose fundamental features and measurement conditions applied in analysis have been presented in the literature [14].

3. Determination of elements

3.1. F-AAS method

Determination of Zn, Mn and Cd by the F-AAS method was carried out at the following wavelengths respectively: 213.9 nm, 279.5 nm and 228.8 nm, applying deuterium background correction, and Cu and Cr: 324.8 nm and 357.9 nm respectively without background correction. Calibration was carried out by the standard series method in the range up to 0.5 g/ml (Zn, Cd), 1 g/ml (Mn) and also 2 g/ml (Cu, Cr). The determined limits of detection (*LOD*) and quantification (*LOQ*) were respectively: 0.009 and 0.03 (Zn), 0.03 and 0.10 (Mn), 0.01 and 0.04 (Cu), 0.01 and 0.03 (Cd), 0.03 and 0.11 (Cr) g/ml.

3.2. The CV-AAS method

Determination of Hg was carried out by the CV-AAS method with a cold vapour mercury kit according to the method presented in a previous study [13], using a hollow cathode lamp ($\lambda = 253.7$ nm) and deuterium background correction. Calibration was carried out by the standard series method, reducing mercury(II) to atomic mercury (with the help of tin chloride(II) and sulphuric H_2SO_4 in the presence of sodium chloride) in standard solutions containing mercury in the range up

to 1000 ng in the whole reduced sample. *LOD* and *LOQ* were respectively: 15 ng Hg/sample and 50 ng Hg/sample.

3.3. The ICP-OES Method

Determination of Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl and Zn by the ICP-OES method was carried out using selected analytical lines defined in earlier research [14] and also double observation of plasma (axial and radial). Calibration was performed by the standard series method within a range up to 2 mg of each element /ml. In the earlier research [14], limits of detection and determination were given for particular analytical lines of studied elements.

4. Results and discussion

In order to assess the influence of various methods (F-AAS and ICP-OES) and ways of mineralization (in

the case of application of the ICP-OES method) on results of determination of metals in biological material, samples of certified reference material Seronorm Trace Elements Urine were analysed (5–5 ml urine) without mineralization and separately after microwave mineralization, and also samples of NIST Bovine Liver 1577b (6–1 g liver) were analysed after classical mineralization in Bethge apparatus and in the microwave system. The concentrations of metals obtained in the studied materials are presented in Tables I and II.

In the case of most determined metals, we did not observe a significant influence of the sample preparation method on obtained results relating to diluted certified urine (without mineralization) and after microwave mineralization. Hg and Pb constituted exceptions, results of which without mineralization were lowered (probably due to incomplete breakdown of sample) and Li, for which elevated results were obtained (perhaps due to contamination of the sample; strong ionisation effects cannot be ruled out either). In the case of lyophilised bovine liver, we did not observe big differences between results obtained for samples

TABLE I. CONCENTRATION OF ELEMENTS IN SERONORM URINE BY ICP-OES DIRECTLY AND AFTER MICROWAVE DIGESTION ($n = 5$)

Element	Seronorm Trace Elements Urine Concentration of element [$\mu\text{g/l}$]		
	Certified value*	Without mineralization	After microwave digestion
Al	105 (101–109)	104 \pm 4	104 \pm 5
Ba	9 (5–13)	11 \pm 5	11 \pm 4
Ca	108 (104–110)**	108 \pm 3**	106 \pm 3**
Cd	5.06 (4.84–5.28)	5.10 \pm 0.18	5.25 \pm 0.20
Co	10.1 (9.60–10.6)	9.50 \pm 0.8	10.2 \pm 0.7
Cr	20.1 (19.0–21.2)	25.5 \pm 4.0	26.6 \pm 3.0
Cu	16.1 (14.7–17.5)	16.5 \pm 1.2	16.3 \pm 1.1
Fe	14.4 (13.0–15.8)	16.6 \pm 2.8	18.3 \pm 2.5
Hg	40.3 (37.7–42.9)	20.7 \pm 3.0	39.3 \pm 0.6
Li	7.94 (7.11–8.47)	13.2 \pm 1.2	15.6 \pm 1.5
Mg	54.0 (53–55)**	54.3 \pm 3.0**	53.5 \pm 3.5**
Mn	11.1 (10.1–12.1)	11.1 \pm 1.0	10.8 \pm 1.1
Ni	41.5 (39.3–43.7)	39.2 \pm 2.2	41.2 \pm 2.0
Pb	91.1 (84.1–98.1)	67.0 \pm 10	98.6 \pm 6
Sr	91.3 (85.0–97.6)	85.5 \pm 6.0	89.7 \pm 5.0
Zn	261 (248–274)	275 \pm 10.0	301 \pm 12.0

* Value and 95% confidence level; ** [mg/l].

TABLE II. CONCENTRATION OF ELEMENTS IN NIST BOVINE LIVER 1577B BY ICP-OES AND F-AAS AFTER DIFFERENT WAYS OF WET DIGESTION ($n = 6$)

Element	Concentration [g/g]				
	Certified	ICP-OES		F-AAS	
		Microwave digestion	Mineralization in Bethge apparatus	Microwave digestion	Mineralization in Bethge apparatus
Ag	0.039 ± 0.007	0.07 ± 0.09	Nd	–	–
Ca	116 ± 4	118 ± 3	122 ± 5	–	–
Cd	0.50 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.39 ± 0.01
Cu	160 ± 8	169 ± 2	163 ± 1	153 ± 0.5	152 ± 2
Fe	184 ± 15	200 ± 2	197 ± 2	–	–
Mg	601 ± 28	613 ± 5	617 ± 2	–	–
Mn	10.5 ± 1.7	11.2 ± 0.2	11.2 ± 0.1	9.52 ± 0.25	8.78 ± 0.08
Sr	0.136 ± 0.001	0.138 ± 0.026	0.140 ± 0.003	–	–
Zn	127 ± 16	126 ± 0.6	123 ± 1	119 ± 1	117 ± 1

UNCERTIFIED VALUES

Al	(3)	(2.0 ± 1.3)	(3.6 ± 1.0)	–	–
Co	(0.25)	(0.23 ± 0.02)	(0.20 ± 0.03)	–	–
Hg	(0.003)	–	–	–	(0.003)*

Nd – not detected; “–” – not analysed; *determined by CV-AAS.

subjected to classical mineralization (in Bethge type apparatus) and those dissolved in the microwave system (MLS 1200 Mega produced by Milestone); only concentrations of Cd obtained by the F-AAS method after mineralization in Bethge apparatus were lower than after microwave mineralization (losses most probably stem from the relatively high volatility of Cd).

The obtained results confirm observations made by other authors. For example, Sun et al. [24], when comparing 5 different methods of preparing various certified food samples, including samples of animal origin, also ascertained that the procedure of classical dissolution by acids (nitric and perchloric) is the simplest and at the same time the most effective procedure for preparing certified food materials for analysis for 13 selected elements, with the exception of Al and B, and when applying microwave digestion using a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide with addition of hydrofluoric acid, very good recovery is achieved even for Al and B.

It was ascertained that the applied analytical methods had an insignificant influence on the achieved results for elemental content in the sample: it was observed

that concentrations obtained by the ICP-OES method were as a rule higher than those which were established by the F-AAS method, especially for Cu, Mn and Zn. This may be linked with the different ways of calibration (calibration for the ICP-OES method is carried out using one multi-element solution, whilst for the F-AAS method – applying, for each element, a separate solution and different range of linearity of absorbance against concentration) and also differences in interferences of emitted and absorbed radiation by the sample (in ICP-OES spectral interferences dominate, in F-AAS – chemical).

Results of determination of selected metals (Zn, Mn, Cu, Cd, and Cr) in certain tissues (stomach, small intestine, brain, liver, kidneys, spleen and lung), and also in body fluids (blood, urine and bile) obtained by the F-AAS method and also – for comparison – by the ICP-OES method are presented in graphs (Figure 1). Significant differences in determined concentrations of Zn, Mn, Cu, Cd and Cr in various tissues (organ sections, physiological fluids) were not observed, with the exception of chrome in urine, for which concentrations established by the ICP-OES method were higher

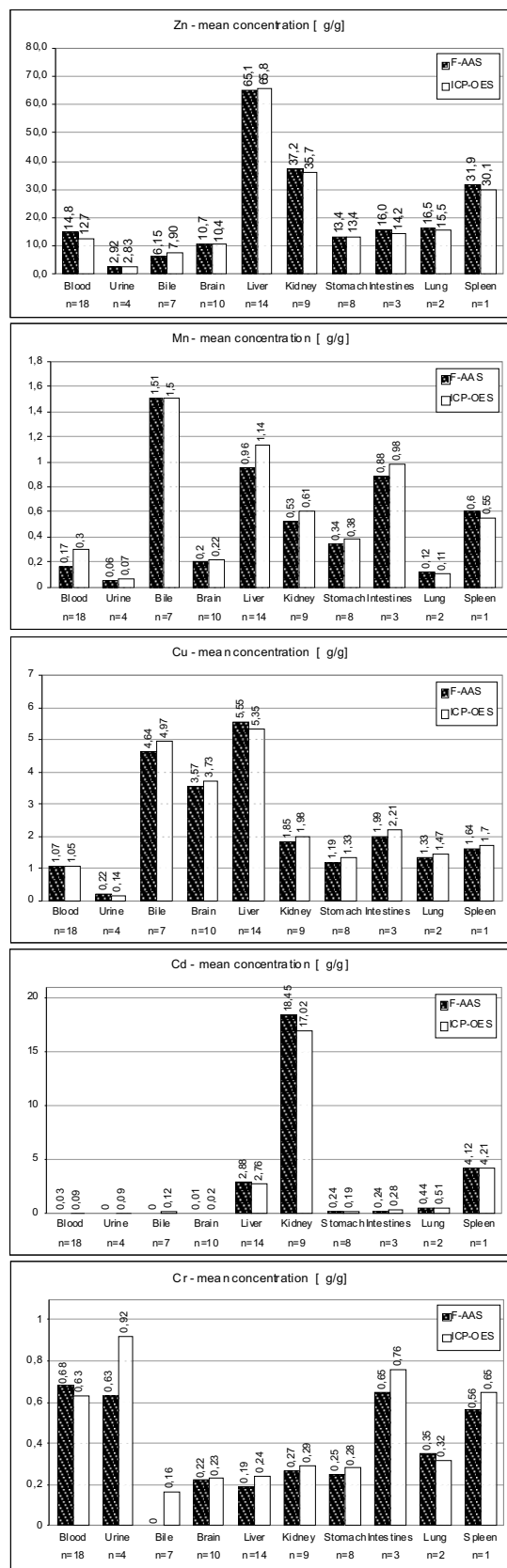


Figure 1. Concentrations of elements in autopsy tissues and body fluids by F-AAS and ICP-OES methods.

by about 30% than those obtained by the F-AAS method. This may be caused by an error linked with a too low concentration of Cr in urine – near the limit of detection.

More detailed data on the subject of content of Zn and Mn obtained by the F-AAS and ICP-OES methods (means, medians, standard deviations) in analysed samples have been presented in another paper [12], in which results of statistical analysis of a comparison of concentrations of Zn and Mn obtained by the two methods (Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA test – lack of statistically significant differences) were also given. It is worth mentioning that for Zn and Mn, *LOD* and *LOQ* for the ICP-OES method were many times lower (about 100-fold for Zn and as much as 150-fold for Mn) than for the F-AAS method. Andrasi et al. [1], when comparing 3 methods of determination of Cu, Fe, Mn, Zn, Cd and Pb in certified material NIST Bovine Liver 1577a (ICP-OES, GF-AAS and INAA) ascertained that the most accurate technique is ICP-OES; only Zn content in liophilised liver was somewhat higher than in the certificate and higher than in samples studied by the GF-AAS or INAA method.

Furthermore, ICP-OES turned out to be a more universal method – in the studied material, we managed to establish the levels of other elements besides metals mentioned in this paper, even some nonmetals (B) and also concentrations of Pb and Hg in accumulating organs, such as liver, kidney and spleen. We were not able to determine elements such as Al, B, Ba, Sr and Ni by the F-AAS method in blood, urine and bile, or in organ tissues.

To summarise, it may be stated that there are many methods of preparing biological material for analysis for metal (and nonmetal) content, and also methods of determining elements that are significant from the point of view of forensic toxicology, which are different both in terms of limits of detection and quantification and possibilities of carrying out mono- or multi-element analysis. In this work it has been shown that application of a more modern method of mineralization (using microwave radiation) and determination of significant and toxic elements in biological samples (ICP-OES) does not so much improve the accuracy of analysis as significantly shorten its duration and increase the range of determined elements in one analytical process in comparison to classical methods (mineralisation in Bethge type apparatus, FAAS as the method of determination).

5. Conclusions

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

- the method of mineralization (with conventional heating and microwave assisted) applied in this research does not in a significant way influence the concentrations of heavy metals determined by the ICP-OES or F-AAS method, with the exception of Cd (lower concentrations after mineralization in Bethge apparatus);
- analysis of urine for content of significant or heavy elements with the exception of Hg, Pb and Li can be carried out without preliminary dissolution of the sample; only appropriate dilution of the sample need be applied;
- analytical results in general do not depend on the applied instrumental method of determination, although it should be remembered that various elements can be determined with various methods (e.g. the ICP-OES method allowed determination of levels of Al, B, Ba, Sr and Ni, which could not be determined by the FAAS method).

Conclusions from the above research can be applied in expert practice as part of the expert witness services of the Institute of Forensic Research.

References

1. Andrási E., Igaz S., Szoboszlai N. [et al.], Several methods to determine heavy metals in human brain, *Spectrochimica Acta B* 1999, 54, 1469–1480.
2. Bolann B. J., Rahil-Khazen R., Henriksen H. [et al.], Evaluation of methods for trace element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 2007, 67, 353–366.
3. Bou R., Guardiola F., Padró A. [et al.], Validation of mineralization procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2004, 19, 1361–1369.
4. Chan S., Gerson B., Reitz R. E. [et al.], Technical and clinical aspects of spectrometric analysis of trace elements in clinical samples, *Clinical Laboratory Medicine* 1998, 18, 615–629.
5. Demirel S., Tuzen M., Saracoglu S. [et al.], Evaluation of various digestion procedures for trace elements contents of some food materials, *Journal of Hazard Materials* 2008, 152, 1020–1026.
6. Dolan S. P., Capar S. G., Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Journal of Food Composition and Analyses* 2002, 15, 593–615.
7. 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.
8. Heitland P., Köster H. D., Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS, *Clinica Chimica Acta* 2006, 365, 310–318.
9. Heitland P., Köster H. D., Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2006, 20, 253–262.
10. Kira C. S., Maio F. D., Maihara V. A., Comparison of partial digestion procedures for determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in milk by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, *Journal of AOAC International* 2004, 87, 151–156.
11. Kucak A., Blanusa M., Validation of microwave digestion method for determination of trace metals in mushrooms, *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 1998, 49, 335–342.
12. Lech T., Dudek-Adamska D., Concentration of zinc and manganese in postmortem tissues and body fluids, *Problems of Forensic Sciences* 2009, 78, 226–238.
13. 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.
14. Lech T., Lachowicz T., Application of ICP-OES to multi-element analysis of biological material in forensic inorganic toxicology, *Problems of Forensic Sciences* 2009, 77, 33–47.
15. Lin T. W., Huang S. D., Direct and simultaneous determination of copper, chromium, aluminium, and manganese in urine with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Analytical Chemistry* 2001, 73, 4319–4325.
16. Meeravali N. N., Kumar S. J., Comparison of open microwave digestion and digestion by conventional heating for the determination of Cd, Cr, Cu, and Pb in algae using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2000, 366, 313–315.
17. Mochizuki M., Hondo R., Ueda F., Simultaneous analysis for multiple heavy metals in contaminated biological samples, *Biological Trace Elements Research* 2002, 87, 211–223.
18. Noël L., Dufailly V., Lemahieu N. [et al.], Simultaneous analysis of cadmium, lead, mercury, and arsenic content in foodstuffs of animal origin by inductively coupled plasma/mass spectrometry after closed vessel microwave digestion: method validation, *Journal of AOAC International* 2005, 88, 1811–1921.
19. 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.
20. 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.
 21. Rahil-Khazen R., Bolann B. J., Myking A. [et al.], Multi-element 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.
 22. Reitznerová E., Amarasiriwardena D., Kopčáková M. [et al.], Determination of some trace elements in human tooth enamel, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2000, 367, 748–754.
 23. Subramanian K. S., Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques, *Spectrochimica Acta B* 1996, 51, 291–319.
 24. Sun D. A., Waters J. K., Mawhinney T. P., Determination of thirteen common elements in food samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: comparison of five digestion methods, *Journal of AOAC International* 2000, 83, 1218–1224.
 25. 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.
 26. Wietecha-Posłuszny R., Woźniakiewicz M., Kościelniak P., Application of microwave assisted-techniques to sample preparation in forensic and clinical analysis, *Problems of Forensic Sciences* 2008, 73, 30–43.
 27. Zischka M., Kettisch P., Schalk A. [et al.], Closed vessel microwave-assisted wet digestion with simultaneous control of pressure and temperature, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1998, 361, 90–95.

Corresponding author

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

WPLYW SPOSOBÓW MINERALIZACJI PRÓBEK BIOLOGICZNYCH ORAZ METOD OZNACZANIA NIEKTÓRYCH, PODSTAWOWYCH I ŚLADOWYCH PIERWIASTKÓW W TYCH PRÓBKACH NA WYNIKI ANALITYCZNE

1. Wstęp

Każdy z etapów nieorganicznej analizy toksykologicznej (pobieranie próbki, jej zabezpieczanie, przechowywanie, przygotowanie i oznaczanie) może mieć wpływ na końcowy wynik badania. Z kolei ekspert sądowy z reguły nie ma wpływu na dwa pierwsze etapy analizy, może mieć natomiast znaczący udział w realizacji trzech pozostałych. Ponadto gdy dysponuje różnymi rodzajami materiałów do badań (w przypadku materiału biologicznego najczęściej próbkami krwi i (lub) moczu, włosów, kości, paznokci, wycinkami narządów wewnętrznych), może dokonać wyboru materiału, kierując się głównie celem analizy (ustalenie poziomów „normalnych”, tj. referencyjnych, ocena zatrucia chronicznego lub ostrego itp.). Prawidłowo przeprowadzona analiza toksykologiczna wymaga zastosowania sprawdzonych metod przygotowania próbek i oznaczania w nich poszczególnych składników. Wyjątek stanowią analizy próbek o matrycach mniej skomplikowanych (surowica, mocz), wykorzystywane np. w diagnozowaniu ostrych zatruc, kiedy wymagane jest szybkie podanie wyniku. Podczas takich analiz przygotowanie materiału do oznaczenia przebiega bez mineralizacji i polega na rozcieńczeniu wodą [8, 15, 19], bądź – jak w przypadku krwi – dodatku 0,1% Tritonu X-100 i 0,5% amoniaku [9].

Istnieje szereg metod przygotowania materiału biologicznego do badania na zawartość metali. Najczęściej są to obecnie metody mineralizacji wykorzystujące konwencjonalne ogrzewanie próbki ze stężonymi kwasami (azotowym, siarkowym, nadchlorowym) w aparatach zamkniętych, szklanych, np. Bethgego, lub w gotowych zestawach do mineralizacji, np. firmy Prolabo bądź innych, albo metody bardziej nowoczesne – rozkładu matrycy próbki z zastosowaniem energii mikrofalowej w aparatach nisko- lub wysokociśnieniowych o różnych rozwiązaniach technicznych, z możliwością pomiaru temperatury i ciśnienia w jednym lub każdym naczyniu z próbką [3, 5, 6, 10, 11, 16, 18, 23, 24, 26, 27], które coraz częściej wypierają techniki konwencjonalne. Metody te są na ogół szybsze, niestety nie zawsze tańsze. Umożliwiają one przygotowanie większych serii próbek, ale najczęściej o niewielkich masach (do 1–2 g) lub objętościach (do 20 ml). Pod tym względem techniki tradycyjne mają jednak przewagę, zwłaszcza gdy dysponuje się metodami analitycznymi o mniejszej czułości i zachodzi potrzeba pobrania większej próbki [24].

Największe możliwości wyboru i zróżnicowanie, zwłaszcza pod względem granic wykrywalności i zakresu oznaczania, dają metody analizy instrumentalnej [1, 2, 4]. Do oznaczania toksycznych metali ciężkich i pierwiastków istotnych w materiale biologicznym wykorzystywane są różne techniki AAS [1, 2, 12, 13, 15, 16, 19, 22, 25], ICP-OES [1, 2, 3, 7, 10, 12, 14, 17, 20, 21, 22, 24], ICP-MS [2, 3, 7, 8, 9, 18, 22, 24] i inne metody, np. instrumentalna neutronowa analiza aktywacyjna, INAA [1, 25] lub klasyczna polarografia stałoprądowa, DCP [4, 25]. Chan i in. [4], porównując 5 różnych metod oznaczania pierwiastków do celów klinicznych (ICP-MS, GF-AAS, ICP-OES, DCP i F-AAS), wykazali, że wśród metod wielopierwiastkowych najlepszą metodą jest ICP-MS, która przewyższa czasochłonną i jednopierwiastkową metodę GF-AAS (mimo porównywalnych czułości dla wielu metali). Z badań Reitznerowej i in. [22] wynika, że w grupie 3 metod (GF-AAS, ICP-OES i ICP-MS) do badania zębów ludzkich na zawartość siedmiu pierwiastków (Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Sr i Zn) każda służyła do innego celu ze względu na swoje zalety i wady. W zakresie metod oznaczania metali i niemetałów w siedmiu certyfikowanych materiałach referencyjnych i 20 różnych próbkach żywności bardzo dobrą metodą okazała się ICP-OES z ultradźwiękowym rozpylaczem, umożliwiającą oznaczanie aż 18 pierwiastków z wyjątkiem Al, Sr i Se i z granicami wykrywalności porównywalnymi z kuetą grafitową w absorpcji atomowej [6].

Celem badań było sprawdzenie przy użyciu próbek niektórych materiałów referencyjnych (mocz, wątroba), jak również rzeczywistych próbek materiału biologicznego (krew, mocz, żółć, wycinki narządów wewnętrznych) analizowanych w ekspertyzach sądowych, wpływu sposobów przygotowania materiału do badań (bez mineralizacji i z wykorzystaniem ogrzewania konwencjonalnego w aparatach Bethgego lub roztwarzania wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym) oraz zastosowanej metody analitycznej (atomowa spektrometria absorpcyjna z techniką płomieniową F-AAS oraz zimnych par rtęci, CV-AAS; spektrometria emisyjna z plazmą sprzężoną indukcyjnie, ICP-OES) na wyniki oznaczania niektórych metali istotnych z punktu widzenia toksykologicznego i częstotliwości występowania zatruc.

2. Materiały i metody

2.1. Próbki

Materiał badawczy stanowiły próbki płynów ustrojowych i wycinki narządów wewnętrznych zabezpieczone w trakcie 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 ($n = 4$) oraz żółć ($n = 7$). W próbkach wykluczono metodą AAS (technika płomieniowa i zimnych par rtęci) oraz spektrofotometrii w świetle widzialnym obecność trucizn nieorganicznych.

Badaniom poddano także dwa materiały certyfikowane: moczu – Seronorm Trace Elements Urine (SERO AS, Norwegia) oraz wątroby wołowej – NIST Bovine Liver 1577b (NIST, Stany Zjednoczone).

2.2. Odczynniki, przygotowanie próbek i aparatura

2.2.1. Odczynniki

Do mineralizacji próbek materiału biologicznego użyto stężonego kwasu azotowego(V) o specjalnej czystości (Suprapur) i nadtlenu wodoru o stężeniu 30% (v/v) cz.d.a. firmy Merck (mineralizacja mikrofalowa) lub mieszaniny stężonych kwasów: azotowego(V) i siarkowego(VI) cz.d.a. firmy Merck (mineralizacja w aparatach Bethgego).

Roztwory wzorcowe stosowane do kalibracji przygotowywano:

- w metodzie ICP-OES przez rozcieńczenie wielopierwiastkowego (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) standardowego roztworu podstawowego (Merck) o stężeniu 1000 mg/l;
- w metodzie F-AAS i CV-AAS ze wzorców jednopierwiastkowych podstawowych (Merck) o stężeniach 1000 mg/l.

Do sporządzenia roboczych roztworów standardów oraz do rozcieńczania próbek używano wody dejonizowanej pochodzącej z systemu oczyszczania wody NANOpure Diamond (Barnstead, 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).

2.2.2. Przygotowanie próbek

W badaniach porównawczych metod przygotowania materiału biologicznego próbki materiałów certyfikowanych roztwarzano w piecu mikrofalowym MLS 1200

Mega (Milestone, Włochy) w wysokociśnieniowych naczyniach teflonowych o objętości 160 ml zgodnie z programem: 1 min – 250 W, 2 min – 0 W oraz kolejno: 250, 400 i 600 W (po 5 min), pobierając 5 równoległych próbek o objętości 5 ml (Seronorm Urine) lub 6 równoległych próbek wątroby o masie 1 g (Bovine Liver). Ponadto część próbek (5 próbek moczu jw. o objętości 5 ml i 6 równoległych próbek liofilizowanej wątroby o masie 1 g) zmineralizowano w aparacie typu Bethge stężonymi kwasami (2 ml siarkowego i 10 ml azotowego). Uzyskane mineralizaty rozcieńczano do objętości 10 ml lub 25 ml.

W badaniach porównawczych metod ICP-OES i F-AAS próbki materiału biologicznego (10 ml krwi, moczu lub żółci, 10 g wycinków narządów wewnętrznych) mineralizowano w aparatach zamkniętych Bethgego stężonymi kwasami jw. i przenoszono do naczynia o objętości 20 ml. Do czasu analizy zmineralizowane próbki przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C. Dla każdej serii próbek przygotowywano również próby odczynnikowe.

2.2.3. Aparatura

Analizę próbek materiału biologicznego na zawartość metali przeprowadzono metodami:

- F-AAS z użyciem spektrometru do absorpcji atomowej SP 9800 firmy Pye Unicam (Wielka Brytania), wykorzystując lampy z katodą wnątkową dla każdego pierwiastka oddzielnie i ustalając charakterystyczne długości fal rezonansowych dla Zn, Mn, Cu, Cd i Cr;
- CV-AAS, stosując spektrometr jw.;
- ICP-OES z zastosowaniem plazmowego spektrometru emisyjnego iCAP 6300 duo (Thermo Electron Corp., Stany Zjednoczone) umożliwiającego równoczesną rejestrację pełnego widma emisyjnego próbki w zakresie od 166,250 do 847,000 nm za pomocą detektora ze wstrzykiwaniem ładunku (ang. charge injection device, CID) z podwójnym systemem obserwacji plazmy (osiowym i radialnym), którego podstawowe cechy i warunki pomiarowe zastosowane w analizie przedstawiono w literaturze [14].

3. Oznaczanie pierwiastków

3.1. Metoda F-AAS

Oznaczenie Zn, Mn i Cd metodą F-AAS przeprowadzono przy następujących długościach fal, odpowiednio: 213,9 nm, 279,5 nm i 228,8 nm, stosując deuterową korekcję tła, a Cu i Cr – 324,8 nm i 357,9 nm bez korekcji tła. Kalibrację przeprowadzono metodą serii wzorców w zakresie do 0,5 g/ml (Zn, Cd), 1 g/ml (Mn) oraz 2 g/ml (Cu, Cr). Wyznaczone granice wykrywalności

(*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*) wynosiły odpowiednio: 0,009 i 0,03 (Zn), 0,03 i 0,10 (Mn), 0,01 i 0,04 (Cu), 0,01 i 0,03 (Cd), 0,03 i 0,11 (Cr) g/ml.

3.2. Metoda CV-AAS

Oznaczenie Hg wykonano metodą CV-AAS z przystawką do zimnych par rtęci według metody przedstawionej w pracy [13], stosując lampę z katodą wnątkową ($\lambda = 253,7$ nm) i deuterową korekcję tła. Kalibrację przeprowadzono metodą serii wzorców, poddając redukcji rtęć(II) do rtęci atomowej (za pomocą chlorku cyny(II) i kwasu siarkowego(VI) w obecności chlorku sodu) we wzorcach zawierających w całej zredukowanej próbce rtęć w zakresie do 1000 ng. *LOD* i *LOQ* wynosiły odpowiednio: 15 ng Hg/próbka i 50 ng Hg/próbka.

3.3. Metoda ICP-OES

Oznaczenie Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl i Zn metodą ICP-OES przeprowadzono, wykorzystując wybrane linie analityczne określone we wcześniejszej pracy [14] oraz podwójną obserwację plazmy (osiową i radialną). Kalibrację wykonano metodą serii wzorców w zakresie do 2 g każdego pierwiastka/ml. W pracy [14] podano granice wykrywalności i oznaczalności dla poszczególnych linii analitycznych badanych pierwiastków.

4. Wyniki i ich dyskusja

W celu oceny wpływu różnych metod (F-AAS i ICP-OES) i sposobów mineralizacji (w przypadku zastosowania metody ICP-OES) na wyniki oznaczania metali w materiale biologicznym, poddano badaniom próbki certyfikowanego materiału odniesienia Seronorm Trace Elements Urine (5–5 ml moczu) bez mineralizacji i oddzielnie po mineralizacji mikrofalowej oraz NIST Bovine Liver 1577b (6–1 g wątroby) po mineralizacji klasycznej w aparacie typu Bethge i w systemie mikrofalowym. Uzyskane stężenia metali w badanych materiałach zestawiono w tabelach I i II.

W przypadku większości oznaczanych metali nie zaobserwowano istotnego wpływu sposobów przygotowania próbki na otrzymane wyniki odnoszące się do rozcieńczonego, certyfikowanego moczu (bez mineralizacji) i po mineralizacji mikrofalowej. Wyjątek stanowiły Hg i Pb, których wyniki bez mineralizacji były zaniżone (prawdopodobnie z powodu niecałkowitego rozkładu próbki) i Li, dla którego otrzymano wyniki zawyżone (być może z powodu skażenia próbki; nie można również wykluczyć wpływu silnych efektów jonizacyjnych). W przypadku liofilizowanej wątroby wołowej nie stwierdzono większych różnic w wynikach otrzymanych dla

próbek poddanych mineralizacji klasycznej (w aparatach typu Bethge) i roztwarzanych w systemie mikrofalowym (MLS 1200 Mega firmy Milestone), jedynie stężenia Cd uzyskane metodą F-AAS po mineralizacji w aparacie Bethgego były niższe niż po mineralizacji mikrofalowej (straty wynikają najprawdopodobniej ze stosunkowo dużej lotności Cd).

Otrzymane wyniki potwierdzają spostrzeżenia dokonane przez innych autorów. Na przykład Sun i in. [24], porównując 5 różnych sposobów przygotowania rozmaitych certyfikowanych próbek żywności, w tym próbek pochodzenia zwierzęcego, stwierdzili również, że procedura klasycznego roztwarzania kwasami (azotowym i nadchlorowym) jest najprostszą i zarazem najbardziej efektywną procedurą przygotowania certyfikowanych materiałów żywności do badania na zawartość 13 wybranych pierwiastków, z wyjątkiem Al i B, a stosując roztwarzanie mikrofalowe przy użyciu mieszaniny kwasu azotowego i nadtlenku wodoru z dodatkiem kwasu fluorowodorowego, bardzo dobry odzysk uzyskuje się nawet dla Al i B.

Stwierdzono natomiast nieznaczny wpływ zastosowanych metod analitycznych na uzyskane wyniki zawartości pierwiastka w próbce, przy czym zaobserwowano, że stężenia uzyskane metodą ICP-OES były z reguły wyższe niż te, które ustalono metodą F-AAS, zwłaszcza dla Cu, Mn i Zn. Może to być związane z różnymi sposobami kalibracji (kalibrację w metodzie ICP-OES wykonano z użyciem jednego roztworu wielopierwiastkowego, w metodzie F-AAS – stosując dla każdego pierwiastka oddzielny roztwór i inny zakres liniowości absorbancji od stężenia) oraz różnicami w interferencjach promieniowania emitowanego i zaabsorbowanego przez próbkę (w ICP-OES przeważają interferencje spektralne, w F-AAS – chemiczne).

Na diagramach (rycina 1) przedstawiono wyniki oznaczania wybranych metali (Zn, Mn, Cu, Cd, i Cr) w niektórych tkankach (żołądka, jelita cienkiego, mózgu, wątroby, nerki, śledziony i płuca), a także w płynach ustrojowych (krwi, moczu i żółci) uzyskane metodą F-AAS oraz – dla porównania – metodą ICP-OES. Nie zaobserwowano znacznych różnic w wykazanych stężeniach Zn, Mn, Cu, Cd i Cr w różnych tkankach (wycinkach narządów, płynach fizjologicznych), z wyjątkiem chromu w moczu, dla którego stężenia ustalone metodą ICP-OES były wyższe o około 30% w porównaniu z otrzymanymi metodą F-AAS. Może to być spowodowane błędem związanym ze zbyt niskim stężeniem Cr w moczu mieszczącym się w pobliżu granicy wykrywalności.

Bardziej szczegółowe dane na temat zawartości Zn i Mn uzyskane metodą F-AAS i ICP-OES (średnie, mediany, odchylenia standardowe) w analizowanych próbkach przedstawiono w innej pracy [12], w której podano również wyniki analizy statystycznej porównania stężeń

Zn i Mn otrzymanych dwiema metodami (test ANOVA, rang Kruskala-Wallisa dla układów nieparametrycznych, brak statystycznie istotnych różnic). Warto nadmienić, że dla Zn i Mn *LOD* i *LOQ* w metodzie ICP-OES były wielokrotnie niższe (około 100-krotnie dla Zn i aż 150-krotnie dla Mn) niż w metodzie F-AAS. Andrasi i in. [1], porównując 3 metody oznaczania Cu, Fe, Mn, Zn, Cd i Pb w materiale certyfikowanym NIST Bovine Liver 1577a (ICP-OES, GF-AAS i INAA), stwierdzili, że najdokładniejsza jest technika ICP-OES, przy czym jedynie zawartość Zn w liofilizowanej wątrobie była nieco wyższa niż w certyfikacie i w próbkach badanych metodą GF-AAS lub INAA.

ICP-OES okazała się ponadto metodą bardziej uniwersalną – w badanym materiale udało się ustalić poziomy również innych pierwiastków poza metalami wymienionymi w niniejszej pracy, nawet niektórych niemetalu (B) oraz stężenia Pb i Hg w narządach kumulujących, takich jak wątroba, nerka czy śledziona. Metodą AAS z techniką płomieniową nie można było bowiem oznaczyć takich pierwiastków, jak np. Al, B, Ba, Sr i Ni we krwi, moczu i żółci, a także w tkankach narządów.

Podsumowując, można stwierdzić, że istnieje wiele sposobów przygotowania materiału biologicznego do analizy na zawartość metali (i niemetalu), jak również metod oznaczania pierwiastków istotnych z punktu widzenia toksykologii sądowej, odmiennych zarówno pod względem granic wykrywalności i oznaczalności, jak również możliwości wykonania jedno- lub wielopierwiastkowej analizy. W niniejszej pracy wykazano, że zastosowanie bardziej nowoczesnej metody mineralizacji (z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego) i oznaczania pierwiastków istotnych i toksycznych w próbkach biologicznych (ICP-OES) nie tyle wpływa na poprawę dokładności analizy, co pozwala w znaczny sposób skrócić jej czas oraz zwiększyć zakres oznaczanych pierwiastków w jednym procesie analitycznym w stosunku do metod klasycznych (mineralizacja w aparacie typu Bethge, FAAS jako metoda oznaczania).

5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- sposób mineralizacji (mineralizacja z ogrzewaniem konwencjonalnym i wspomaganą mikrofalami) zastosowany w niniejszych badaniach nie wpływa w znaczący sposób na stężenia metali ciężkich wyznaczone metodą ICP-OES lub F-AAS, z wyjątkiem Cd (niższe stężenia po mineralizacji w aparacie Bethgego);
- bez wstępnego roztwarzania próbki, stosując jedynie odpowiednie rozcieńczenie próbki, można wykonywać analizę moczu na zawartość pierwiastków istotnych lub ciężkich z wyjątkiem Hg, Pb i Li;

- wyniki analityczne na ogół nie zależą od zastosowanej instrumentalnej metody oznaczania, choć należy pamiętać, że różnymi metodami można oznaczać różne pierwiastki (np. metoda ICP-OES pozwoliła ustalić poziomy Al, B, Ba, Sr i Ni, których nie dało się oznaczyć metodą FAAS).

Wnioski z powyższych badań mogą zostać wykorzystane w praktyce eksperckiej w ramach działalności opiniodawczej Instytutu Ekspertyz Sądowych.